



---

**Universidad de Valladolid**

**Facultad de Ciencias**

**Trabajo Fin de Grado**

**Grado en Química**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE 2,3-BUTANODIONA Y 2,3-PENTANODIONA EN MUESTRAS DE VINO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES.**

**Autor: Felipe de la Rosa Calle.**

**Tutores: Dra. Silvia Valverde Bastardo.**

**Laura Curiel Llanos.**

**Curso: 2023-24**

## 1. Índice.

1. Índice.....	2
2. Índice de imágenes.....	3
3. Índice de tablas. ....	4
4. Resumen/Abstract.....	5
5. Agradecimientos.....	7
6. Introducción. ....	8
6.1. Diacetilo:.....	12
6.2. 2,3-Pentanodiona: .....	16
7. Antecedentes bibliográficos. ....	19
8. Objetivos.....	22
9. Materiales.....	23
9.1. Reactivos: .....	23
9.2. Instrumentación: .....	23
10. Optimización del método: .....	24
11. Procedimiento experimental.....	27
11.1. Muestras de vino terminado o en fermentación maloláctica: .....	27
11.2. Muestras de vino en fermentación alcohólica: .....	30
12. Resultados y discusión.....	32
12.1 Validación del método analítico: .....	41
13. Análisis de las muestras: .....	50
14. Conclusiones.....	55
15. Bibliografía.....	57
16. Anexos. ....	60
16.1. Terminología de las muestras:.....	60
16.2. Análisis fisicoquímico y de las muestras de vino tinto utilizadas. ....	61
16.3. Análisis fisicoquímico y de las muestras de vino rosado utilizadas.....	63

## 2. Índice de imágenes.

<b>Imagen 1:</b> Estructura del diacetilo. <b>Imagen 2:</b> Estructura de la 2,3-pentanodiona .....	9
<b>Imagen 3:</b> ruta metabólica de síntesis de diacetilo y otros productos secundarios. [4] [5] [6] .....	12
<b>Imagen 4:</b> Reacción de descarboxilación del ácido L-málico para obtener ácido L-láctico.[6]	14
<b>Imagen 5:</b> Catabolismo del ácido cítrico por las bacterias lácticas. [4][5][6] .....	15
<b>Imagen 6:</b> Catabolismo de la treonina. [5][12][10].....	16
<b>Imagen 7:</b> Metabolismo de la isoleucina y 2,3-pentanodiona, a partir de 2-aceto-2-hidroxi-butanoato. [4][6][12] .....	17
<b>Imagen 8:</b> Reacción de derivatización del diacetilo. DCDMQ = 6,7-dicloro-2,3-dimetilquinoxalina.[10] .....	28
<b>Imagen 9:</b> Reacción de derivatización de la 2,3-pentanodiona. DCMEQ = 6,7-dicloro-2-metil-3-etilquinoxalina.[10].....	28
<b>Imagen 10:</b> Reacción de derivatización de la 2,3-hexanodiona. DCMPQ = 6,7-dicloro-2-metil-3-propilquinoxalina. ....	29
<b>Imagen 11:</b> SCAN diacetilo, 2,3-pentanodiona, dodecano. ....	32
<b>Imagen 12:</b> Prueba SIM con dodecano como PI. ....	33
<b>Imagen 13:</b> SCAN diacetilo, 2,3-pentanodiona y 2,3-hexanodiona. ....	34
<b>Imagen 14:</b> Espectro de masas del pico 2, el correspondiente al diacetilo. ....	34
<b>Imagen 15:</b> Línea de calibrado del diacetilo. ....	35
<b>Imagen 16:</b> Línea de calibrado de la 2,3-pentanodiona.....	35
<b>Imagen 17:</b> Cromatograma del patrón 1 del calibrado. ....	37
<b>Imagen 18:</b> Cromatograma del patrón 4 del calibrado. ....	37
<b>Imagen 19:</b> Cromatograma del patrón 9 del calibrado. ....	37
<b>Imagen 20:</b> Cromatograma muestra T22SOM-A1.....	52
<b>Imagen 21:</b> Cromatograma muestra T21RD-B1. ....	52
<b>Imagen 22:</b> Cromatograma muestra T21RI-G1. ....	53
<b>Imagen 23:</b> Cromatograma muestra T22RD-R1. ....	53
<b>Imagen 24:</b> Cromatograma muestra R23LE-X1. ....	53
<b>Imagen 25:</b> Cromatograma muestra R23CYL-Z1. ....	54

### 3. Índice de tablas.

<b>Tabla 1:</b> Concentraciones medias y límites de detección del diacetilo y la 2,3-pentanodiona. ....	10
<b>Tabla 2:</b> Condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases. ....	24
<b>Tabla 3:</b> Condiciones de trabajo del AutoSampler. ....	25
<b>Tabla 4:</b> Parámetros modo SCAN y SIM.....	26
<b>Tabla 5:</b> Parámetros de agitación para la extracción mediante Agitador rotatorio programable Multi Bio RS-24.....	29
<b>Tabla 6:</b> Resultados tiempos de reacción.....	39
<b>Tabla 7:</b> Resultados prueba de agitación. ....	40
<b>Tabla 8:</b> Concentraciones de las matrices. ....	43
<b>Tabla 9:</b> Niveles de concentración de la validación de diacetilo.....	43
<b>Tabla 10:</b> Niveles de concentración para la validación de 2,3-pentanodiona.....	44
<b>Tabla 11:</b> Resumen de validación para el vino tinto. ....	46
<b>Tabla 12:</b> Resumen de validación para el vino blanco. ....	47
<b>Tabla 13:</b> Resumen de validación para el vino rosado. ....	48
<b>Tabla 14:</b> Muestras analizadas con el método analítico diseñado.....	50
<b>Tabla 15:</b> Terminología de las denominaciones de origen utilizadas.....	60
<b>Tabla 16:</b> análisis fisicoquímico de las muestras de vino tinto.....	61
<b>Tabla 17:</b> Análisis fisicoquímico de las muestras de vino rosado.....	63

#### 4. Resumen/Abstract.

Se ha llevado a cabo el diseño de un método para el análisis y cuantificación de diacetilo y 2,3-pentanodiona en muestras de vino mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC/MS).

A través de la validación de método se obtuvo que el procedimiento resultó ser apropiado para el análisis de muestras de vino tinto y rosado, mientras que para aquellas de vino blanco se tuvo que descartar, pues los valores de precisión y exactitud excedían los límites establecidos por el laboratorio.

El vino tinto en muchas muestras se sobrepasó el límite de detección aromática, pero solamente en algunos casos fue posible detectarlo olfativamente, en cambio la 2,3-pentanodiona en ningún caso llegó a sobrepasar su límite de detección.

Mediante el método diseñado será posible en un futuro controlar las composiciones de diacetilo y 2,3-pentanodiona en el vino, con el fin de disminuir sus concentraciones y poder eliminar un aspecto que en algunos casos puede ser negativo para su consumo.

It has been designed a new method for the analysis and quantification of diacetyl and 2,3-pentanodione in wine samples through gas chromatography coupled to a mass detector (GC/MS).

The method has been found suitable for the analysis of red and pink wine samples, but it had to be discarded for white wine, because the precision and accuracy values are well above the data established by the laboratory.

In many red wine samples, the diacetyl exceeded the aromatic detection limit, but it was only possible to detect it in some cases. In contrast, the 2,3-pentanedione never exceeded its detection limit.

Using this designed method, it would be possible in the future to control the compositions of diacetyl and 2,3-pentanedione in wine, in order to reduce their concentrations and be able to an aspect that in some cases may be negative for its consumption.

## 5. Agradecimientos.

Me gustaría agradecer a la empresa Dominio de Pingus S.L., por darme la oportunidad de poder realizar mi Trabajo de Fin de Grado en sus instalaciones.

Gracias a todos los integrantes de la empresa que desde el primer día me acogieron con gran amabilidad y como si fuera uno más de la plantilla, compartiendo conmigo su experiencia y saber.

Por último, agradecer especialmente a Laura, Lucía y Clara, las compañeras que más me han ayudado a la hora de realizar este estudio, y de las cuales más he podido aprender en torno al estudio químico, enológico y microbiológico. Cada día fue un reto y gracias a sus conocimientos y horas de discusión, fue posible llevar a cabo dicho estudio.

## 6. Introducción.

Desde hace miles de años el vino ha sido una de las bebidas alcohólicas más consumidas del mundo, de ahí, que en los últimos años su elaboración es cada vez más controlada y minuciosa, y por ende también su estudio.

Existen diferentes ramas de investigación en torno al vino, entre las más acusadas actualmente se puede hallar: el vino aplicado a la salud, microbiología y biotecnología enológica, análisis fisicoquímico, microoxigenación, ampelología (estudio de la biología de la vid) ...

El vino contiene más de 4000 moléculas diferentes, las cuales pueden afectar de manera positiva o negativa en la bebida. La gran mayoría de estos compuestos tienen sus precursores en las uvas, que se transformarán a través de las diferentes etapas de elaboración del vino.<sup>[1]</sup>

El siguiente estudio se centrará en el análisis químico de compuestos aromáticos del vino. A finales de los años 80 se habían identificado ya más de 800 compuestos volátiles; sin embargo, ese descubrimiento no suponía un gran progreso a la hora de describir el perfil aromático de un vino, pues no se hacía hincapié en aquellos que pudieran afectar de manera directa en los aromas. <sup>[2]</sup>

En los últimos 15 años, los avances en técnicas como la cromatografía; destacando la cromatografía de gases-olfatometría (GC-O), han permitido indagar en aquellos compuestos volátiles que son activos aromáticamente. Con los avances tecnológicos también se ha progresado de manera importante en la cuantificación de dichos compuestos, pudiendo así conocer las cantidades y los límites de detección de aquellos compuestos que afecten al aroma. <sup>[2]</sup>

Como decíamos anteriormente, los precursores de los compuestos volátiles finales se encuentran en las uvas. En función de la materia prima y el tipo de vino que se quiera producir, existen diferentes procesos de elaboración, donde es posible controlar ciertas condiciones del medio (pH, temperatura, población de levaduras o bacterias...) con el fin de obtener unos productos finales u otros que aportan diferentes sabores y aromas. <sup>[3]</sup>



Dentro de los aromas encontramos diferentes tipos: [3]

- Aromas primarios: provienen directamente de la uva, aromas frutales, vegetales o minerales.
- Aromas secundarios: provienen de los procesos de fermentación, y varían en función de las levaduras y bacterias presentes, además de condiciones como la temperatura y acidez, entre otras. Los aromas esperados son fermentativos, lácticos o amílicos.
- Aromas terciarios: aparecen tras la crianza del vino, y entre ellos pueden encontrarse, aromas a café, frutos secos, tostados...

La 2,3-butanodiona o diacetilo (como se nombrará de ahora en adelante) y la 2,3-pentanodiona, son dos compuestos que se encuentran presentes en los vinos terminados, cervezas, vinagres o en la mantequilla, y que son causantes de un aroma principalmente mantecoso, y a veces también relacionado con nueces y tostados, en función de la concentración presente. [9]

Se trata de dos compuestos orgánicos oleosos, que contienen dos grupos carbonilos (cetonas) consecutivos y una cadena hidrocarbonada. La presencia de grupos carbonilo hacen que las moléculas sean ligeramente polares, lo que será importante a la hora de diseñar el método de análisis.

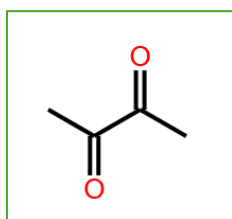


Imagen 1: Estructura del diacetilo.

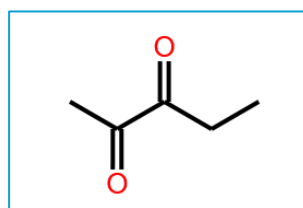


Imagen 2: Estructura de la 2,3-pentanodiona

Estos compuestos provocan aromas secundarios, es decir, se sintetizan en la etapa fermentativa, no existen de manera inicial en las uvas. La finalidad del estudio reside en la búsqueda de una manera de cuantificar estos compuestos, para poder controlar su formación en las etapas fermentativas.

Es de especial interés poder conocer las concentraciones de dichas moléculas, pues en los vinos terminados si se encuentran en **elevadas concentraciones**, se podría catalogar como un **defecto**. [4] [9]

Entre el diacetilo y la 2,3-pentanodiona, el diacetilo es el más influyente, pues contiene un límite de detección organoléptico mucho menor y siempre se encuentra en mayores concentraciones que la 2,3-pentanodiona. De aquí viene que el motivo del estudio se centre generalmente en el diacetilo.

Los límites de detección y concentración varían en función del vino que se estudie, en este caso trataremos el vino tinto. [4] [6] [10] [11] [16]

**Tabla 1:** Concentraciones medias y límites de detección del diacetilo y la 2,3-pentanodiona.

	<b>Diacetilo</b>	<b>2,3-pentanodiona</b>
<b>Concentración en vino tinto</b>	0.1-7 mg/L	~ 0.1 mg/L
<b>Límite de detección organoléptico</b>	1.5-2.5 mg/L	0.9 mg/L

Como se comentaba anteriormente se trata de moléculas producidas en las etapas de fermentación, existen dos, la fermentación alcohólica y la maloláctica; en función del tipo de elaboración hay veces que la segunda no se lleva a cabo, como en los vinos blancos y algunos rosados.

Para los vinos tintos:

- Primero sucede la fermentación alcohólica: su función principal es la transformación del azúcar de las uvas en alcohol etílico y CO<sub>2</sub>, esta reacción sucede por la acción de levaduras que provocan la glicólisis de azúcares en el citosol celular. Junto a esta reacción existen muchas otras secundarias, donde se producen diferentes compuestos, entre ellos algunos con carácter aromático: alcoholes bencílicos, ésteres, ácido sulfhídrico, acetaldehído o **compuestos carbonílicos**. [6]

Durante la glicólisis se obtiene el ácido pirúvico, que puede tomar diferentes caminos, transformarse en etanol, a través de la fermentación alcohólica; transformarse en ATP, a través de la respiración celular; o transformarse en acetaldehído y finalmente en succinato, diacetilo, 2,3-pentanodiona y otros productos, a través de la fermentación gliceropirúvica. Esta última etapa está favorecida por un medio sulfitado (muy común en la fermentación del vino) y bajas poblaciones de levaduras que no pueden realizar de manera completa la fermentación alcohólica (de especial interés a la hora de controlar la formación de estos productos). [\[4\]](#) [\[6\]](#) [\[8\]](#)

- En segundo lugar, se lleva cabo la fermentación maloláctica, que consiste en la síntesis de ácido láctico a partir de ácido málico, por acción de bacterias. Como en el caso de la fermentación alcohólica se producen gran cantidad de reacciones secundarias en las que también se formarán los compuestos carbonílicos de interés.[\[6\]](#)  
Las reacciones que se producen se tratarán más adelante en profundidad para cada analito, ya que en esta etapa es donde se producen las mayores cantidades de estos.  
[\[7\]](#)

Es necesario conocer exactamente las reacciones de síntesis de los compuestos carbonílicos, para más adelante, mediante el método diseñado, poder hacer un seguimiento continuo de los compuestos.

Cada uno de los analitos tiene una ruta metabólica distinta por ello se tratarán por separado.

### 6.1. Diacetilo:

Tiene dos procedencias, en primer lugar, se sintetiza en la fermentación alcohólica, donde a su vez se consume, y en segundo lugar se sintetiza en la fermentación maloláctica. [4]

- Fermentación alcohólica: el piruvato sintetizado en la glicólisis de azúcares reductores tiene como meta la obtención de etanol, pero existen reacciones secundarias que lo transforman en diferentes derivados.

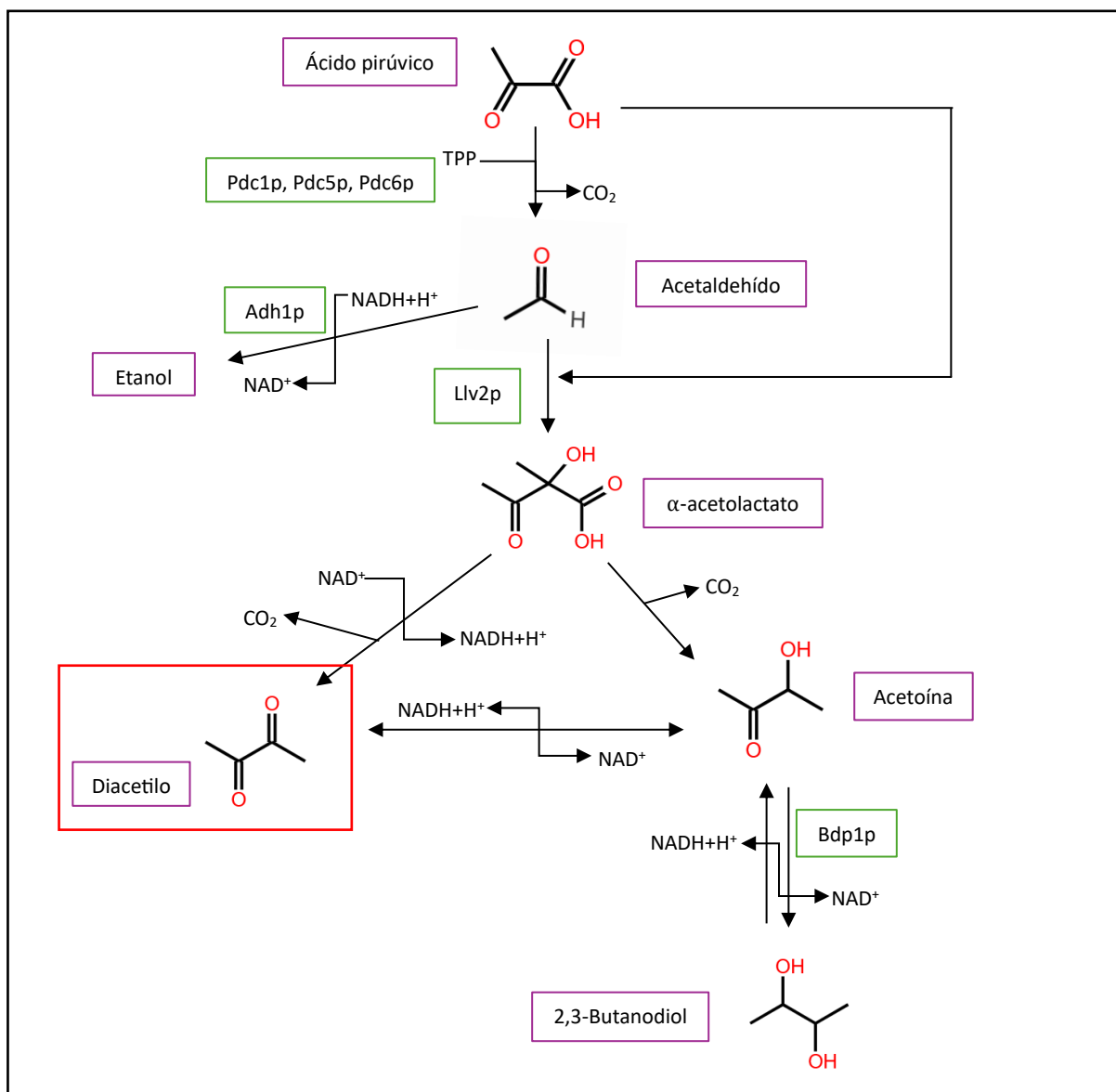


Imagen 3: ruta metabólica de síntesis de diacetilo y otros productos secundarios. [4] [5] [6]

En el esquema anterior podemos observar que el ácido pirúvico sufre una descarboxilación oxidativa, catalizada por las enzimas piruvato descarboxilasa 1 fosfato, 5 fosfato y 6 fosfato (Pdc1p, Pdc5p, Pdc6p) obteniéndose acetaldehído, que podrá tomar dos rutas diferentes.

El acetaldehído mayormente se reducirá a etanol en presencia de la enzima alcohol deshidrogenasa (Adh1p). Por otro lado, el complejo acetaldehído-TPP en unión con el ácido pirúvico del medio, podrá transformarse en presencia de la enzima acetolactasa sintasa (Llv2p) en  $\alpha$ -acetolactato. Finalmente, el  $\alpha$ -acetolactato se transformará en diacetilo mediante una descarboxilación oxidativa espontánea, además también se forma en menor cantidad acetoína por el mismo mecanismo. [9]

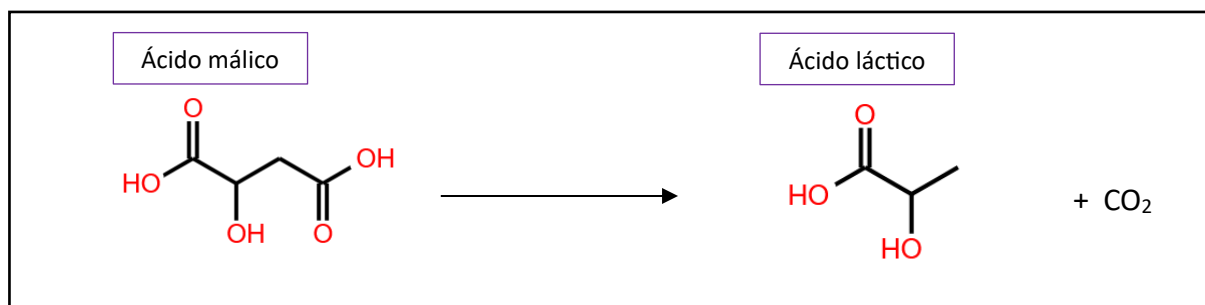
El diacetilo debido a las condiciones del medio (temperaturas de 25-30 °C) y la actuación de las levaduras se reducirá progresivamente a acetoína y finalmente a 2,3-butanodiol. Realmente se trata de un equilibrio pero que se encuentra ligeramente desplazado hacia la derecha (acetoína).

De esta ruta metabólica obtendremos solo una pequeña cantidad de diacetilo residual, puesto que la gran mayoría acaba transformándose en acetoína y 2,3-butanodiol. [9]

La formación de estos productos se ve favorecida al inicio de la fermentación por la gran cantidad de ácido pirúvico que contiene el mosto; pero también se ven favorecidos al final de la fermentación por la presencia de etanol, que actúa como un veneno para las levaduras, disminuyendo el consumo de ácido pirúvico para producir etanol y produciéndose mayores cantidades de diacetilo. Es por ello por lo que ciertos estudios se centran en la variación del diacetilo a través de la fermentación alcohólica (FA), y puede observarse cómo en el inicio de la FA se obtienen altas concentraciones, que disminuyen durante la fermentación al transformarse el diacetilo en acetoína y 2,3-butanodiol, y al final de la fermentación se obtiene otro pico de incremento de diacetilo, que vuelve a disminuir en los días siguientes al fin de la fermentación, por la misma transformación anterior. [10]

Aparte de la síntesis mediante la acción de levaduras, la mayor cantidad de diacetilo es sintetizada en la fermentación maloláctica, debido al metabolismo del ácido cítrico por las bacterias lácticas. [6]

La fermentación maloláctica no es una verdadera fermentación, sino una reducción del ácido L-málico en ácido L-láctico. Se trata de una descarboxilación directa:



**Imagen 4:** Reacción de descarboxilación del ácido L-málico para obtener ácido L-láctico.[6]

Inicialmente se propuso un mecanismo de varias reacciones enzimáticas; donde el ácido málico en presencia de un enzima malato deshidrogenasa pasaba a oxalacetato y finalmente a piruvato por descarboxilación; o el ácido málico podía transformarse directamente en piruvato por la acción de una enzima málica. Este mecanismo se rechazó más adelante; pues faltaría una reacción de reducción del piruvato a L-lactato en presencia de una enzima lactato deshidrogenasa (L-LDH); tras varios experimentos se obtuvo que las bacterias lácticas presentes en el vino únicamente contenían una enzima lactato deshidrogenasa (D-LDH), y se obtendría así D-lactato. [4]

Hoy en día el mecanismo que se conoce es la descarboxilación directa del L-malato en L-lactato, en presencia de la conocida como enzima málica que fue purificada por primera vez en la bacteria *Lactobacillus plantarum*. [4]

Los mostos contienen diferentes tipos de bacterias lácticas que contribuyen a la fermentación maloláctica; *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus* y las más contribuyentes las *Oenococcus oeni*.

Las *Oenococcus oeni* se describen como bacterias Grampositivo que pueden aparecer como pares o cadenas. Crecen en ambientes de pH ácidos y a temperaturas de 18-20°C, es decir las condiciones de un mosto tras la fermentación alcohólica, además es capaz de resistir un porcentaje mayor al 10% de etanol, algo que otras bacterias y levaduras no soportan. [9]

Durante la fermentación maloláctica las bacterias también metabolizan otros compuestos como azúcares, aminoácidos, proteínas y otros ácidos, como el ácido cítrico, principal precursor del diacetilo.

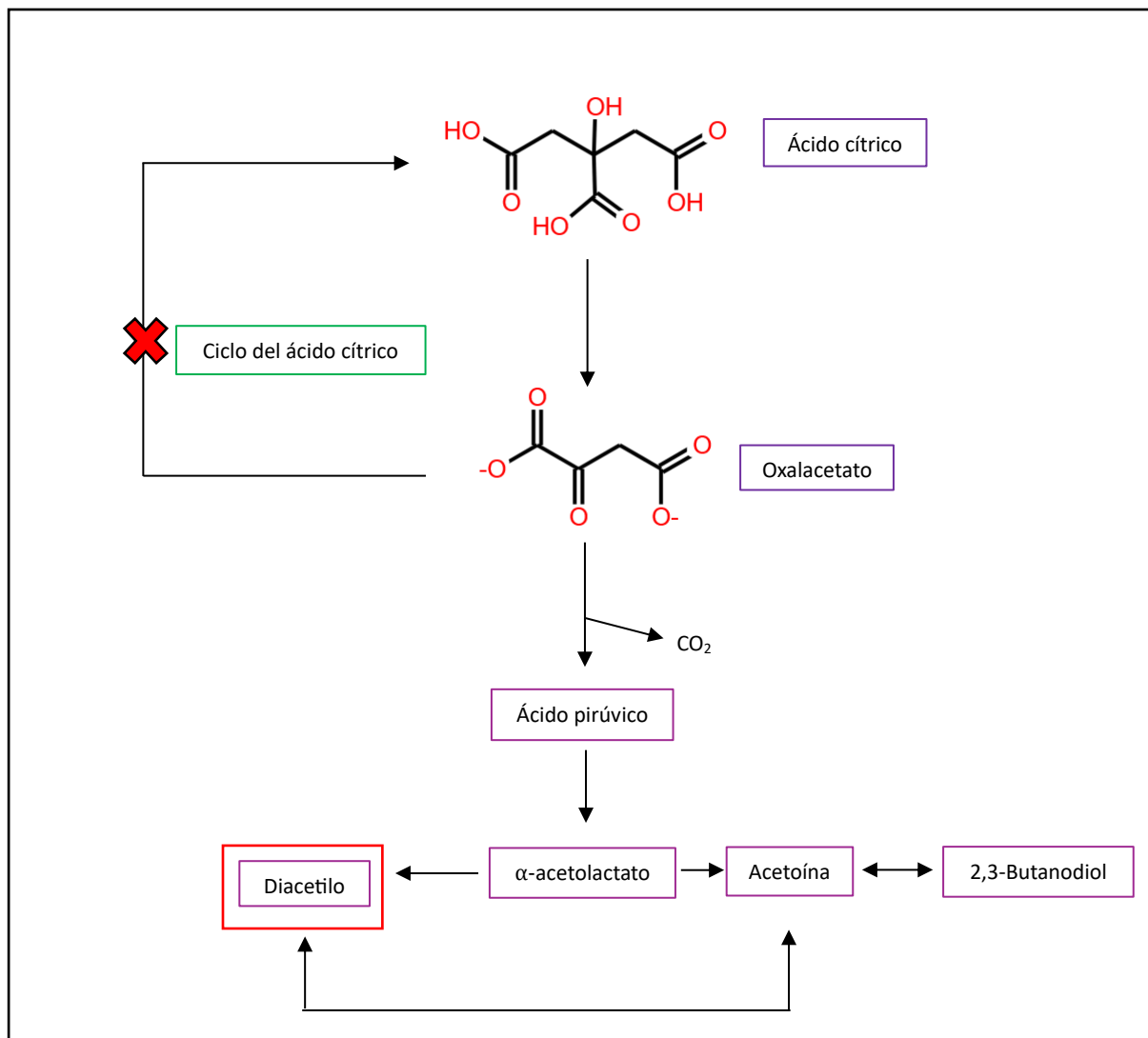


Imagen 5: Catabolismo del ácido cítrico por las bacterias lácticas. [4][5][6]

El ácido cítrico se transforma en oxalacetato a través del ciclo del ácido cítrico en el interior de las bacterias, pero el ciclo no se cierra y el oxalacetato en vez de volver a transformarse en ácido cítrico se descarboxila, obteniéndose piruvato. A partir de aquí el piruvato sigue la misma ruta indicada en la "Imagen 3", y se transforma en diacetilo, acetoina y 2,3-butanodiol. La gran diferencia con la fermentación alcohólica radica en que en este caso el equilibrio entre la acetoina y el diacetilo se desplaza hacia la izquierda (diacetilo); donde el diacetilo por las

condiciones del medio (temperaturas de 18-20 °C y pH ligeramente ácido) acabará siendo estable en el vino, y no sufrirá más transformaciones. [4] [9] [13]

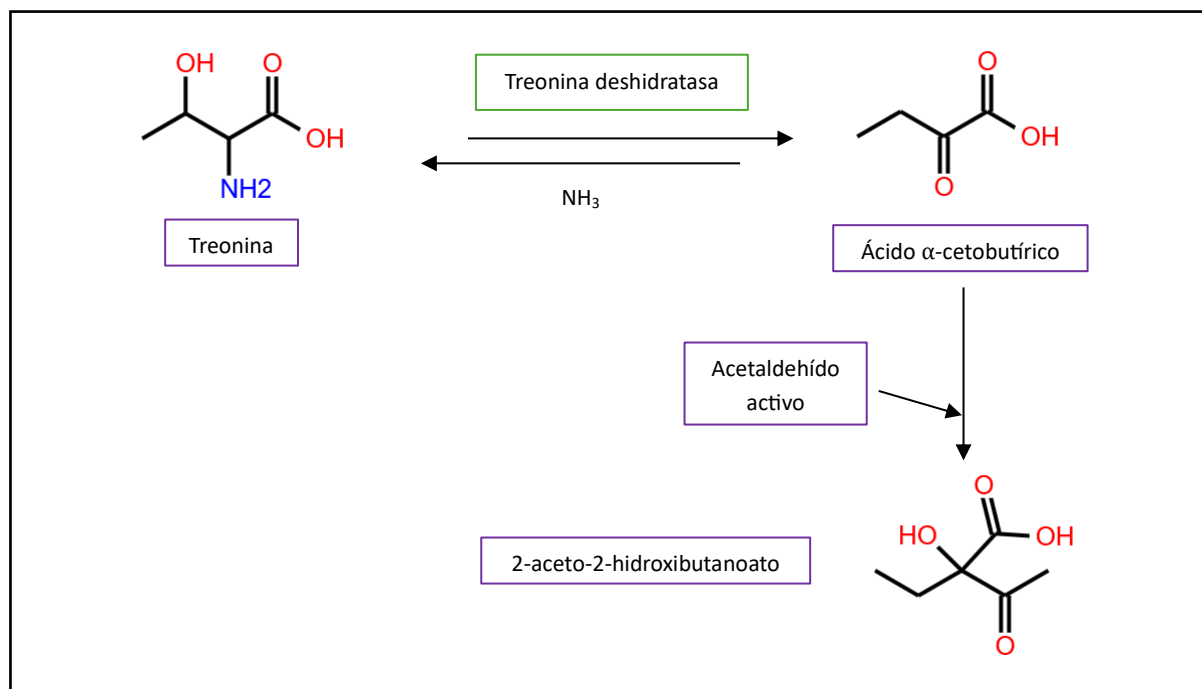
Es así como a través de las dos fermentaciones principales del vino tinto, se obtiene todo el diacetilo que contendrá finalmente el vino terminado.

### **6.2. 2,3-Pentanodiona:**

Este compuesto es también como el diacetilo un producto secundario del metabolismo de las bacterias lácticas. No tiene ninguna relación conocida con las fermentaciones, y debido a su baja concentración en vinos y su elevado límite de detección organoléptico, pasa a un plano secundario en comparación con el diacetilo.

Según [10], la 2,3-pentanodiona proviene de un precursor conocido como ácido  $\alpha$ -acetohidroxibutírico (también 2-aceto-2-hidroxi-butanoato). Este compuesto no se encuentra en las uvas de forma natural. Analizando diferentes rutas metabólicas, se trata de un intermedio que se genera en el metabolismo de aminoácidos, más en concreto, de la treonina.

La 2,3-pentanodiona se considera un producto secundario porque el destino final del metabolismo de treonina por las bacterias lácticas es realmente, la síntesis de otro aminoácido, la isoleucina. [12]



**Imagen 6:** Catabolismo de la treonina. [5][12][10]



La treonina se cataboliza en el interior de las levaduras, inicialmente sufre una desaminación y se transforma en su equivalente ácido cetónico, el ácido  $\alpha$ -cetobutírico. El grupo ácido protagoniza una transposición por acción del acetaldehído activo y se obtiene el 2-aceto-2-hidroxi-2-butanato. [12]

A partir de aquí se pueden seguir dos caminos; el principal, la síntesis de isoleucina, y el secundario, la síntesis de 2,3-pentanodiona. [4] [12]

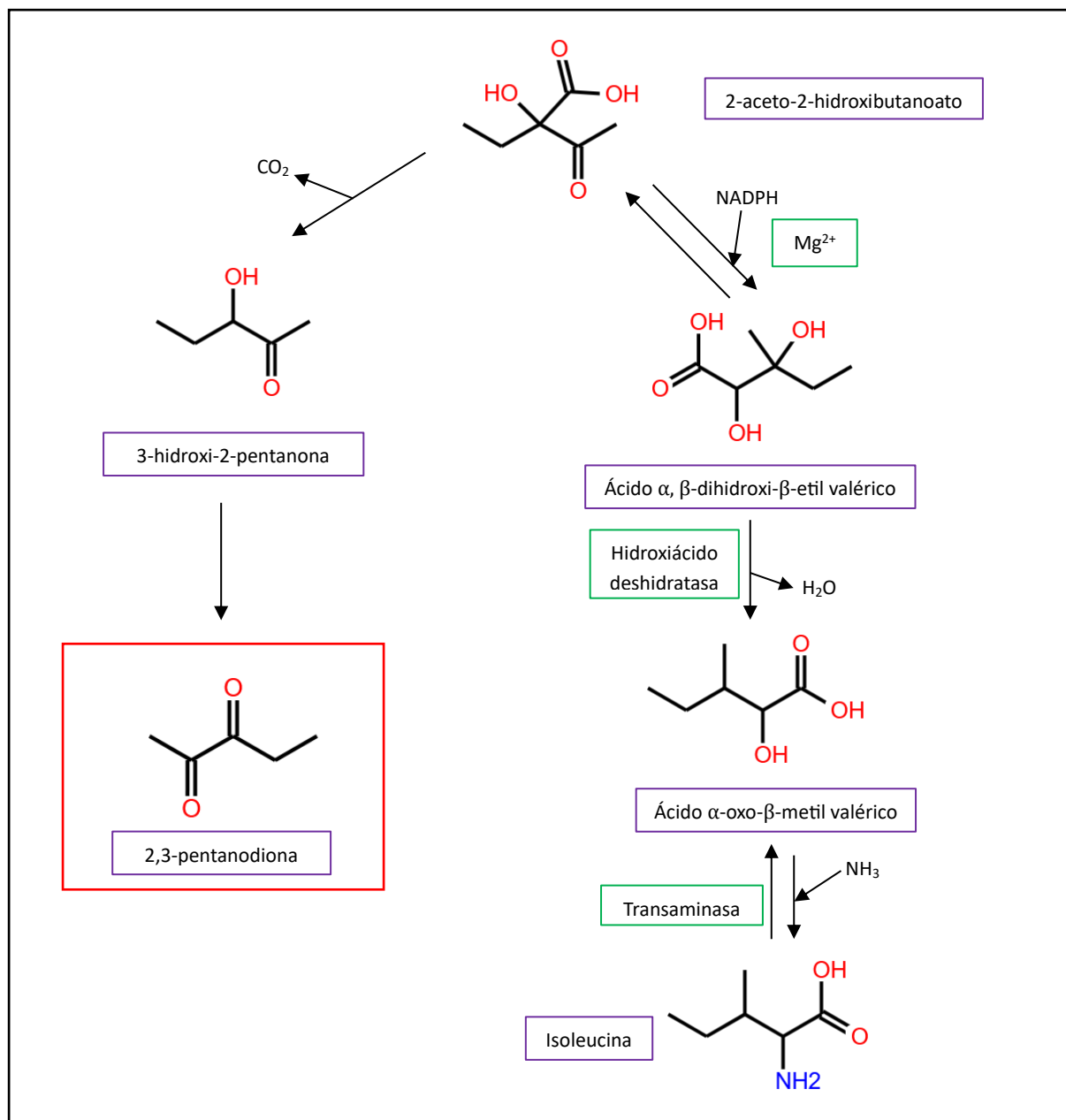


Imagen 7: Metabolismo de la isoleucina y 2,3-pentanodiona, a partir de 2-aceto-2-hidroxi-2-butanato. [4][6][12]

El 2-aceto-2-hidroxi-3-pentanona se transforma en isoleucina tras varias reacciones enzimáticas. [\[12\]](#)

Para sintetizar la 2,3-pentanodiona, el ácido sufre una descarboxilación, obteniéndose 3-hidroxi-2-pentanona, que se oxidará para formar finalmente la dicetona de interés. [\[4\]](#) [\[6\]](#)

Puesto que la 2,3-pentanodiona es un compuesto de menor interés, se estudia en menor medida frente a otros compuestos. La bibliografía experimental se reduce a que, como se trata de un compuesto muy similar al diacetilo, se pueden analizar de manera simultánea normalmente. Como se pretendía analizar diacetilo, también se incluyó en la determinación, puesto que ya se había comprado y para poder aprovecharlo y hacer una cuantificación múltiple.

## 7. Antecedentes bibliográficos.

Como ya se ha comentado estos compuestos se encuentran en diferentes tipos de muestras, es decir, con diferentes matrices, generalmente complejas. La elección de la técnica analítica dependerá de los niveles de concentración del analito, el tratamiento necesario para acondicionar la muestra y en este caso en concreto de los instrumentos a disposición.

Las técnicas que se han podido hallar para este tipo de análisis son:

- Espectrofotometría UV-visible: consiste en la lectura de absorbancia de un producto incoloro formado con 1,2-fenildiamina y que se mide a 335nm en cubeta de cuarzo. También puede ejecutarse con reacción con naftol que formará un producto violeta que se mide a 530nm. El inconveniente se encuentra en que no es posible cuantificar los compuestos por separado, sino que se miden conjuntos, por tanto, no se conocerá la cantidad presente de cada uno. Se trata de un método sencillo y de bajo coste. [25]
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-UV): se llevó a cabo la derivatización con OPDA, que forma un compuesto detectable mediante un detector de ultravioleta. Para la separación se utiliza una columna ODS2 Waters spherisorb, como solvente metanol (100%) y como fase móvil una mezcla de agua/ácido acético (100/0.05 V/V). Conlleva un pretratamiento de muestra de hasta 4 horas por lo cual fue descartado. Se trata de un método sencillo, pero de larga duración. [18]
- Cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (GC-MS): formación de un producto con 4,5-dicloro-o-fenildiamina, además se lleva a cabo la oxidación de los precursores del diacetilo y la 2,3-pentanodiona para calcular el contenido total de estos que podría llegar a formarse durante las etapas fermentativas. Se llevó a cabo mediante una columna DB-5MS de Agilent Technologies utilizando helio como gas portador, la separación se produjo a través de un programa de temperatura entre 70°C y 270°C. Dentro de la dificultad del manejo de un cromatógrafo, se trata de un método no muy complejo, pero de elevado coste. [10]
- Cromatografía de gases acoplado a un detector termoiónico (GC-FID): se trata de un método muy similar al anterior, en este caso se realiza una derivatización con 1,2-diaminobenceno, y se indica que es necesario un tiempo de espera de hasta 3 horas. El análisis se lleva a cabo con una columna medianamente polar BP21, con helio como

gas portador y mediante un programa de temperatura. Se trata de un método sencillo, pero de larga duración, además no se disponía del detector FID, por lo cual fue descartado. [21]

- Extracción en fase sólida/GC-MS (SPE/GC-MS): debe comentarse que se trata de un estudio un tanto diferente, pues se aplica también a aldehídos, para ello se realiza la derivatización con PFBHA que dura 12 horas, tras esto se lleva a cabo una extracción en fase sólida con cartuchos de resina LiChrolut EN y posteriormente en análisis mediante cromatografía de gases con columna DB-WAXetr, programa de temperatura controlada y helio como gas portador. Se descartó por la falta del material SPE además de por el elevado tiempo de análisis que comprendería cada muestra. [22]
- Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza-GC-MS (HS-SPME-GC-MS): se llevó a cabo el experimento mediante cromatografía de gases, pero anteriormente se aplica una microextracción en fase sólida (SPME) en espacio de cabeza (HS), para ello se utilizan fibras recubiertas de poli-dimetilsiloxano y Carbowax-diciniibenceno de *Supelco*, las muestras se expusieron durante 5 minutos a calentamiento y el gas extraído se analizó por cromatografía de gases con una columna CP-WAX 57 CB, programa de temperatura hasta 180°C y helio como gas portador. Con el cromatógrafo del que se disponía era posible llevar a cabo el método descrito, pero se descartó por el desconocimiento de la técnica y la falta de las fibras SPME. [23]
- Cromatografía de gases-olfatometría (GC-O): es una técnica expresamente diseñada para detectar y cuantificar los compuestos aromáticos. Se trata de un detector de masas o termoiónico acoplado al cromatógrafo para cuantificar las especies, junto con un detector humano, la nariz. Combina las capacidades de la instrumentación con el criterio humano, que en unos casos puede ser beneficioso o perjudicial. Se descartó por la falta de material. [24]

En vista de la breve descripción de los métodos empleados hoy en día para el análisis se escogió la cromatografía de gases acoplada a detector de masas, en primer lugar, porque es uno de los instrumentos que se disponía en el laboratorio; en segundo lugar, porque la bibliografía encontrada era más extensa y sería posible desarrollar un método de manera más

sencilla; y por último, porque también se disponía de todo el material necesario para llevar a cabo el análisis, exceptuando ciertos reactivos. Además, la bibliografía encontrada daba a entender que se podían llevar a cabo métodos de cortos periodos de tiempo.

## 8. Objetivos.

Con el fin de poder cuantificar diacetilo y 2,3-pentanodiona durante todo el proceso de elaboración del vino, se siguieron los siguientes pasos:

- Buscar estudios previos similares para la elaboración de un método válido para muestras de vino.
- Desarrollar y optimizar un método mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de masas.
- Validar el método de análisis diseñado mediante los parámetros de interés para el laboratorio.
- Analizar muestras de vino terminado, es decir, que hayan pasado las etapas fermentativas.
- Analizar muestras de vino durante todo el proceso de elaboración.

## 9. Materiales.

### **9.1. Reactivos:**

- 2,3-Butanodiona 97%; *Sigma-Aldrich* (CAS 431-03-8).
- Dodecano 99%; *Thermo Fisher Scientific* (CAS 112-40-3).
- 2,3-Pentanodiona 97%; *Thermo Fisher Scientific* (CAS-600-14-6).
- 2,3-Hexanodiona 94%; *Thermo Fisher Scientific* (CAS 3848-24-6).
- 4,5-dicloro-o-fenildiamina (DCDB) 98%; *Thermo Fisher Scientific* (CAS 5348-42-5).
- EtOH 96%; *Scharlau* (CAS 64-17-5).
- Tolueno 99.8%; *Scharlau* (CAS 108-88-03).
- HCl 37%; *Scharlau* (CAS 7647-01-0).
- Gas portador Helio  $\geq 99.9999\%$ ; *Air Liquide*.
- Agua destilada; Sistema de purificación Direct-Q 3 UV.

### **9.2. Instrumentación:**

- Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A GC Systems (G3440A).
- Columna HP 5-MS (5% fenilmetilpolisiloxano).
- Detector de masas Agilent Technologies 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector (G3171A).
- Muestreador automático Agilent Technologies GC Sampler 120.
- MSD ChemStation Data Analysis.
- Agitador rotatorio programable Multi Bio RS-24.
- Centrífuga Bunsen Hemo.
- pH-metro Metrohm AG 809 Titrando.
- Placa calefactora.
- Balanza analítica Kern & Sohn GmbH ABS 120-4.

## 10. Optimización del método:

Como gas portador (fase móvil) se utiliza helio, que entra al cromatógrafo a través de un controlador de flujo. Por otro lado, la muestra (líquida) se inyecta automáticamente gracias al AutoSampler que contiene el cromatógrafo. La muestra pasa a la cámara de vaporización que se encuentra a 250 °C, donde la muestra pasa de líquido a gas, y en modo Splitless junto con el gas portador, entra a la columna.

La columna es el lugar donde se produce la separación de los compuestos. Se trata de una columna capilar HP-5-MS (5%-fenil)-metilpolisiloxano de 30 metros, donde el relleno es apolar, por tanto, los componentes apolares serán más retenidos que los polares. La columna se encuentra en el interior de un horno, donde la temperatura varía a través del tiempo, es decir, se utilizó un programa de temperatura variable.

Tras un periodo de 17 minutos los compuestos son separados completamente y a sus determinados tiempos de retención llegan al detector. En este caso se usó un detector de espectrometría de masas.

Las condiciones de trabajo se obtuvieron de la unión de diferentes estudios, si bien ciertos valores debieron ser ligeramente cambiados a la hora de poner a punto el método. [\[15\]](#) [\[16\]](#) [\[20\]](#)

**Tabla 2:** Condiciones de trabajo del cromatógrafo de gases.

Gas portador	Helio
Flujo de gas portador	1 mL/min
Modo de inyección	Splitless
Volumen de inyección	1 µL
Temperatura de inyección	250 °C
Presión de inyección	8.8085 psi



Dimensiones de la columna	30 m * 0.25 mm * 0.25 $\mu$ m
Velocidad media en la columna	36.796 cm/s
Presión de la columna	8.8085-19.870 psi
Temperatura inicial del horno	70 °C
Programa de temperatura controlada	a) 70-200 °C, 25 °C/min b) 200-270 °C, 10 °C/min
Temperatura máxima del horno	270 °C
Temperatura en el PostRun	50 °C
Thermal Aux 2	250 °C
Temperatura del detector	250 °C
Duración total del análisis	16.7 min

**Tabla 3:** Condiciones de trabajo del AutoSampler.

Air Volume	0 $\mu$ L
Cleaning Volume	2 $\mu$ L
Pre Clean with Solvent 1	5
Pre Clean with Solvent 2	0
Pre Clean with Sample	3
Filling Speed	2 $\mu$ L
Filling Strokes	0
Inject to	Inyector frontal (1)
Injection Speed	50 $\mu$ L/s

Pre Inject Delay	500 ms
Post Inject Delay	500 ms
Post Clean with Solvent 1	0
Post Clean with Solvent 2	5

**Tabla 4:** Parámetros modo SCAN y SIM.

	<b>iones</b>	<b>Dwell</b>	<b>Tiempo de retención (min)</b>
<b>SCAN</b>	Desde 45 a 300		
<b>SIM</b>			
<b>Diacetilo</b>	226, 185, 144, 109, 74	100	8.8-9.0
<b>2,3-Pentanodiona</b>	240, 185, 144, 109, 74	100	9.4-9.6
<b>Dodecano</b>	170, 85, 71, 57	100	No determinado
<b>2,3-Hexanodiona</b>	254, 185, 144, 109, 74	100	10-10.1

## 11. Procedimiento experimental.

La mayoría de la bibliografía encontrada se aplica a muestras de cerveza, como el vino y la cerveza son dos bebidas de matriz similar en ciertos aspectos, los métodos encontrados para muestras de cerveza podrían servir en cierta medida para muestras vínicas, por ello el estudio se encaminó en esa dirección.

Como técnica de análisis se eligió la cromatografía de gases, ya que los analitos de interés se encuentran en los aromas de ciertos alimentos, es decir, son compuestos relativamente volátiles.

El diacetilo y la 2,3-pentanodiona, contienen ambos dos grupos carbonilo que las aportan cierto carácter polar. La columna de la que se disponía HP 5-MS tiene carácter apolar es por ello por lo que debía buscarse la manera de reducir la polaridad de los analitos de interés para obtener así una buena separación y cuantificación. Además, también debía tenerse en cuenta que los compuestos son bastante volátiles:

- Punto de ebullición de la 2,3-butanodiona: 81 °C.
- Punto de ebullición de la 2,3-pentanodiona: 110-112 °C.

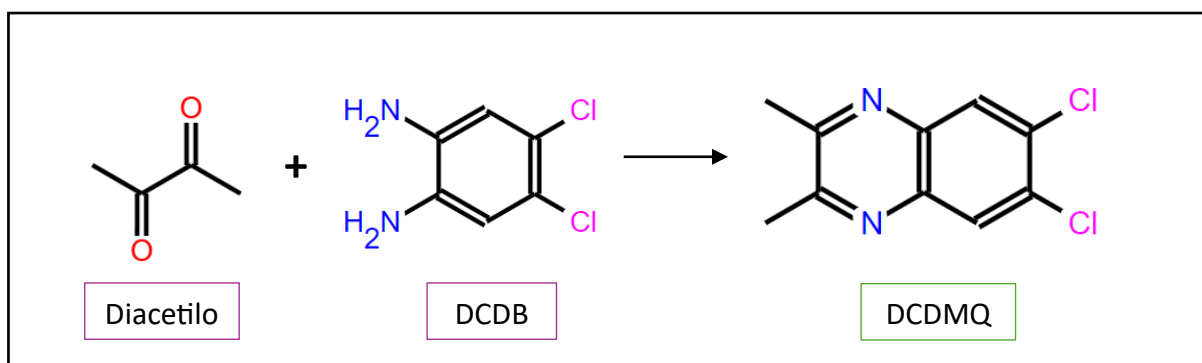
### **11.1. Muestras de vino terminado o en fermentación maloláctica:**

#### Derivatización:

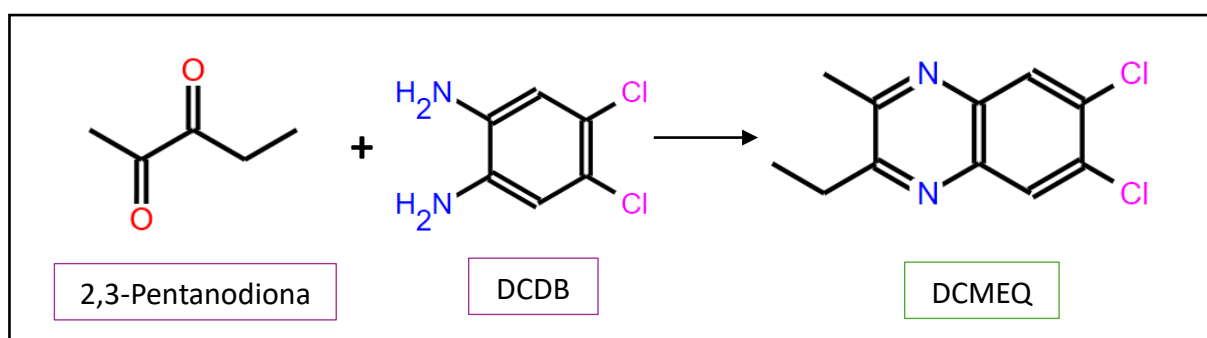
Mediante una derivatización estos dos aspectos se ven resueltos, la polaridad disminuye o aumenta al formarse un producto y la temperatura de ebullición podrá disminuir o aumentar también, en función de los reactivos empleados, en este caso se empleó DCDB (4,5-dicloro-*o*-fenildiamina), que provoca un descenso de la polaridad y un aumento en el punto de fusión.

[10] [15] [16]

Para llevar a cabo la reacción debe disponerse de una muestra de vino de la cual se toman 5 ml, que se añade en un tubo de análisis de 20 mL. Sobre la muestra se añaden 0.5 mL de disolución 20 mM de DCDB en ácido clorhídrico 1 M. La mezcla debe calentarse durante 15 minutos en un baño de agua de entre 30-35 °C. Tras este tiempo la reacción de derivatización está concluida y se crean dos compuestos de estructura similar:



**Imagen 8:** Reacción de derivatización del diacetilo. DCDMQ = 6,7-dicloro-2,3-dimetilquinoxalina.[10]

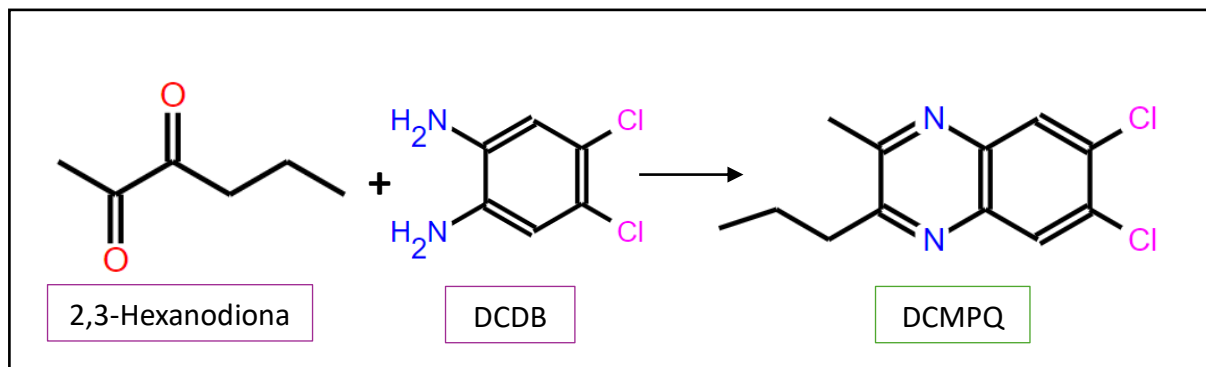


**Imagen 9:** Reacción de derivatización de la 2,3-pentanodiona. DCMEQ = 6,7-dicloro-2-metil-3-etilquinoxalina.[10]

Para cuantificar adecuadamente cuando se trabaja con espectrometría de masas, los mejores resultados se obtienen habitualmente mediante el uso de patrones internos.[14]

En este caso, se comenzó el estudio utilizando como patrón interno el dodecano, el cuál sería sustituido más adelante por 2,3-hexanodiona, que tiene una estructura prácticamente igual a la de los analitos. Las razones del descarte del dodecano se tratarán más adelante en el apartado de Resultados y discusión.

El patrón interno debe añadirse antes de la reacción de derivatización, pues reaccionará de igual manera que los analitos de interés con el derivatizante. Para el desarrollo del estudio se añaden en cada muestra 25  $\mu$ L de disolución de 100 mg/L de 2,3-hexanodiona en EtOH/H<sub>2</sub>O 10% (la mezcla EtOH/H<sub>2</sub>O 10%, simula sencillamente una matriz de vino teniendo en cuenta solamente el porcentaje alcohólico de este).



**Imagen 10:** Reacción de derivatización de la 2,3-hexanodiona. DCMPQ = 6,7-dicloro-2-metil-3-propilquinoxalina.

### Extracción simple:

Tras la reacción de derivatización los tubos de análisis se enfrían con agua del grifo y tras esto se les añaden 2 ml de tolueno. Se trata de una extracción simple sin necesidad de añadir reactivos que faciliten la separación.

Los tubos de análisis se agitan mediante un agitador rotatorio con los siguientes parámetros:

**Tabla 5:** Parámetros de agitación para la extracción mediante Agitador rotatorio programable Multi Bio RS-24.

<b>Velocidad</b>	100
<b>Rev. por minuto</b>	3
<b>Oscilación</b>	30°
<b>Tiempo (minutos)</b>	5

Una vez concluida la extracción se podrá observar que se forma una emulsión que es posible separar mediante centrifugado, para ello se emplea un programa de 10 minutos a 5000 rpm, y al finalizar se podrá observar cómo ambas fases están perfectamente separadas.

### Análisis mediante cromatografía de gases:

Con una micropipeta se toman entre 800-1000 uL del sobrenadante de la separación y se meten en un vial de cromatografía de 2 mL para proceder al análisis.

Para el análisis se introduce el método diseñado con los parámetros definidos anteriormente en la “tabla 2”, y se pone en marcha el análisis.

Tras alrededor de 20 minutos el análisis está completado y con ayuda del método de lectura MSD ChemStation Data Analysis y la línea de calibración diseñada se obtienen los valores cuantitativos de los analitos.

### **11.2. Muestras de vino en fermentación alcohólica:**

Cuando se trata de muestras que se encuentran en la fase de fermentación alcohólica, debe tenerse en cuenta que las muestras se encuentran en una etapa donde existe una gran variación de muchos de los compuestos presentes, donde lo más destacable podría ser la transformación de azúcares en etanol.

Para poder conocer las composiciones de diacetilo y 2,3-pentanodiona en momentos exactos durante la fermentación, se deberá detener la fermentación en las muestras tomadas, para ello la muestra debe congelarse por lo menos a -2°C [15], se consigue así detener las funciones de las levaduras presentes en el vino.

Tras la congelación se dejará la muestra regresar a estado líquido y se meterá en una centrífuga en un programa de 5 minutos a 5000 rpm, para conseguir depositar en el fondo de los tubos de análisis las partículas que se encuentran en suspensión, como pueden ser trozos de hollejos, porciones de pulpa u otros cuerpos sólidos que interferirían en el resto del análisis, además también se elimina parte del gas CO<sub>2</sub> que también se encuentra en las muestras. [17]

Tras estos dos pasos el resto del análisis tiene el mismo proceder que anteriormente para las muestras de vino terminado o en fermentación maloláctica.

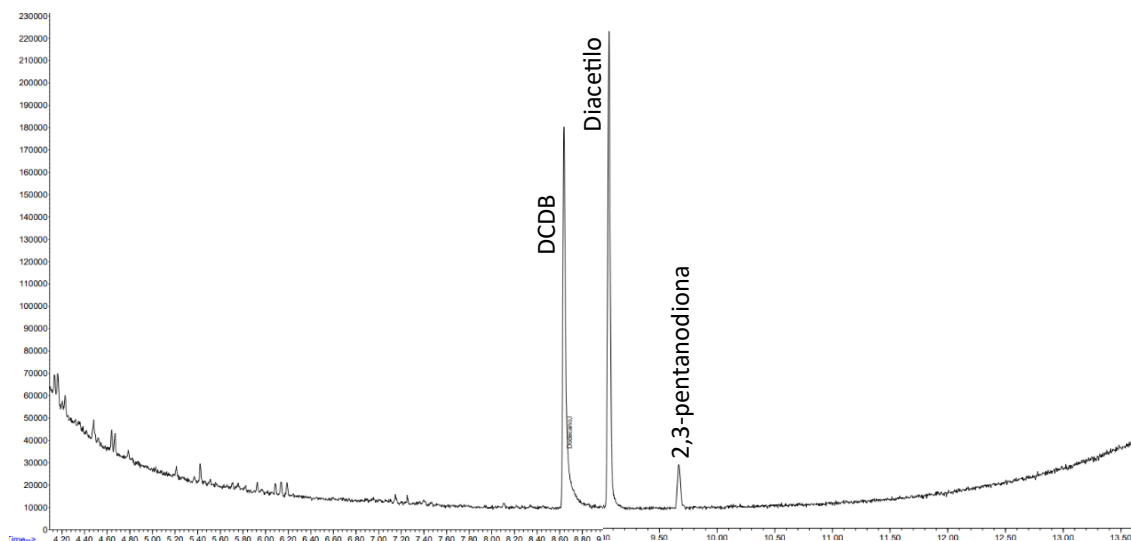
Debido a que el estudio fue realizado entre abril y julio, es decir, fuera del periodo de fermentaciones (en España), no se pudo disponer de muestras que estuvieran en etapa de fermentación alcohólica, y debe tenerse en cuenta que la preparación de muestra expuesta es puramente teórica, diseñada a partir de los conocimientos proporcionados por el personal del laboratorio y de ciertos estudios. [\[10\]](#)

Conocido el proceso de análisis diseñado a partir de otros estudios similares y de diferentes pruebas realizadas durante el periodo del estudio, pasaremos al tratamiento de los datos que han ayudado a desarrollar el procedimiento experimental comentado hasta ahora.

## 12. Resultados y discusión.

Como el objetivo consiste en cuantificar los analitos, lo primero que debía hacerse era diseñar una línea de calibrado sobre la que poder cuantificar. Como no se dispone de materiales de referencia conocidos, para poder realizar la línea de calibrado se utilizaron patrones de los compuestos a analizar disueltos en una matriz de H<sub>2</sub>O/EtOH al 10%, simulando de manera sencilla una matriz vínica donde solo se tenía en cuenta el porcentaje alcohólico.

A través de los diferentes artículos utilizados se pudieron determinar unas condiciones iniciales de trabajo para el cromatógrafo y se hizo un barrido en modo SCAN de una muestra de 0.5 mg/L de diacetilo, 0.5 mg/L de 2,3-pentanodiona y 1 mg/L de dodecano (PI).



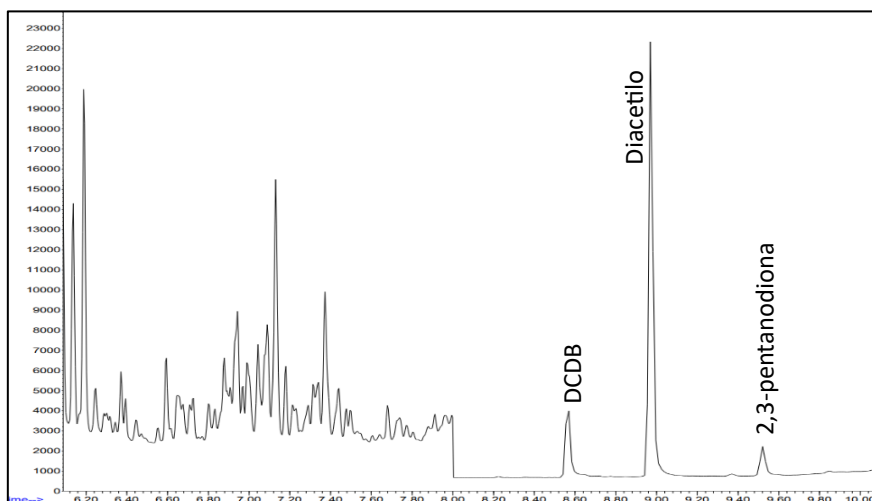
**Imagen 11:** SCAN diacetilo, 2,3-pentanodiona, dodecano.

Se obtuvo el cromatograma anterior donde se identificaron dos picos, el del diacetilo en el minuto 9-9.2, el de la 2,3-pentanodiona en el minuto 9.6-9.8. El pico en el minuto 8.6-8.8 en un principio se creyó que pertenecía al dodecano, pero se trataba de un error, pertenecía realmente al derivatizante, el DCDB.

Según [15] el dodecano presentaría un pico entre el minuto 4 y el 6, tras diferentes pruebas variando el gradiente de temperatura y el modo de inyección junto con el tiempo de inicio de la detección, no fue posible obtener un pico totalmente resuelto del dodecano, sino que se



obtenían picos conjuntos, donde no podía obtenerse una señal concreta para el dodecano y usarlo, así como patrón interno.



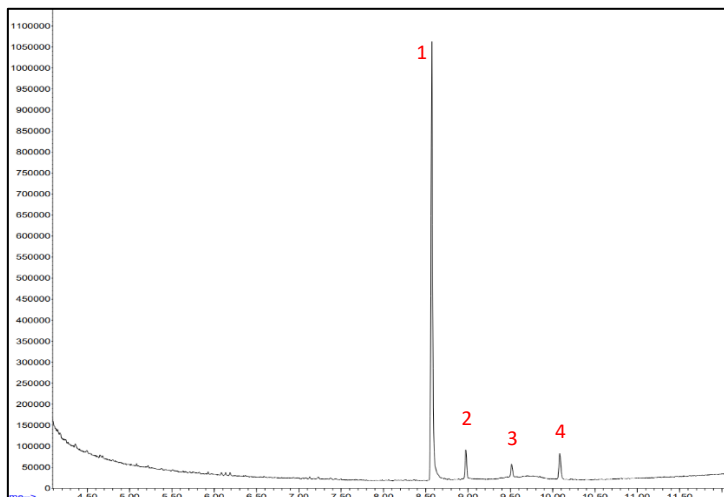
**Imagen 12:** Prueba SIM con dodecano como PI.

Como puede observarse en los primeros minutos se obtiene un cúmulo de picos pertenecientes al disolvente y entre ellos también se encuentra el del dodecano, que pudo identificarse a través de los iones en el minuto 7.2, pero también sus iones podían apreciarse en otros tiempos anteriores y posteriores, por ello se indicaba anteriormente en la [tabla 4](#) que el tiempo de retención no fue posible determinarlo. No fue posible optimizar la lectura para obtener picos resueltos, a pesar de que se efectuaron varias medidas, las respuestas eran muy dispares, de manera que no podían obtenerse resultados reproducibles para muestras iguales.

Se determinó así que el dodecano no servía como patrón interno para el análisis que quería llevarse a cabo. Para sustituirlo se buscó un compuesto que no se encuentra en el vino y que además tiene mayor similitud estructural con los compuestos de interés, se trata de la 2,3-hexanodiona. [\[18\]](#)

Ahora el patrón interno reaccionaría de igual manera que los analitos de interés con el derivatizante, por ellos debía añadirse sobre la muestra antes de llevar a cabo la reacción de derivatización.

Se realizó un barrido en SCAN y se obtuvo el siguiente cromatograma:

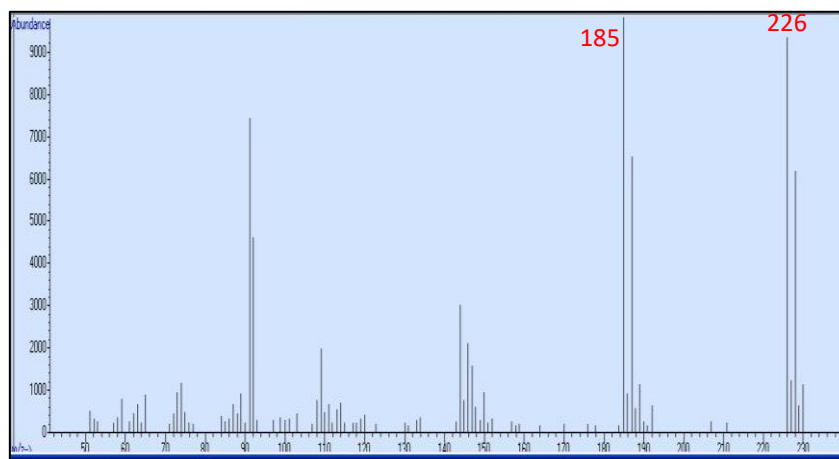


**Imagen 13:** SCAN diacetilo, 2,3-pentanodiona y 2,3-hexanodiona.

Se identificaron en este caso cuatro picos con ayuda de los iones:

1. DCDB a un tiempo de retención de 8.55 min.
2. Diacetilo a un tiempo de retención de 8.97 min.
3. 2,3-pentanodiona a un tiempo de retención de 9.51 min.
4. 2,3-hexanodiona a un tiempo de retención de 10.08 min.

Un ejemplo de los iones observados sería el siguiente para el pico 2:



**Imagen 14:** Espectro de masas del pico 2, el correspondiente al diacetilo.

Una vez encontrado un patrón interno sobre el cuál trabajar se pasó a diseñar una línea de calibrado con la que poder cuantificar los compuestos de interés. Se propuso un intervalo de trabajo entre 15 µg/L y 1000 µg/L y se prepararon 8 patrones de ambos compuestos.

Los patrones fueron preparados a partir de una disolución madre de 100 mg/L de cada compuesto.

Tras el análisis de los patrones se obtuvieron las señales con las que se hizo una regresión lineal; donde el eje “y” corresponde a la señal del analito partido de la señal del PI y el eje “x” corresponde a la concentración de analito partido de la concentración de PI.

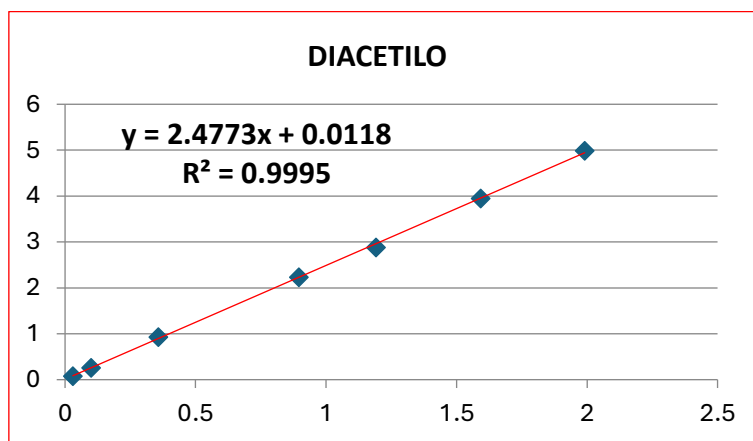


Imagen 15: Línea de calibrado del diacetilo.

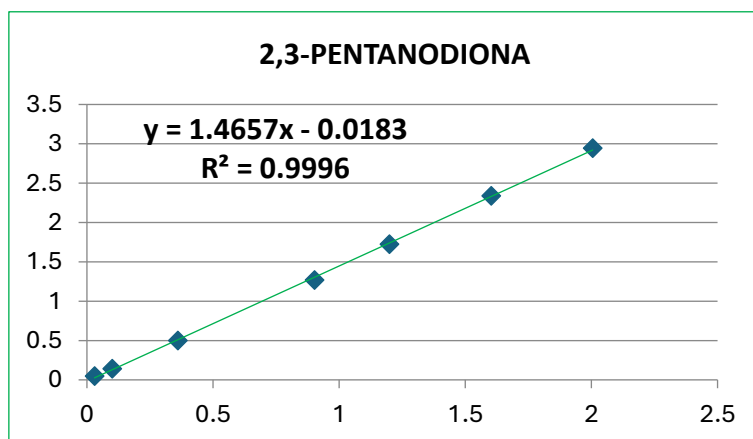


Imagen 16: Línea de calibrado de la 2,3-pentanodiona.

Cabe destacar que para obtener las líneas de calibrado anteriores se hicieron varias pruebas con los diferentes iones que se obtenían para cada analito. Inicialmente las detecciones contenían todos los iones que se indicaban en la [tabla 4](#), se observó que al utilizar tantos iones debía de establecerse en el equipo de lectura las proporciones de cada ion que se obtenían,

pero en cada patrón o muestra analizada nunca se obtenían dos proporciones iguales para cada ion, obteniéndose para muestras iguales diferentes valores de las señales.

Para solucionar esto se realizaron pruebas con los iones más abundantes de cada analito y los iones moleculares, que serían:

- Diacetilo: 227 (ion molecular), 226 y 185.
- 2,3-pentanodiona: 241 (ion molecular), 240 y 185.
- 2,3-hexanodiona: 255 (ion molecular), 254 y 228.

Los mejores resultados se obtenían en el modo Target Ion utilizando los iones 226, 240 y 228 para los analitos en el orden citados. Pero en el programa de análisis se implementaron también los iones moleculares de cada compuesto, para que si en algún caso se produce alguna interferencia o algún pico coeluye con los de interés poder cuantificar mediante el modo TIC los analitos y excluir así las interferencias.

Mediante una tabla de ANOVA y la herramienta análisis de datos obtenemos que para ambas líneas de calibración se acepta la hipótesis 1, que dice que hay regresión la pendiente difiere significativamente de cero. Para corroborarlo nos centramos en el análisis de residuales que proporcionan los valores de F,  $F_{crit}$  y el  $p_{valor}$ .

#### Diacetilo:

- Valor de F: 10748.8
- Valor de  $F_{crit}$ : 6.6079
- Valor de  $p_{valor}$ :  $1.58 * 10^{-9}$

#### 2,3-pentanodiona:

- Valor de F: 11957.6
- Valor de  $F_{crit}$ : 6.6079
- Valor de  $p_{valor}$ :  $1.21 * 10^{-9}$

En ambos casos F es mucho mayor que  $F_{crit}$  y el  $p_{valor}$  mucho menor que 0.05.

Alguno de los cromatogramas obtenidos de los patrones analizados serían los siguientes:

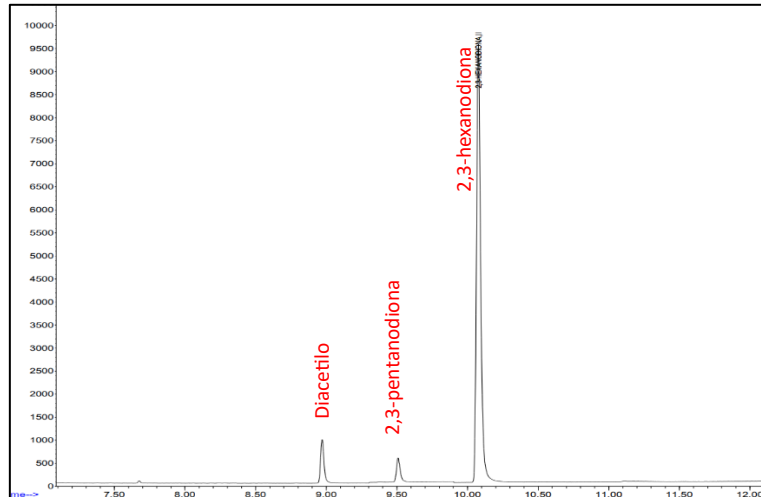


Imagen 17: Cromatograma del patrón 1 del calibrado.

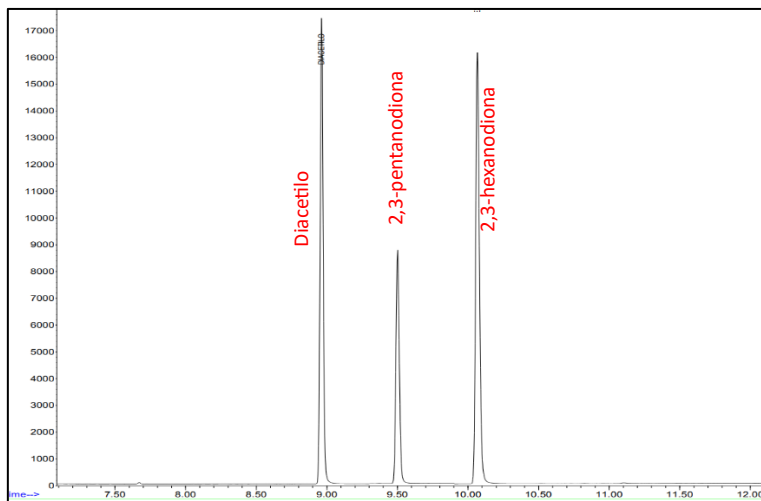


Imagen 18: Cromatograma del patrón 4 del calibrado.

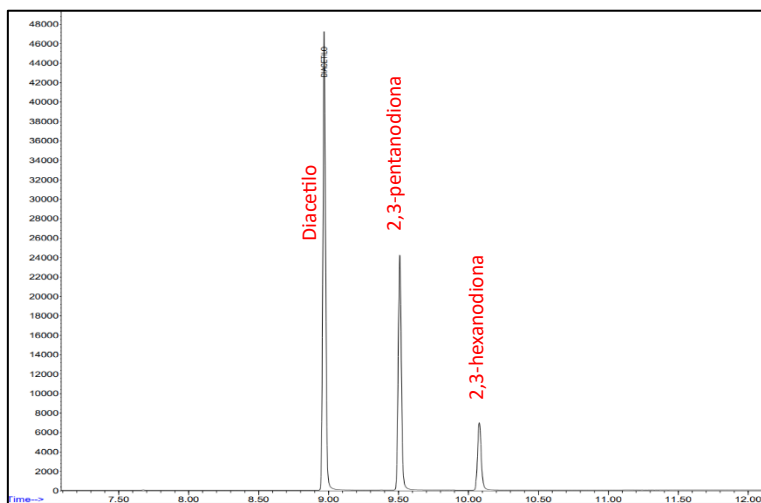


Imagen 19: Cromatograma del patrón 9 del calibrado.

Puede observarse como a medida que los patrones contienen mayor concentración de los analitos de interés, los picos de estos van creciendo, superando así al del PI que en todo momento contiene una concentración de 454.34 µg/L.

Con las líneas de calibración preparadas se puede pasar a diferentes pruebas que se efectuaron para optimizar el método y obtener mejores valores.

- **Posible contaminación de la columna:** para ello se prepararon muestras de diferentes concentraciones conocidas que se analizaron de igual manera para todos los casos, entre medias de cada muestra se hicieron también análisis del disolvente empleado (tolueno) para poder corroborar a través del cromatograma y el espectro la presencia o ausencia de los analitos que pudieran quedar retenidos en la columna.

Como resultado se obtuvo que en el intervalo de trabajo de la línea de calibrado no había presencia de analitos tras cada análisis, es decir la columna quedaba bien limpia.

\*En cambio al final del estudio cuando se analizó una gran cantidad de muestras, algunas de ellas se cuantificaron entre 4 y 5 mg/L y en esos casos si podían verse como las muestras siguientes se veían interferidas por la alta concentración de las anteriores. Se pudo conocer dicha contaminación porque las muestras siempre eran analizadas por duplicado y se obtenían valores muy dispares entre el primer y el segundo análisis y para corroborarlo se analizaban de nuevo.

- **Tiempo de reacción de derivatización:** uno de los aspectos importantes del análisis es el tiempo necesario para completar la reacción de derivatización. Según ciertos estudios la reacción se completaba con únicamente 5 minutos calentando a 30 °C [20] [16], en cambio otros estudios se pudieron ver como en algunos casos se empleaban hasta dos horas de reacción.

Para comprobarlo se prepararon 5 patrones que fueron expuestos a diferentes tiempos de reacción y se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 6:** Resultados tiempos de reacción.

<b>TIEMPO DE REACCIÓN (MIN)</b>	<b>CONC. ESPERADA (µg/L)</b>	<b>CONC. OBTENIDA (µg/L)</b>
<b>5</b>	500.00	396.78/402.20
<b>10</b>	500.00	478.35/480.72
<b>15</b>	500.00	497.59/495.15
<b>25</b>	500.00	504.77/500.89
<b>45</b>	500.00	489.96/495.70

Como puede observarse para el tiempo de 5 minutos el valor obtenido es bastante menor del esperado, para el tiempo de 10 minutos el valor ya es prácticamente el esperado, pero para tiempos mayores se obtienen mejores valores, más similares a los esperados a partir de 15 minutos. Por ello para la preparación de las muestras deberían exponerse estas a tiempos de 15 minutos o más.

- **Velocidades de agitación en la extracción:** al inicio del estudio la agitación basándonos en otros estudios debía ser lenta, se debe a que utilizando agitación lenta no se formaba la emulsión entre las muestras y el disolvente de extracción. Se demostró que la agitación lenta no producía valores repetitivos, sino que en un conjunto de muestras de igual concentración se obtenían valores muy dispares de concentración, por lo que el programa de agitación inicial lento se cambió por uno mucho más rápido y vigoroso, el cuál sí proporcionaba resultados repetitivos para las muestras iguales.

**Tabla 7:** Resultados prueba de agitación.

<b>Agitación</b>	<b>Conc. esperada (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Conc. obtenida (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>
Lenta	50	35.89
Rápida	50	39.20
Lenta	150	112.52
Rápida	150	143.44
Lenta	300	230.60
Rápida	300	304.76
Lenta	500	378.63
Rápida	500	469.95
Lenta	800	607.50
Rápida	800	789.32

Como puede observarse para bajas concentraciones se obtienen valores más similares, en cambio para concentraciones superiores, si se usa un programa de agitación lento la extracción nunca se completa y al cuantificar los valores obtenidos son muy inferiores a los esperados, en cambio, con un programa de agitación vigorosa se obtienen extracciones mucho mejores, donde la cuantificación es mucho más precisa.

- **Prueba de extracción con diferentes disolventes:** mediante esta prueba se buscaba poder sustituir el tolueno por otro disolvente de menor toxicidad. Para ello se realizaron análisis con el método diseñado con diferentes disolventes (a priori puede no tener mucho sentido pues cada disolvente interactúa de diferente manera con la columna y con el medio, pero de manera cualitativa sí podría hacerse una elección inicial de qué disolventes serían mejores, y sobre ellos ya modificar las condiciones de trabajo del cromatógrafo para optimizar el método).



Los disolventes empleados fueron elegidos por la disponibilidad del laboratorio y por la polaridad, eran necesarios aquellos de baja polaridad que fueran capaces de extraer los analitos de la matriz inicial. Los disolventes elegidos fueron: tolueno, éter dietílico, hexano, ciclohexano y una mezcla de éter dietílico-hexano 1:2 (que se empleaba en otros análisis).

Mediante los cromatogramas se dedujo cuál de los anteriores disolventes podían ser de interés para continuar con el estudio.

El tolueno, el utilizado hasta fecha, ya estaba demostrado que sí era posible llevar a cabo el análisis con él.

Al utilizar éter dietílico el cromatograma aparecía con mucho ruido en prácticamente todo el tiempo del análisis por ello se descartó.

Utilizando hexano, ciclohexano y la mezcla de éter dietílico-hexano 1:2 se obtuvieron cromatogramas muy similares a los del tolueno, donde se podían observar claramente los picos pertenecientes a los analitos de interés.

De estos tres la mezcla éter dietílico-hexano sería una buena opción por la baja toxicidad del éter, pero el hexano es más tóxico, por tanto, no es una elección segura. Como se comentaba el hexano tiene un límite menor que el tolueno, en cambio el ciclohexano sí contiene un límite de exposición bastante superior, por tanto, sería la mejor opción de las tres. [19]

Puesto que ya se tenía optimizado el método para emplear tolueno como disolvente de extracción y no se disponía de mucho tiempo para realizar las pruebas necesarias para optimizar el método con ciclohexano, el disolvente con el que se continuó el estudio fue tolueno.

### **12.1 Validación del método analítico:**

Una vez que el método ya había sido completado debía validarse. Para ello se siguieron las instrucciones del responsable de laboratorio, siguiendo así los criterios que eran de interés para esta empresa.

Mediante la validación del método se pretende demostrar que el laboratorio tiene la capacidad suficiente para la determinación de diacetilo y 2,3-pentanodiona en vinos. Dado que las muestras de vino pueden ser de vino blanco, rosado o tinto, la validación deberá efectuarse sobre las tres matrices.

La validación tiene como objetivo demostrar que el método es apto para el propósito previsto y que los resultados obtenidos tienen una incertidumbre aceptable. El desarrollo de la validación se hizo utilizando como referencia “La adecuación al uso de los métodos analíticos” de Eurochem, pero teniendo en cuenta únicamente los valores que eran de interés propio, es decir, la validación no se realizó de una manera completa.

Para llevar a cabo la validación se buscarán inicialmente tres muestras de vino (una de cada matriz) que contengan la menor cantidad posible de diacetilo y 2,3-pentanodiona para utilizarlas como blancos, y sobre las que se realizarán adiciones de un patrón conocido a tres niveles de concentración diferentes para analizar la validez del método en todo el rango del calibrado realizado. La validación se llevó a cabo en tres días diferentes e intervinieron tres analistas diferentes con el fin de excluir errores sistemáticos.

Para la validación se analizaban diariamente tres blancos y tres réplicas de cada nivel de concentración para cada matriz, obteniendo un total de 9 blancos y 9 medidas con los que llevar a cabo el análisis de validación.

Para elegir las matrices que se emplearan en la validación se analizaron 16 muestras de vino tinto, 7 de vino blanco y 7 de vino rosado, de todas estas las seleccionadas fueron:

- Vino tinto: BIPEA 0015 (se trata de un material de referencia que se usa para otros análisis de cromatografía)
- Vino blanco: B23R-U (comercial).
- Vino rosado: R22CYL-W (comercial).

\*La terminología de las muestras es importante si se quiere conocer el tipo de vino del que se está hablando, la manera de nombrarlas se describirá más adelante en el apartado de anexos, más en concreto el anexo 14.1.

**Tabla 8:** Concentraciones de las matrices.

Matriz	Conc. Diacetilo ( $\mu\text{g/L}$ )	Conc. 2,3-pentanodiona ( $\mu\text{g/L}$ )
BIPEA 0015 (tinto)	326.41	55.74
B23R-U (blanco)	124.47	8.90
R22CYL-W (rosado)	269.97	14.82

Sobre las matrices elegidas se llevaron a cabo diferentes adiciones de un patrón de 100  $\mu\text{g/L}$  de cada compuesto, con el fin de analizar todo el rango de trabajo de la línea de calibración.

Las adiciones se llevaron a cabo en matraces de 10 mL de donde más adelante se tomarían las muestras de 5 mL y se prepararían para su análisis como se ha descrito anteriormente.

Puesto que no se dispone de muestras exentas de los analitos que quieren determinarse, los niveles más bajos no fue posible analizarlos para el caso del diacetilo, lo cual tampoco es muy alarmante, porque el límite de detección organoléptico de ambos es muy superior a las concentraciones tan bajas que comprenden los primeros puntos del calibrado.

**Tabla 9:** Niveles de concentración de la validación de diacetilo.

Matriz	Nivel de concentración	Volumen añadido ( $\mu\text{L}$ )	Conc. añadida ( $\mu\text{g/L}$ )	Conc. total ( $\mu\text{g/L}$ )
Tinto	1º	10	99.65	426.06
	2º	30	298.69	625.38
	3º	50	498.28	824.69
Blanco	1º	15	149.48	273.95
	2º	50	498.28	622.75
	3º	80	797.25	921.72
Rosado	1º	20	199.31	469.28
	2º	45	448.45	718.42
	3º	75	747.42	1017.39

**Tabla 10:** Niveles de concentración para la validación de 2,3-pentanodiona.

Matriz	Niveles de concentración	Volumen añadido (uL)	Conc. añadida (µg/L)	Conc. total (µg/L)
Tinto	1º	10	100.36	156.10
	2º	30	301.08	356.82
	3º	50	501.80	557.54
Blanco	1º	15	150.54	159.44
	2º	50	501.80	510.70
	3º	80	802.88	811.78
Rosado	1º	20	200.72	215.54
	2º	45	451.62	466.44
	3º	75	752.70	767.52

En el proceso de la validación se determinarán parámetros referidos a la precisión del método (repetibilidad y reproducibilidad), y la veracidad (sesgo) del mismo. Todo esto permitirá calcular la incertidumbre de los resultados en todo el rango de la calibración.

Una vez realizadas todas las mediciones se comenzó el análisis de los datos con una prueba de Grubbs (G), donde se buscaba excluir ciertos valores que tuvieran una gran diferencia con el resto de los valores. Una vez eliminados estos valores, se pasó al cálculo de los parámetros de validación:

- **Exactitud:** calculado como grado de concordancia entre el resultado teórico esperado a cada nivel de concentración y el promedio de los resultados experimentales obtenidos.

$$E\% = \frac{V_{RI} - \bar{x}_i}{V_{RI}}$$

donde  $V_{RI}$  =valore de referencia en el nivel de concentración  $i$ , y  $\bar{x}_i$  es el valor promedio de los resultados obtenidos en el ensayo del nivel  $i$ .

- **Recuperación:** relacionado con la exactitud, se calcula así el porcentaje de analitos añadidos en cada nivel.

$$R\% = 100 - E\%$$

- **Índice de compatibilidad:** se utiliza para confirmar que no existen diferencias entre el valor de referencia promedio obtenido en cada nivel de concentración:

$$IC = \frac{|V_{RI} - \bar{x}_i|}{\sqrt{U_{V_{RI}}^2 + \left(t * \frac{S_i}{\sqrt{n}}\right)^2}} \leq 2$$

Donde  $U_{V_{RI}}^2$ , es la incertidumbre del valor de referencia con un intervalo de confianza del 95%; t el facto t de Student para n medidas y  $\alpha = 0.05\%$  y  $s_i$  la desviación estándar.

Cuando  $IC > 2$  se calcula una corrección en función del promedio de valores obtenidos y el valor esperado, que se deberá sumar o restar a los valores experimentales. Por criterio del laboratorio aquellas correcciones menores de 50  $\mu\text{g/L}$  no deberán aplicarse pues no se consideran influyentes en el resultado final.

- **Precisión:** se determinan como coeficientes de variación de repetibilidad y reproducibilidad.

El coeficiente de variación de repetibilidad, con los valores medios de los días  $i$  del análisis.

$$CV_r(\%) = \frac{S_i}{\bar{x}_i} * 100$$

El coeficiente de variación de reproducibilidad, con los valores medios globales:

$$CV_R(\%) = \frac{S}{\bar{x}}$$

- **Límites de detección y cuantificación:** no eran de interés para el desarrollo del estudio, pero igualmente se calcularon con las siguientes ecuaciones, en función de los valores de los blancos:

$$LOD = \bar{x}_b + 3s_b$$

$$LOQ = \bar{x}_b + 10s_b$$

En la siguiente página se podrá observar un resumen de los valores de la validación realizada acorde a los pasos descritos anteriormente:

**Tabla 11:** Resumen de validación para el vino tinto.

	<b>Diacetilo</b>			<b>2,3-Pentanodiona</b>		
	1º Nivel	2º Nivel	3º Nivel	1º Nivel	2º Nivel	3º Nivel
<b>Conc. (µg/L)</b>	99.66	298.97	498.28	100.36	301.08	501.80
<b>Blanco (µg/L)</b>	326.41			55,74		
<b>CV<sub>R</sub> (%)</b> <b>Reproducibilidad</b>	9.87	5.67	3.32	13.33	8.91	4.33
<b>CV<sub>r</sub> (%)</b> <b>Repetibilidad</b>	5.32	3.34	6.55	6.56	2.70	1.30
<b>Promedio (µg/L)</b>	100.91	298.84	522.63	99.68	282.88	499.76
<b>Corrección (µg/L)</b>	-	-	-24.34	-	-	-
<b>Sr</b>	5.37	9.98	34.23	6.54	7.62	6.51
<b>Error (exactitud)</b>	1.26	-0.04	4.89	-0.68	-6.04	-0.41
<b>Recuperación (%)</b>	101.26	99.96	104.89	99.32	93.96	99.59
<b>Incertidumbre (µg/L)</b>	29.38	49.69	58.50	38.88	73.74	64.28
<b>Incertidumbre (%)</b>	29.1	16.6	11.2	39.0	26.1	12.9

**Tabla 12:** Resumen de validación para el vino blanco.

	Diacetilo			2,3-Pentanodiona		
	1º Nivel	2º Nivel	3º Nivel	1º Nivel	2º Nivel	3º Nivel
<b>Conc. (µg/L)</b>	149.48	498.28	797.25	150.54	501.80	802.88
<b>Blanco (µg/L)</b>	124.47			8.90		
<b>CV<sub>R</sub> (%) Reproducibilidad</b>	18.80	21.64	18.30	17.31	20.19	17.36
<b>CV<sub>r</sub> (%) Repetibilidad</b>	22.43	10.64	7.79	15.74	9.83	7.12
<b>Promedio (µg/L)</b>	119.40	480.33	683.09	129.65	418.42	620.73
<b>Corrección (µg/L)</b>	30.09	-	114.16	20.89	83.38	182.15
<b>Sr</b>	26.79	51.11	53.21	20.40	41.07	44.21
<b>Error (exactitud)</b>	-20.13	-3.60	-14.32	-13.87	-16.62	-22.69
<b>Recuperación (%)</b>	79,87	96.40	99.59	86.13	83.38	77.31
<b>Incertidumbre (µg/L)</b>	74.14	302.79	387.34	70.12	264.37	378.15
<b>Incertidumbre (%)</b>	62.1	63.0	56.7	54.1	63.2	60.9

**Tabla 13:** Resumen de validación para el vino rosado.

	<b>Diacetilo</b>			<b>2,3-Pentanodiona</b>		
	1º Nivel	2º Nivel	3º Nivel	1º Nivel	2º Nivel	3º Nivel
<b>Conc. (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	199.31	448.45	747.42	200.72	451.62	752.70
<b>Blanco (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	269.97			14.82		
<b>CV<sub>R</sub> (%)</b> <b>Reproducibilidad</b>	7.13	3.35	5.31	5.65	2.49	2.09
<b>CV<sub>r</sub> (%)</b> <b>Repetibilidad</b>	7.88	3.10	5.61	2.74	1.69	2.10
<b>Promedio (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	201.77	469.96	737.82	176.10	376.24	735.44
<b>Corrección</b> <b>(<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	-	-21.51	-	24.62	75.38	-
<b>Sr</b>	15.89	14.57	41.40	4.82	6.34	15.44
<b>Error (exactitud)</b>	1.23	4.80	-1.28	-12.26	-16.69	-2.29
<b>Recuperación</b> <b>(%)</b>	101.23	104.80	98.72	87.74	83.81	97.71
<b>Incertidumbre</b> <b>(<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	42.32	52.68	114.56	40.96	91.81	47.43
<b>Incertidumbre</b> <b>(%)</b>	21.0	11.2	15.5	23.3	24.4	6.4



Al no contar con valores objetivo de reproducibilidad y repetibilidad establecidos, se propuso dar por válidos los valores menores del 20%, en el caso del vino tinto y el rosado se cumple en todos los niveles, en cambio para el vino blanco en algunos casos se sobrepasa este límite.

El error (exactitud) en todos los casos para el vino tinto se encuentra por debajo de un 7% lo cual es un muy satisfactorio, para el rosado se obtiene algún valor por encima del 15% pero también se dio por válido, una vez más el vino blanco resulto valores en este caso mayores del 20%, que no resultó aceptable a ojos del laboratorio.

También se analizó la recuperación, se puede ver como en el caso del vino tinto y rosado se obtienen valores bastante cercanos al 100%, en cambio para el vino blanco todos ellos se encuentran bastante por debajo, en torno al 80% de forma general.

Finalmente, también se calcularon las incertidumbres, donde es destacable mencionar que para el 1º Nivel en el vino tinto la incertidumbre era de un 30 y un 40 % para el diacetilo y la 2,3-pentanodiona, respetivamente, lo cual puede considerarse demasiado elevado en niveles tan bajos, en cambio para niveles más altos las incertidumbres en el vino tinto disminuyen dando valores satisfactorios. Para el vino rosado se obtienen muy buenos valores de incertidumbre para el diacetilo y algo mayores para la 2,3-pentanodiona. Y, por último, para el vino blanco las incertidumbres aumentan hasta más de un 50%, valores que son inadmisibles y mucho menos conociendo que el vino blanco contiene muy bajas concentraciones de los analitos a determinar.

### 13. Análisis de las muestras:

Para terminar el estudio, una vez se concluyó la validación se analizaron diferentes muestras de diferentes denominaciones de origen del país. (Ahora si es necesario conocer la terminología de las muestras, y una breve descripción de algunos de sus parámetros fisicoquímicos: Anexos 14.2 y 14.3).

**Tabla 14:** Muestras analizadas con el método analítico diseñado.

Vinos Tintos				
Repetición	Muestra	Diacetilo (µg/L)	2,3-Pentanodiona (µg/L)	Dilución
1	T22SOM-A1	2111.58	93.91	-
2	T22SOM-A1	498.06	25.57	1:4
1	T21RD-B1	276.83	18.68	-
1	T22RD-C1	3057.29	233.19	-
2	T22RD-C1	798.54	60.30	1:3
1	T20CA-D1	83.89	9.77	-
1	T21CA-E1	985.83	37.37	-
1	T22CA-F1	4000.36	96.5	-
2	T22CA-F1	883.67	22.72	1:4
1	T21RI-G1	1248.2	124.51	-
2	T21RI-G1	439.8	46,63	1:2
1	T20V-H1	972.59	32.43	-
1	T23RD-I1	4794.82	472.24	-
2	T23RD-I1	1006.58	109.26	1:4
1	T23RD-J1	5190.38	415.55	-
2	T23RD-J1	968.54	68.92	1:5
1	T23RD-K1	4189.79	330.51	-
2	T23RD-K1	879.39	70.80	1:4
1	T23RD-L1	5368.52	460.01	-
2	T23RD-L1	923.94	90.10	1:5

1	T20UR-M1	2000.60	57.61	-
2	T20UR-M1	589.81	22.30	1:3
1	T22SS-N1	1097.75	81.03	-
1	T23RD-O1	4696.56	330.0	-
2	T23RD-O1	898.73	42.93	1:5
1	T22RD-P1	2744.09	288.25	-
2	T22RD-P1	750.48	77.50	1:3
1	T22RD-Q1	2068.74	217.45	-
2	T22RD-Q1	579.61	30.37	1:3
1	T22RD-R1	2616.21	212.5	-
2	T22RD-R1	686.00	58.09	1:3
1	T22RD-S1	4194.88	354.61	-
2	T22RD-S1	769.03	53.50	1:5
1	T22RD-T1	3454.29	288.9	-
2	T22RD-T1	769.37	78.56	1:4
1	T22RD-U1	5719.05	395.81	-
2	T22RD-U1	852.01	55.30	1:6
<b>Vinos Rosados</b>				
1	R22RI-V1	508.9	48.93	-
1	R19RD-W1	1203.01	214.21	-
2	R19RD-W1	439.90	76.82	1:2
1	R23LE-X1	512.96	57.94	-
1	R23MO-Y1	192.68	54.14	-
1	R23CYL-Z1	2013.78	15.17	-
2	R23CYL-Z1	562.63	No detectado	1:3
1	R22CM-A2	459.78	21.58	-
1	R21CG-B2	15.57	7.44	-

1	R23RD-C2	1704.74	312.76	-
2	R23RD-C2	449.02	80.27	1:3
1	R22CYL-D2	279.65	15.09	-

Todas las muestras que excedieron el rango de trabajo del calibrado fueron repetidas diluyéndolas con agua destilada y se analizaron de nuevo. Realizando las diluciones indicadas se obtuvieron valores bastante similares a los que se podrían obtener al calcularlo de manera teórica.

Además, se adjuntan a continuación algunos de los cromatogramas obtenidos de las muestras, donde: el 1 representa el diacetilo y el 2 la 2,3-pentanodiona.

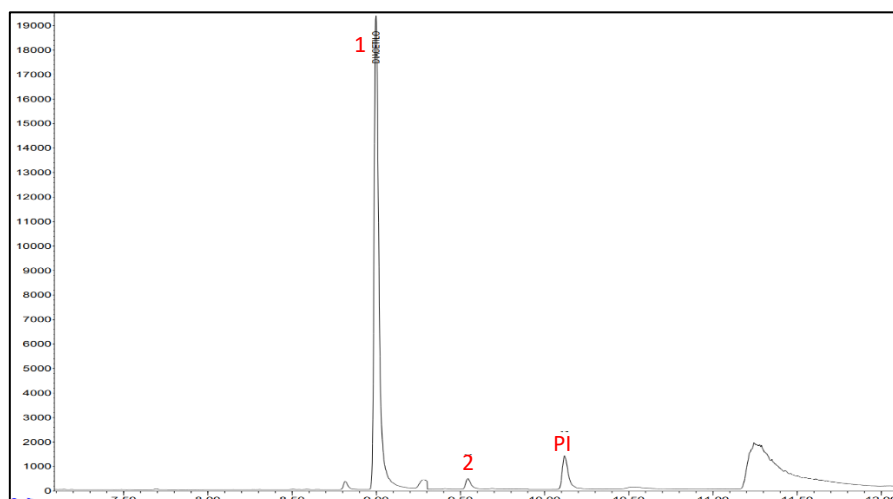


Imagen 20: Cromatograma muestra T22SOM-A1.

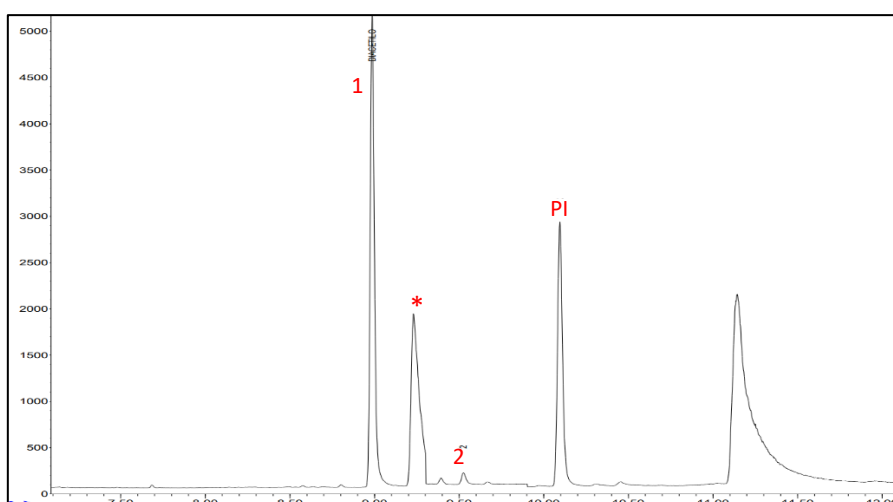


Imagen 21: Cromatograma muestra T21RD-B1.

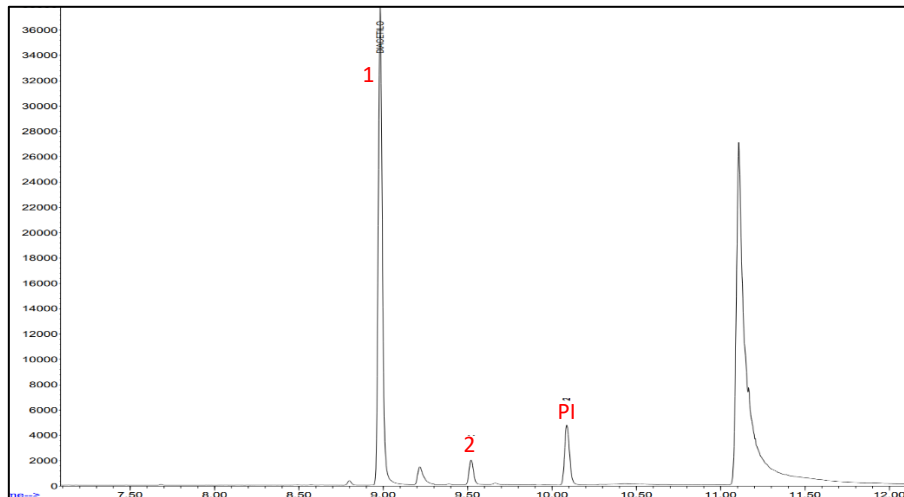


Imagen 22: Cromatograma muestra T21RI-G1.

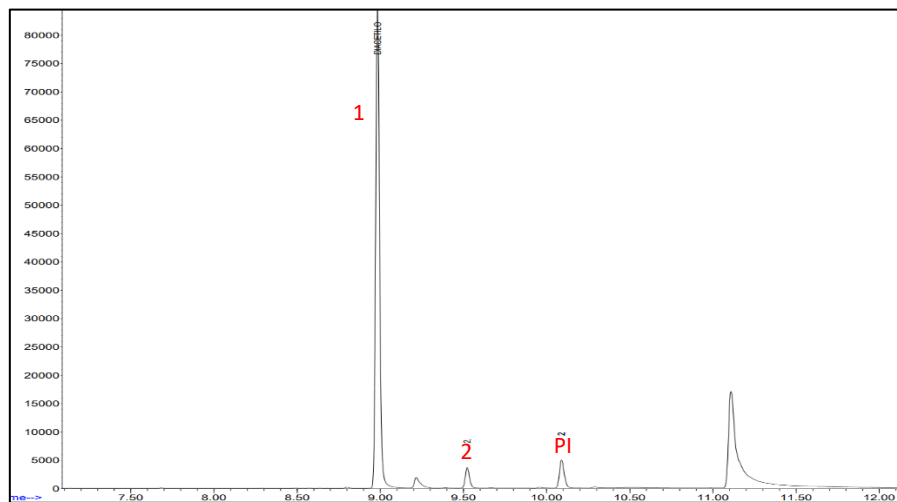


Imagen 23: Cromatograma muestra T22RD-R1.

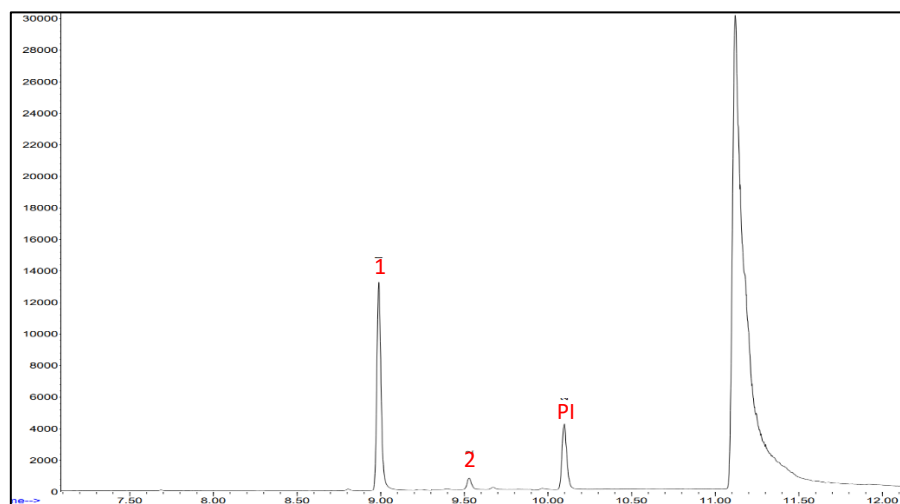
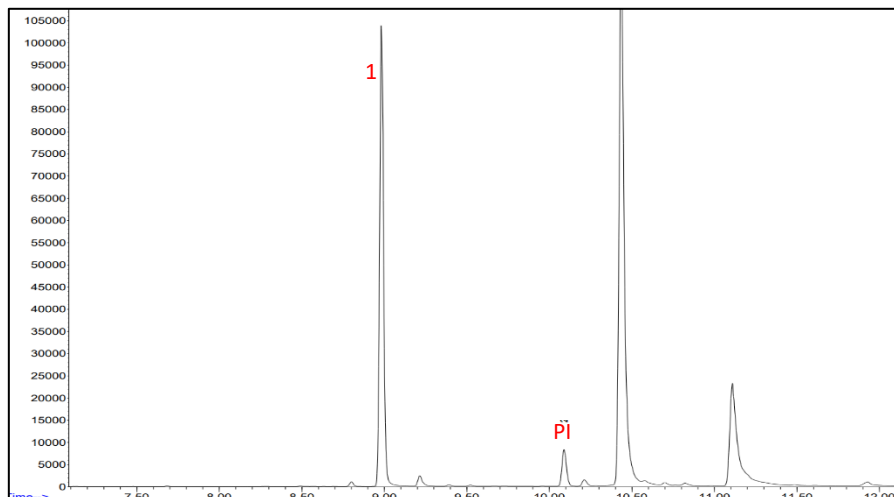


Imagen 24: Cromatograma muestra R23LE-X1.



**Imagen 25:** Cromatograma muestra R23CYL-Z1.

Como puede apreciarse, en todos ellos se encuentra un gran pico perteneciente al diacetilo, la 2,3-pentanodiona como se obtuvo en el análisis de muestras tiene valores mucho menores siempre, por ello su pico es muy pequeño, o incluso ni se detecta como en la “imagen 25”.

Un punto que podría destacarse también sería que no se ha estudiado la acetoína la cual también tiene un límite de detección organoléptico y aromas similares al del diacetilo, y que suele estar también bastante presente. En la “imagen 21” podemos observar un asterisco que se encuentra sobre un pico que eluye muy cercano a los compuestos de interés. La acetoína es un compuesto muy similar al diacetilo, cambiando uno de los grupos carbonilos por un alcohol. El otro grupo carbonílico podría reaccionar con el derivatizante formándose un nuevo compuesto de estructura similar al formado junto con diacetilo, y con algunos iones en común que pudieran ser detectados, es por lo que se cree que el pico señalado con un asterisco podría pertenecer a la acetoína, pero no se pudo comprobar experimentalmente.

## 14. Conclusiones.

Se ha diseñado con éxito un método con el cual poder analizar las composiciones de diacetilo y 2,3-pentanodiona en muestras de vino tinto y rosado. Según la validación realizada se obtienen valores de precisión y exactitud, e incertidumbres adecuadas para las matrices de vino tinto y rosado, así pues, dichos valores son demasiado elevados para el caso de los vinos blancos, por tanto, el método no es adecuado para dichas muestras. Si bien, es cierto que los vinos blancos no realizan la fermentación maloláctica, por tanto, la presencia de diacetilo y 2,3-pentanodiona es prácticamente nula y no es de interés analizar dichos analitos, que raramente llegarán a valores que sean detectables organolépticamente, es decir, no afectarán olfativamente al vino.

El vino rosado se encuentra entre medias, por las muestras analizadas puede verse como de manera general tiene concentraciones menores que en el vino tinto, ya que tampoco suelen realizar la fermentación maloláctica, si bien, existen excepciones como las muestras: R19RD-W1, R23CYL-Z1, R23RD-C2; que sí contienen altos valores de diacetilo y que podrían beneficiar o perjudicar olfativamente al vino, aunque en ninguno de los casos fue posible detectar dichos aromas mediante análisis organoléptico.

El punto más destacable es el vino tinto, el cuál es el de verdadero interés, el diacetilo en muchas ocasiones excede el límite citado, pero no siempre es detectable olfativamente. Esto se debe a que otros aromas más potentes son capaces de cubrir a este, aun así, las elevadas concentraciones de diacetilo pueden ser un problema en función del consumidor, es por ello, que es de gran interés controlar su síntesis. Respecto a la 2,3-pentanodiona siempre se encuentra en niveles muy inferiores a los de los límites de detección aromática, por ello no es de gran importancia su aportación al aroma.

El futuro de este estudio radica en el control de la síntesis de los compuestos estudiados, y para ello se aplicaría el método diseñado en el análisis de muestras en las etapas fermentativas.

La síntesis del diacetilo como ya se comentó se produce en las fermentaciones alcohólica y maloláctica, según [4] en condiciones de limitación de glucosa, pH ácidos, bajas temperaturas y presencia de inhibidores de crecimiento de las levaduras; la formación de compuestos

carbonílicos está favorecida; es decir debe llevarse un riguroso control de las condiciones del medio durante la fermentación maloláctica para poder variar preferentemente la concentración del diacetilo en el vino. Para llevar a cabo ese control una guía importante son las concentraciones de ácido málico y cítrico, principales precursores del diacetilo.

También es necesario controlar la fermentación alcohólica, donde es imprescindible mantener una temperatura entre 23-28 °C para que esta no se detenga y puedan producirse reacciones paralelas como la fermentación gliceropirúvica. Además, cuando la uva comienza a fermentar es usual añadir ciertos ácidos, como el cítrico para disminuir el pH del vino, por ello como se comentaba anteriormente el control de las adiciones de cítrico y su evolución durante la fermentación son muy importantes.



## 15. Bibliografía.

- [1]. Carbonell Bejerano, Pablo; Martínez Zapater, José Miguel. (2014). Estructura y composición de la uva y su contribución al vino. Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino (CSIC). Universidad de la Rioja.
- [2]. Ferreira González, Vicente. (2007). La base química del aroma del vino: Un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. Revista de la Real Academia de Ciencias de Zaragoza, 2º serie, Vol.62. 2007.
- [3]. Blouin, Jacques; Peynaud, Émile. (2006). Enología Práctica, Conocimiento y elaboración del vino. Ed. MUNDI-PRENSA, 4º Edición.
- [4]. Ribéreau-Gayon, Pascal; Dubourdieu, Dennis; Donéche, Bernard; Lonvaud, Aline. (2003). Microbiología del vino. Vinificaciones. Ed. Hemisferio Sur. Ediciones MUNDI-PRENSA, 1º Edición.
- [5]. Bauer, R. & Dicks, L. M. T. (2004). Control of malolactic fermentation in wine. a review. South African Journal of Oenology & Viticulture, 25(2):74-8.
- [6]. Ribéreau-Gayon, Pascal; Glories, Yves; Maujean, Alain; Dubourdieu, Denis. (2003). Química del vino. Estabilización y tratamientos. Ed. Hemisferio Sur. Ediciones MUNDI-PRENSA, 1º Edición.
- [7]. Dr. Vicent Renouf; Dr. Virginie Moine; Dr. Marie-Laure Murat; Alain Martinez. (2010). 101 Questions autour de la FML. Ed. LAFFORT
- [8]. Zoecklein, Bruce W.; Fugelsang, Kenneth C.; Gump, Barry H.; Nury, Fred S. (1995). Wine analysis and production. Ed. KLUWER ACADEMIC/PLENUM PUBLISHERS.
- [9]. Moreno-Arribas, M. Victoria; Polo, M. Carmen. (2009). Wine Chemistry and Biochemistry. Ed. SPRINGER.
- [10]. Ochando, Thomas; Mouret, Jean-Roch; Humbert-Goffard, Anne; Sablayrolles, Jean-Marie; Farines, Vicent. (2018). Vicinal diketones and their precursors in wine alcoholic fermentation: Quantification and dynamics of production. Food Research International 2018, Vol. 103 (192-199).

- [11]. Brigitte Martineau, Terry E Acree; Henick-Kling, Thomas. (1995). Effect of wine type on the detection threshold for diacetyl. *Food Research International* 1995, Vol 28, No. 2 (139-143).
- [12]. Carbonero Zalduegui, Pilar. (1976). Complementos de bioquímica de industrias agrícolas.
- [13]. Bartowsky, Eveline J.; Henschke, Paul A. (2004). The `buttery attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. *International Journal of Food Microbiology* 96 (2004) (235-252).
- [14]. A. Skoog, Douglas; Holes, F. James; R. Crouch, Stanley. (2008). Principios de análisis instrumental. Ed. Cengage Learning. 6ª Edición.
- [15]. Landaud, Sophie; Lieben, Pascale; Picque, Daniel. (1997). Quantitative analysis of diacetyl, pentanodione and their precursors during beer fermentation by an accurate GC/MS method. *J. Inst. Brew*, March-April 1998. Vol. 104 (93-99).
- [16]. Martineau, Brigitte; Acree, Terry; Henick-Kling, Thomas. (1994). A simple and accurate GC/MS method for the quantitative analysis of diacetyl in beer and wine. *Biotechnology Techniques* 1994, Vol.8, No.1 (7-12).
- [17]. Sáenz Bustamante, Rosmery. (2016). Evaluación de los compuestos volátiles del vino base del pisco de las variedades de uva: Italia, moscatel y torontel. Universidad Nacional Agraria La Molina, 2016.
- [18]. Lee, Hyeon-Hwa; Lee, Ki-Teak; Shin, Jung-Ah. (2017). Analytical method validation and monitoring of diacetyl in liquors from Korean market. *The Korean Society of Food Science and Technology and Springer Science Business Media*, 13 July 2017.
- [19]. Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el trabajo (INSST). (2024). Límites de exposición profesional para agentes químicos en España.
- [20]. Idareta Erro, Maite. (2016). Alternativas al SO<sub>2</sub> como conservante del vino. Universidad pública de Navarra.

[21]. Castellucci, Federico. (2010). Método de determinación de los compuestos a-carbonílicos del vino por cromatografía gaseosa tras derivación con 1,2-diaminobenceno. Resolución OIV/OENO 386B/2010.

[22]. Aguerri Fernández, Laura D. (2019). Estudio de la formación de aldehídos de Strecker a partir de diacetilo y de quinonas. Universidad de Zaragoza, Departamento de química analítica.

[23]. Hayasaka, Yoji; Bratowsky, Eveline J. (1999). Analysis of diacetyl in wine using solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. J. Agri. Food Chem., 1999, Vol.47, (612-617).

[24]. Durán Guerrero, Enrique, (2008). Control de los procesos de elaboración, calidad y trazabilidad del Vinagre de Jerez. Universidad de Cádiz, Dep. Química Analítica.

[25]. Sarmiento Ochoa, Nicole Alexandra. (2021). Estudio de compuestos Químicos no azufrados responsables del aroma de la cerveza. Universidad de Azuay, Facultad de Ciencia y Tecnología.

## 16. Anexos.

### **16.1. Terminología de las muestras:**

1. La primera letra indica el tipo de vino del que se trata: T=tinto, B=blanco, R=rosado.
2. Los dos siguientes números indican el año de vendimia del fruto: 22=2022, 18=2018.
3. Los siguientes caracteres indican la denominación de origen o procedencia de las muestras:

**Tabla 15:** Terminología de las denominaciones de origen utilizadas.

Siglas	Denominación de origen
<i>RD</i>	Ribera del Duero
<i>CYL</i>	Vinos de la tierra de Castilla y León
<i>SS</i>	Sierra Salamanca
<i>R</i>	Rueda
<i>C</i>	Cangas
<i>J</i>	Jerez
<i>CG</i>	Cigales
<i>CM</i>	La Mancha
<i>SOM</i>	Somontano
<i>UR</i>	Utiel-Requena
<i>RI</i>	Rioja
<i>V</i>	Valdepeñas
<i>CA</i>	Vinos de la tierra de Cádiz
<i>LE</i>	León
<i>MO</i>	Monastrell

4. Por último un carácter para poder identificar las muestras en el ámbito de trabajo y evitar posibles confusiones entre muestras de procedencias y años similares.

Ejemplos: T21RD-A1; B23SS-I1; R22CYL-O2.

## **16.2. Análisis fisicoquímico y de las muestras de vino tinto utilizadas.**

**Tabla 16:** análisis fisicoquímico de las muestras de vino tinto.

NOMBRE	Etanol	Densidad	SO2 LIBRE	SO2 TOTAL	AV	pH	A.T.	Glicerol	Folin C	IC	Glu Fruc	Az. Red	Málico	Láctico	Tartárico	CO2	Cítrico
T22SOM-A1	12,97	0,9935	3	42	0,53	3,57	5	8,3	62	10	1,48	4,05	-0,05	0,98	2,5	226,33	0,08
T21RD-B1	13,8	0,9907	4	22	0,83	3,84	6,6	4,1	21	13	4,99	5,22	0,34	6,37	1,2	1051,32	0
T22RD-C1	13,92	0,9912	26	53	0,54	3,72	4,8	9,4	80	11	0,57	2,33	-0,05	1,59	2,3	284,97	0,18
T20CA-D1	14,33	0,993	0	36	0,9	3,95	6	8,4	73	11	0,59	3,05	0,09	3,45	1,8	306,28	0
T21CA-E1	13,66	0,9926	6	38	0,68	3,69	5,9	7,9	50	9	0,85	2,86	0,04	2,77	2,2	577,8	0,04
T22CA-F1	14,54	0,9916	10	40	0,71	3,74	6	8,1	62	13	2,01	3,67	0,02	2,9	2,3	486,95	0,07
T21RI-G1	13,38	0,9913	0	10	0,44	3,55	5,1	8,5	54	9	1	2,95	-0,19	1,53	2,4	314,02	0,16
T20V-H1	13,28	0,9944	-3	15	0,67	3,78	4,8	9,1	70	10	1,3	3,82	0,03	1,67	2,2	191,19	0,06
T23RD-I1	13,75	0,9923	25	59	0,57	3,69	5,3	9,9	49	12	0,95	2,96	-0,21	2,8	1,9	538,92	0,12
T23RD-J1	14,06	0,9928	25	55	0,59	3,79	5,4	10,2	58	12	0,96	3,25	-0,02	2,76	2,2	486,61	0,08
T23RD-K1	14,35	0,9923	26	61	0,62	3,85	5,1	10,2	61	12	1,08	3,14	0,07	2,8	1,8	577,71	0,09
T23RD-L1	13,98	0,9929	28	60	0,58	3,78	5,4	10,2	58	12	1,05	3,33	-0,02	2,76	2,2	498,21	0,08
T20UR-M1	12,95	0,9937	-2	61	0,72	3,36	6,2	9	45	7	1,66	4	0,04	1,47	2,2	145,68	0,14
T22SS-N1	12,68	0,9912	-2	12	0,75	3,66	4,9	8,3	32	8	1,31	2,98	0,18	1,94	1,5	466,08	0,09

NOMBRE	Etanol	Densidad	SO2 LIBRE	SO2 TOTAL	AV	pH	A.T.	Glicerol	Folin C	IC	Glu Fruc	Az. Red	Málico	Láctico	Tartárico	CO2	Cítrico
T23RD-O1	14,25	0,9918	20	37	0,48	3,85	4,7	10,1	75	12	0,77	3	0,18	1,84	2,1	304,23	0,13
T22RD-P1	13,83	0,9917	26	62	0,57	3,75	4,7	9,4	83	12	0,35	2,26	0,08	1,48	2,3	182,21	0,16
T22RD-Q1	13,79	0,9918	28	66	0,58	3,75	4,7	9,4	81	12	0,37	2,19	0,02	1,52	2,3	180,17	0,16
T22RD-R1	13,78	0,9918	33	72	0,58	3,74	4,7	9,4	82	12	0,42	2,39	0,03	1,47	2,2	184,57	0,17
T22RD-S1	13,87	0,992	27	64	0,58	3,76	4,7	8,9	88	14	0,19	2,16	0,11	1,34	2,5	183,21	0,15
T22RD-T1	14,01	0,9917	28	77	0,71	3,77	5,1	9	92	11	0,05	2,4	0,33	1,39	2,4	161,87	0,14
T22RD-U1	14,16	0,9907	24	74	0,69	3,53	5,4	8,7	80	12	0,21	2,16	-0,03	1,2	2,5	169,8	0,16

**16.3. Análisis fisicoquímico y de las muestras de vino rosado utilizadas.****Tabla 17:** Análisis fisicoquímico de las muestras de vino rosado.

NOMBRE	Etanol	Densidad	SO2 LIBRE	SO2 TOTAL	AV	pH	A.T.	Glicerol	Folin C	IC	Glu Fruc	Az. Red	Málico	Láctico	Tartárico	CO2	Cítrico
R22RI-V1	13,31	0,9896	26	112	0,24	3,26	5,8	6,6	21	0	1,27	2,74	1,5	0,23	2,7	295,57	0,34
R19RD-W1	13,4	0,9886	18	68	0,27	3,42	5,4	7	16	0	0,09	1,59	2,13	0,21	2,2	399,39	0,43
R23LE-X1	12,62	0,9928	26	120	0,34	3,36	5,3	6,1	13	1	9,16	10,02	1,36	0,15	2,2	747,71	0,37
R23MO-Y1	13,86	0,9909	25	71	0,18	3,12	7,3	9,8	6	0	1,13	3,09	1,46	0,27	3,2	153,58	0,43
R23CYL-Z1	13,55	0,992	8	94	0,48	3,89	5	10,2	43	6	-0,6	1,1	2,16	1,03	2	272,5	0,4
R22CM-A2	8,2	1,0198	5	43	0,26	3,21	5,2	3,8	0	1	66,4	66,94	0,28	1,63	2,3	308,37	0,26
R21CG-B2	13,73	0,9884	1	43	0,29	3,32	5,3	6,1	31	1	0,47	1,9	1,22	0,06	2,8	362,44	0,26
R23RD-C2	13,33	0,9905	3	38	0,24	3,35	6,3	9,3	14	1	0,42	2,17	1,88	0,35	2,7	495,83	0,41
R22CYL-D2	11,72	0,9915	4	85	0,3	3,55	4,8	7,3	20	2	-0,1	0,89	0,09	2,53	2,2	576,91	0,2