

Septiembre 2016

TRABAJO FIN DE MÁSTER:
ALTERNATIVAS AL SO₂ COMO
CONSERVANTE DEL VINO



Maite Idareta Erro

DIRECTORAS:

M^ªASUNCIÓN LUQUIN MARTÍNEZ

CARMEN ANCÍN AZPILICUETA

MÁSTER EN QUÍMICA SINTÉTICA E INDUSTRIAL

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se han buscado alternativas conservantes al SO₂ en el vino debido a los efectos tóxicos que este compuesto tiene sobre la salud del ser humano.

El estudio se ha realizado sobre vinos procedentes de 3 tipos de uva distintos, Garnacha, Graciano y Cabernet Sauvignon. Como alternativas conservantes al SO₂ se han utilizado combinaciones de bajas concentraciones de este compuesto con dos extractos naturales, uno de salvia y otro de olivo.

La capacidad conservante y la influencia sobre la calidad del vino de dichas alternativas se ha estudiado determinando las concentraciones de aminas en el vino mediante HPLC con detector de fluorescencia y las de compuestos volátiles utilizando cromatografía de gases con detector de masas.

Ambas alternativas han demostrado conservar el vino de manera similar al SO₂, mejorando además la concentración de ésteres. Por ello se presentan como potenciales alternativas conservantes por el momento.

PALABRAS CLAVE

Dióxido de azufre, extractos naturales, aminas, compuestos volátiles, vino tinto

ABSTRACT

In the present research work different alternatives for the use of SO₂ as only preservative in wine have been studied due to the human health problems associated to this compound.

The study has been done using wines produced from 3 different grape varieties: Garnacha, Graciano and Cabernet Sauvignon. As alternatives to the actual preservative different mixtures has been used using low SO₂ concentrations with two different natural extract, one from olive and another one from sage.

The alternatives' preservative capacity and their influence on wine's quality has been studied by the determination of the amines concentration using a HPLC with a fluorescence detector, and the evolution of volatile compounds concentrations using a gas chromatograph with a coupled mass detector.

The results has shown that both alternatives seems to preserve wine similarly to SO₂, increasing besides its esters concentrations. Because of that, they are presentend as potential alternatives for the moment.

KEY WORDS

Sulphur dioxide, natural extracts, amines, volatile compounds, red wine.

M^a ASUNCIÓN LUQUIN MARTINEZ, profesora ayudante doctor, y CARMEN ANCÍN AZPILICUETA, catedrática de la Universidad Pública de Navarra

CERTIFICAN

Que el trabajo de investigación que se recoge en esta memoria titulada “ALTERNATIVAS AL SO₂ COMO CONSERVANTE DEL VINO”, ha sido realizado en el Departamento de Química Aplicada de la Universidad Pública de Navarra, bajo su dirección, y autorizan su presentación para que sea calificado como Trabajo Fin de Máster.

Pamplona, 14 de septiembre de 2016

Fdo. Dra. M^a Asunción Luquin Martínez

Fdo. Cat. Carmen Ancín Azpilicueta

Agradecimientos

Quiero expresar mi agradecimiento a todas las personas que han hecho posible que este trabajo haya podido realizarse.

En primer lugar a Asun y a Carmen por su ayuda y dirección en la realización de este trabajo y, especialmente, por estar dispuestas a modificar sus horarios para poder ajustarlos al mío.

A la Universidad Pública de Navarra, y en especial al departamento de Química Aplicada, por poner a mi disposición los equipos y medios necesarios para la realización de este trabajo fin de máster.

A la bodega Señorío de Sarria por su colaboración en este trabajo. En especial a Milagros por su ayuda en la toma de muestras y su apoyo al proyecto.

A Icer Rail por darme la flexibilidad horaria que requería para poder compaginar mi trabajo en la empresa con la realización de este máster. A mis compañeros por su apoyo durante estos dos años, en especial a Alberto por mantenerme cuerda en toda esta locura y a Juantxo por hacerme reír en incluso en los peores días.

A mis amigas por hacerme desconectar y olvidarme de los problemas que han surgido durante los últimos meses. Raquel, Isa y Natalia, sin vosotras mi vida sería muchísimo más triste y aburrida.

A mi familia por apoyarme en todo lo que hago. A mis “nenes” preferidos por hacer que los domingos se conviertan en uno de los mejores días de la semana. A mi hermano, y a Uxua, por ayudarme cuando más lo he necesitado. Tato no hay palabras con las que expresar el agradecimiento que siento por tu constante ayuda.

A mis padres, por estar siempre ahí para sostenerme y no dejarme caer, por sufrir conmigo cada uno de mis tropiezos como si fueran suyos, y por disfrutar cada uno de mis logros como si fuesen su mayor victoria. A vosotros os debo todo lo que soy.

Y por último, a Rubén por su apoyo constante durante estos 8 años, y en especial por su paciencia estos tres últimos soportando mis ataques de nervios y que me quedarse dormida en mitad de cualquier conversación.

A mis abuelos
Micaela y Joaquín

ÍNDICE

INDICE

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVO	3
I.1. INTRODUCCIÓN	3
I.1.1. SO ₂ como conservante del vino y alternativas para su sustitución	3
I.1.2. Aminas en el vino	8
I.1.3. Compuestos volátiles en el vino	13
I.2. OBJETIVOS	19
II. MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES	23
II.1. MUESTRAS UTILIZADAS	23
II.2. PARÁMETROS ENOLÓGICOS GENERALES	24
II.3. DETERMINACIÓN DE AMINAS POR HPLC	24
II.3.1. Reactivos	25
II.3.1.1. Preparación de la muestra y de las rectas de calibrado	25
II.3.1.2. Análisis cromatográfico	26
II.3.2. Preparación de la muestra y de las rectas de calibrado	26
II.3.3. Análisis cromatográfico	27
II.3.3.1. Condiciones cromatográficas	27
II.3.3.2. Identificación y cuantificación de aminas	28
II.3.3.3. Precisión y exactitud del método	29
II.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE ORIGEN FERMENTATIVO	30
II.4.1. Reactivos	30
II.4.1.1. Preparación de la muestra y de las rectas de calibrado	30
II.4.2. Preparación de la muestra y de las rectas de calibrado	31
II.4.3. Análisis cromatográfico	33
II.4.3.1. Condiciones cromatográficas	33
II.4.3.2. Identificación y cuantificación de compuestos volátiles	33
II.4.3.3. Precisión y exactitud del método	35

III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
III.1. PARÁMETROS ENOLÓGICOS GENERALES	39
III.2. EVOLUCIÓN DE LAS AMINAS BIÓGENAS	40
III.3. EVOLUCIÓN DE LAS AMINAS VOLÁTILES	44
III.4. EVOLUCIÓN DE LOS COMP. VOLÁTILES DE ORIGEN FERMENTATIVOS	50
III.4.1. Alcoholes superiores	50
III.4.2. Esteres	53
III.4.3. Ácidos	55
III.4.4. Compuestos carbonílicos y otros compuestos volátiles del vino	58
IV. CONCLUSIONES	63
V. REFERENCIAS	67
VI. ANEXOS	77
VI.1. ANEXO 1: TABLAS DE RESULTADOS	77
VI.2. ANEXO 2: ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ANALIZADOS	80

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I.1. INTRODUCCIÓN

Una de las bebidas más producidas y consumidas desde la antigüedad es el vino. Para su correcta conservación es necesario añadirle sustancias conservantes, como el SO_2 , utilizado desde tiempos inmemoriales y que actualmente sigue siendo el más utilizado (Peynaud, 1993) ya que, a día de hoy, no se le ha encontrado sustituto. Este compuesto, actúa como agente reductor, protegiendo al vino de oxidaciones enzimáticas y no enzimáticas, previniendo de esta forma la aparición de colores pardos tanto en vinos tintos como en blancos, y como conservante, evitando el crecimiento de bacterias indeseables como las acéticas (Farbas, 1988). Sin embargo, también puede generar problemas en las características sensoriales del vino, y sobre la salud del ser humano, además de poseer un carácter acumulativo en el organismo. Como consecuencia de estos hechos, durante los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre distintas alternativas para su total, o al menos parcial, sustitución.

Por otro lado, las características organolépticas del vino vienen determinadas por la presencia y la concentración de distintos compuestos que tienen su origen en las distintas etapas del metabolismo de las levaduras presentes en el vino, incluyendo reacciones de desaminación, descarboxilación y transaminación. Es importante pues conocer la naturaleza y concentración de dichos compuestos ya que pueden dar lugar a cualidades apreciables dentro del vino, o bien producir efectos indeseables respecto a su calidad. Los grupos de compuestos con mayor relevancia son las aminas y los compuestos volátiles.

I.1.1. SO_2 como conservante del vino y alternativas para su sustitución

El SO_2 es un compuesto químico que se encuentra en estado gaseoso en condiciones normales y posee un olor asfixiante muy característico. Sin embargo, desde finales siglo XVIII su uso como conservante se ha generalizado (Guerrero y Cantos-Villar, 2015).

En el vino, el dióxido de azufre se presenta libre o combinado con otros constituyentes del vino (figura I.1). Se entiende como SO_2 libre a la fracción de compuesto que se puede determinar mediante una valoración directa con yodo en un vino acidificado. La parte menos abundante es la que posee poder antiséptico, y el característico olor del azufre. Se conoce como

SO₂ activo y se encuentra en estado gas disuelto en el medio. Sin embargo, la mayor parte del dióxido de azufre libre se encuentra en forma de sales ácidas o bisulfitos y, aunque es inodora, apenas tiene capacidad antiséptica, al menos sobre las levaduras. La proporción en que se encuentra ésta fracción en el vino depende del pH del mismo, es decir, de su acidez.

Por otro lado está la fracción de SO₂ combinado. En general, el dióxido de azufre se combina con compuestos carbonílicos, formando dos tipos de combinaciones; una estable por reacción con acetaldehído, y otra inestable por reacción con azúcares, ácidos cetónicos y urónicos... Esta última es reversible y posee una fuerte constante de disociación, lo que hace que las combinaciones inestables actúen como reserva de SO₂, disociándose a medida que el producto libre se consume por oxidación.

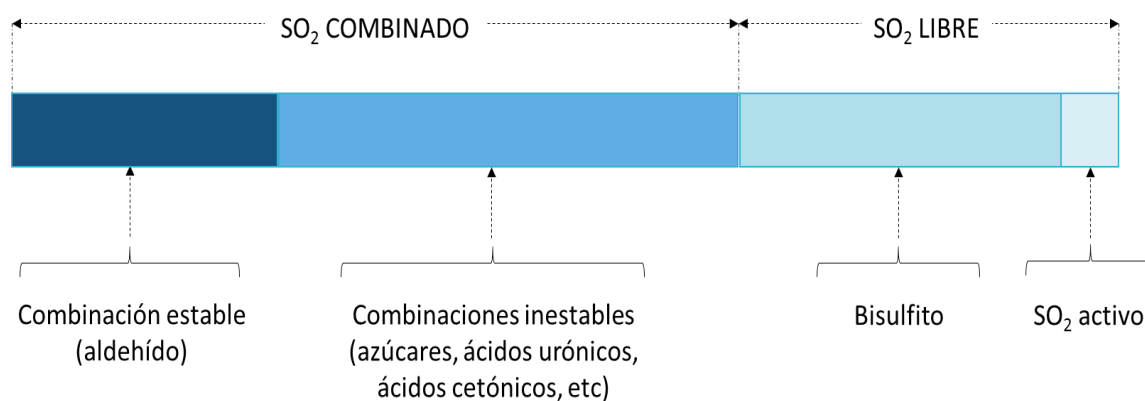


Figura I.1 Distribución del SO₂ disuelto en el vino (tomado de Peynaud, 1993)

A la suma del SO₂ libre y SO₂ combinado se le denomina SO₂ total. Debido a estas combinaciones y fracciones en que se presenta el compuesto, el cálculo de la cantidad de SO₂ total que es necesario añadir para la conservación de un vino es complicado. Su concentración suele ser de mg/L. En el mercado se puede encontrar el SO₂ en sus tres estados de agregación, sin embargo, son las formas sólida y gaseosa las que más empleadas como conservante. En el caso de la forma gaseosa se utilizan bombonas de SO₂ comprimido, y en el caso de la forma sólida como K₂SO₅, que en contacto con un medio ácido, como lo es el vino, da lugar a SO₂.

Sus múltiples propiedades beneficiosas hacen que se utilice como conservante del vino. En primer lugar, actúa como agente antioxidante inactivando las enzimas causantes del oscurecimiento del vino así como las reacciones de Maillard. Además reacciona directamente con el O₂ y el peróxido de hidrógeno disuelto, y reduce las quinonas a su forma fenólica. Sin embargo, la eficacia de toda esta actividad está condicionada al pH del medio, siendo menor al

umentar dicho parámetro. Por otro lado, el SO_2 actúa como agente antimicrobiano inhibiendo el desarrollo de bacterias lácticas y en menor medida el de las acéticas. De este modo consigue evitar los problemas conocidos como “enfermedad láctica” y “picado acético”. Además previene la formación de etilfenoles que aportan olores desagradables al producto. Pero, como en el caso anterior, su efectividad está condicionada por el pH del medio.

Está claramente demostrada también la efectividad del dióxido de azufre para la extracción de minerales, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos de la materia sólida del vino. Sin embargo, el tiempo de acción es muy limitado ya que es la fracción de SO_2 libre la que actúa y reacciona muy rápidamente con las uvas ya prensadas. El dióxido de azufre utilizado en la proporción adecuada, mejora las características organolépticas del vino reaccionando con el acetaldehído (compuesto que rebaja la calidad del producto final) y minimizando la pérdida de color al reducir la polimerización fenólica. Por otro lado, si se añade una cantidad excesiva el SO_2 produce mal olor en el vino al generar derivados azufrados.

A pesar de sus características positivas, se sabe que el SO_2 tiene efectos tóxicos sobre la salud del ser humano, atacando especialmente a personas con problemas asmáticos (Vally et al., 2001). Mientras que una persona sin problemas respiratorios puede tolerar una ingesta de hasta 5 ppm de SO_2 , ingestas menores de este compuesto provocaría problemas a entre un 3 y un 10% de los adultos asmáticos. Dichos problemas puede tener diversa sintomatología como dermatitis, urticaria, dolor abdominal, diarrea, broncoconstricción o anafilaxis (Vally et al., 2009; Vally et al. 2012).

Como consecuencia de esto, muchos países han establecido distintas regulaciones sobre las cantidades permitidas de SO_2 en el vino. Así en Europa aquellos vinos con más de 10 mg de SO_2 /L deben indicarlo en la etiqueta, permitiéndose una cantidad máxima de 200 mg/L. Por su parte en Canada y Australia el límite es 350 mg/L. La OIV (Organización Mundial de la Viña y el Vino) ha establecido valores recomendados en función del tipo de vino y la OMS (Organización mundial de la Salud) ha recomendado reducir su uso por sus efectos negativos sobre la salud (Guerrero y Cantos-Villar, 2015).

Debido a los problemas que supone su uso y a las recomendaciones de las distintas organizaciones internacionales, desde hace casi 10 años los estudios sobre posibles alternativas, totales o parciales, al SO_2 se han multiplicado. Se han utilizado métodos tanto físicos como químicos. Los métodos físicos, considerados métodos verdes, se caracterizan por ser técnicas en

las que no se añade ningún compuesto adicional al vino. Se pueden destacar el uso de pulsos eléctricos, luz ultravioleta y ultrasonidos. Los métodos químicos por su parte, consisten en añadir un compuesto diferente para sustituir al dióxido de azufre total o parcialmente. Se pueden destacar, entre otros, el uso de extracto de rábano negro con ácido ascórbico (Salaha et al., 2008), con el que se obtuvieron resultados bastante satisfactorios, ya que si bien no se podía utilizar como un sustituto total, sí permitía la producción de vino de suficiente calidad como para poder comercial con él.

Se ha estudiado bastante el uso de enzimas como la lisozima, sola o acompañada de un segundo producto. Usando lisozima con taninos enológicos; se observó que si bien en el análisis sensorial se apreciaba cierta diferencia respecto al control, parecía ser una propuesta prometedora (Sonni et al., 2009). Estudios posteriores concluyeron que los taninos no parecían afectar al desarrollo de las aminas biógenas, pero que favorecían la formación de ésteres. Sin embargo, la lisozima sí afectaba a las aminas pero de diferente manera en función de la cepa de levadura utilizada (Cejudo-Bastante et al., 2010; Sonni et al., 2011). Más recientemente, Nieto-Rojo et al. (2015) realizaron un estudio comparativo utilizando lisozima, dimetil dicarbonato (DMDC), SO_2 y combinaciones de este último con los dos anteriores. Las conclusiones de este estudio fueron muy positivas, ya que las combinaciones de bajas concentraciones de SO_2 tanto con lisozima como con DMDC produjeron una mayor concentración de compuestos volátiles en el vino final y una mejor calidad sensorial del mismo, manteniendo valores normales en los parámetros enológicos generales.

Izquierdo-Cañas et al. (2012) utilizaron un complejo de plata coloidal (CSC) como alternativa conservante al SO_2 tanto de vinos tintos como blancos. Se demostró la importante capacidad antimicrobiana de este conservante consiguiendo mantener las características organolépticas del vino en general, ya que aunque aparecían pequeñas diferencias en las proporciones de los compuestos volátiles, eran estadísticamente insignificantes. Sin embargo, sí se observó una modificación en el color de los vinos blancos.

El uso de dos extractos fenólicos, de hoja de eucalipto y de la piel de la almendra, cuya actividad antimicrobiana se había constatado con anterioridad, junto con concentraciones bajas de SO_2 en un vino Verdejo (González-Rompinelli et al., 2013) dieron lugar a diferencias en las concentraciones de ésteres y de compuestos furánicos, aunque tan sólo algunas pudieron ser detectadas por el olfato humano. Además, tras el ensayo sensorial no se apreciaron diferencias significativas entre las muestras tratadas con y sin extractos fenólicos.

También se ha estudiado como posible sustituto del SO₂ el uso de un extracto del residuo obtenido en las almazaras (Ruiz-Moreno, 2015). Se trata de un extracto enriquecido en hidroxitirosol, un compuesto fenólico presente en la oliva y sus derivados. Se demostró su actividad antioxidante y antimicrobiana aunque en una primera aproximación se observó una menor eficacia que la del SO₂ como conservante. Estudios posteriores en vino blanco y tinto por separado concluyeron que, en ambos vinos, el hidroxitirosol no sirve como conservante ya que modifica tanto el color como las características sensoriales del producto, aunque se mantuvieron la composición volátil y los parámetros enológicos generales (Rasposo et al., 2016).

El ácido ascórbico se ha utilizado desde hace años como coadyuvante auxiliar del dióxido de azufre. Su beneficio radica en que reacciona con el O₂ libre, pero lo hace durante un breve lapso de tiempo por lo que sólo tiene interés durante el embotellado (Peynaud, 1993). Se ha demostrado que la combinación de SO₂ con ácido ascórbico junto con metales favorece la reacción del dióxido de azufre con el O₂ libre. Se observa una proporción SO₂:O₂ libre de 2:1 cuando no se añade nada, pasando a 1,7:1 con la presencia de ácido ascórbico y reduciéndose hasta alcanzar la proporción 1:1 cuando además del ácido ascórbico se añaden metales (Barril et al., 2012). Otro coadyuvante auxiliar del vino ha sido el ácido sórbico que inhibe la proliferación de levaduras. Sin embargo en las cantidades autorizadas no actúa como antibacteriano y, si se degrada, genera un olor desagradable.

Recientemente se ha estudiado el uso de un extracto de estilbeno en vino tinto (Rasposo et al., 2016). En este estudio se comparan también dos procesos de vinificación diferentes. El conservante no produjo diferencias en las características de los vinos hasta el embotellado. Sin embargo, en el análisis realizado 12 meses después del embotellado se apreció una oxidación importante en el vino con el conservante alternativo y una importante diferencia en el análisis sensorial entre el vino control y el del extracto de estilbeno.

En resumen, actualmente se están llevando a cabo diversos estudios con distintas propuestas alternativas al SO₂ para la conservación del vino. Hasta la fecha parece que los estudios más esperanzadores son los del uso de una suspensión coloidal de plata y la combinación de bajas concentraciones de SO₂ con lisozima o con dimetil dicarbonato

I.1.2. Aminas en el vino

Las aminas son bases orgánicas nitrogenadas de bajo peso molecular que se generan durante procesos durante metabólicos en distintos seres vivos, lo que hace que estén presentes en diversos alimentos, especialmente en aquellos producidos mediante fermentación como cerveza, vino o queso. Dependiendo de su nivel de volatilidad, las aminas se pueden diferenciar en dos grupos, las fijas o no volátiles y las volátiles.

El primer grupo coincide en su totalidad con el grupo de aminas biógenas (con la falta de feniletilamina que es volátil) que son quienes presentan actividad biológica. En el vino, las aminas fijas más comunes son histamina, tiramina, putrescina, cadaverina, espermina y espermidina, de las cuales la más abundante suele ser la putrescina. Esporádicamente también se han encontrado otras aminas como agmatina, triptamina y serotonina (Lehtonen et al., 1992; Busto et al., 1995; Lehtonen, 1996; Souflreos et al., 1998). Por otro lado, las aminas volátiles que aparecen en el vino son, entre otras, feniletilamina, metilamina, dimetilamina, etilamina, dietilamina, isopropilamina, isobutilamina, amilamina, pirrolidina, etanolamina y hexilamina (Ough et al., 1981; Ough y Daudt, 1981; Busto et al., 1995).

Las aminas biógenas, constituidas por las aminas fijas junto con la feniletilamina (volátil), tienen su origen en la descarboxilación de aminoácidos, llevada a cabo por las bacterias lácticas y en menor proporción por las levaduras (ten Brink et al., 1990). Habitualmente, su concentración, aunque variable, es baja tanto en uva como en mosto (Radler y Fäth, 1991). Pequeñas concentraciones de putrescina y espermidina, imprescindibles para el funcionamiento celular (Silla-Santos, 1996), se han encontrado en mosto (Gonzalez-Marco et al., 2006).

Las aminoácido descarboxilasas, enzimas de origen microbiano, catalizan la reacción de descarboxilación (Halász et al., 1994). Por tanto, para la formación de estas aminas en el vino es necesario que exista disponibilidad de aminoácidos precursores libres, presencia de microorganismos con capacidad descarboxilasa y que además, las condiciones del medio favorezcan el crecimiento de dichos microorganismos así como las síntesis y actividad de las enzimas aminoácido descarboxilasas. En el caso de bacterias lácticas, se ha observado que los sistemas de descarboxilación pueden cumplir dos funciones distintas, bien proporcionar energía metabólica, o bien regular el pH intracelular mediante la translocación de cargas a través de la membrana plasmática (Molenaar et al., 1993; Konings et al., 1997; Abe et al., 2002).

Por eso, sería lógico pensar que un aumento de la concentración de aminoácidos precursores favorecería la formación de este tipo de aminas. Sin embargo, parece no existir una relación directa entre la formación de aminas biógenas y el aumento de las concentración de dichos aminoácidos durante la fermentación alcohólica (Ancín et al., 2004; Gonzalez-Marco et al., 2006), pero sí se observa relación tras la fermentación maloláctica. Un incremento de putrescina, histamina y tiramina durante esta fermentación se relacionó con la disminución de sus aminoácidos precursores (Herbert et al., 2005; Martín-Álvarez et al., 2006). En la figura I.2 se detallan los aminoácidos precursores de este tipo de aminas:

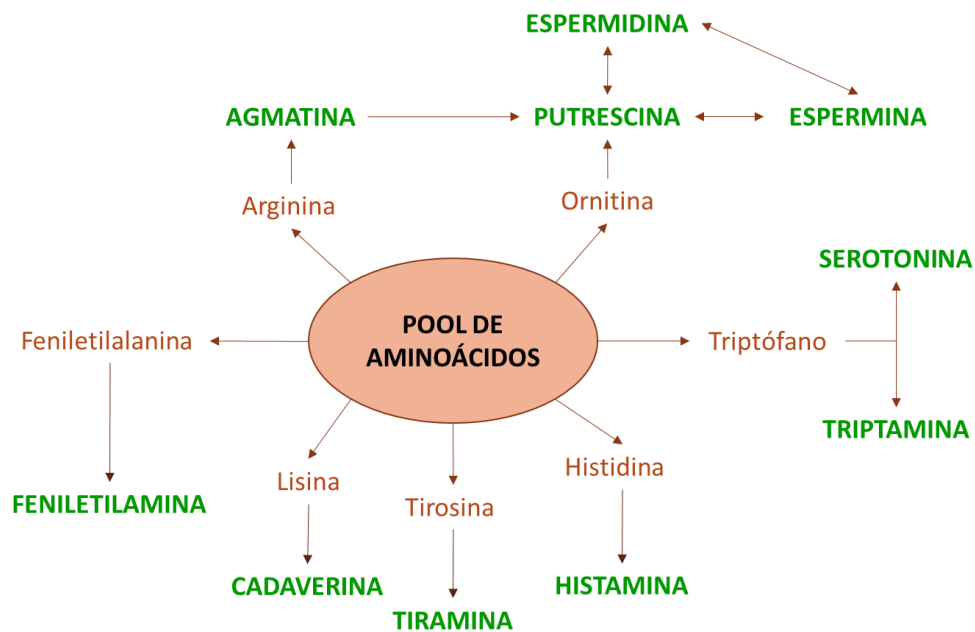


Figura I.2 Aminoácidos precursores de aminas biógenas

Las aminas volátiles, con excepción de la feniletilamina, han sido hasta la fecha mucho menos estudiadas que las biógenas. Estas aminas se originan en reacciones de aminación y transaminación de compuestos no nitrogenados como aldehídos y cetonas (Ough et al., 1981). Son aminas que se encuentran ya en la uva (Ough et al., 1981; Mayer y Pause, 1987), pero durante el proceso de vinificación pueden modificar su concentración al producirse más o degradarse las existentes (Ough y Daudt, 1981; Lonvaud-Funel, 2001). Según Ough y Daudt (1981) la concentración de estas aminas desciende durante la fermentación alcohólica, lo que podría deberse a que las levaduras podrían utilizar estos compuestos como fuente de nitrógeno para su desarrollo.

La formación de aminas está condicionado por numerosos factores que pueden tener mayor o menor influencia, por lo que su concentración en los vinos puede ser muy diferente de unos a otros (Soufleros et al., 1998). Uno de los factores que más influyen en el contenido final de aminas en el vino es el contenido de compuestos nitrogenados de la uva, lo que a su vez depende de diversos factores como son el origen geográfico, las condiciones climáticas, la fertilización nitrogenada del suelo y/o el grado de maduración de la propia uva. Bertrand et al. (1991) observaron que aplicando un exceso de abono nitrogenado en el suelo se podía llegar a doblar la concentración de aminas biógenas en el vino final, especialmente de histamina.

Otro factor importante que influye en la formación de aminas es el método de vinificación que se utiliza. La putrescina es, en general, la amina mayoritaria en cualquier tipo de vino (Lehtonen, 1996; Gloria et al., 1998, Torrea et al., 2002). Por otro lado, los vinos tintos presentan una concentración de aminas mayor que los rosados o blancos (Zee et al., 1983; Radler y Fäth, 1991). Se ha observado que se favorece la formación de aminas aumentando el tiempo de maceración con las partes sólidas de la uva, mediante una criomaceración y utilizando mayores temperaturas de fermentación, mientras que el uso de bentonita o la aplicación de un tratamiento térmico a las uvas tras su prensado inhibe la formación de estos compuestos (Iñigo y Bravo, 1980; Vidal-Carou y Mariné-Font, 1985; Kovacevic Ganic et al., 2009).

Como ya se ha comentado, durante la fermentación alcohólica se produce un menor aumento en la concentración de aminas, y es en la maloláctica donde este aumento es más importante. Varios autores (Straub et al., 1995; Silla-Santos, 1996; Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Lonvaud-Funel, 2001; Torrea y Ancín, 2002) han defendido que la capacidad de producir aminas tanto en el caso de las bacterias como en el de las levaduras, depende más de la cepa que de la especie. Además, se han estudiado otros factores que podrían afectar a la concentración de aminas durante ambas fermentaciones como la temperatura, el pH, la acidez volátil, la turbidez y la concentración de SO₂. El papel de la temperatura ya se ha comentado. Durante la fermentación maloláctica, pH básicos o ligeramente ácidos contribuyen a la síntesis de aminas al intervenir positivamente en el desarrollo de las cepas bacterianas que las producen (Aerny, 1990). La turbidez no parece afectar a la concentración de aminas (Jimenez-Moreno y Ancín-Azpilicueta, 2004), mientras que la concentración de SO₂ sí parece tener un papel importante. Vidal-Carou et al. (1990) observaron que bajas concentraciones de SO₂ favorecía altas concentraciones de aminas. Sin embargo, altas concentraciones de SO₂ no consiguen evitar la formación de aminas (Bauza et al., 1995).

Aunque el envejecimiento del vino se ha estudiado menos que las fermentaciones, Jiménez-Moreno et al. (2003) observaron pequeñas variaciones en la concentración de aminas durante este proceso. Al estudiar la evolución de la concentración de aminas biógenas en un vino tinto Merlot durante el envejecimiento en barricas de roble de distinto origen geográfico, observaron que putrescina, histamina y tiramina aumentaban su concentración durante el proceso aunque, al final del periodo (243 días), las dos últimas aminas sufrían cierta degradación.

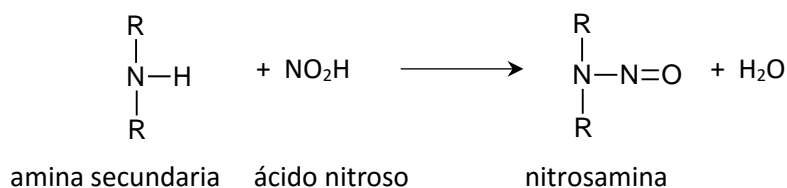
Algunas de las aminas biógenas como la histamina, la tiramina o la feniletilamina son tóxicas para el organismo. La histamina suele utilizarse como indicador de frescura y calidad en diversos alimentos y es la que más se ha estudiado. Se encuentra de modo natural en la sangre, en concentraciones de entre 25 a 130 mg/L (Cardona-Gálvez y González-Domínguez, 2005). Esta amina se libera en algunos tejidos como consecuencia de una inflamación o de una hipersensibilidad alérgica presentando una importante actividad vasodilatadora que produce la caída de la presión arterial (Rice et al., 1976). Asimismo puede producir enrojecimiento facial, vómitos, diarreas, dolores de cabeza, picores de garganta... (Silla-Santos, 1996). Debido a estos efectos varios países han establecido límites de tolerancia para esta amina en los alimentos.

La tiramina y la feniletilamina producen una acción vasoconstrictora, pero cada una por una causa diferente. En el caso de la feniletilamina se produce por una liberación de norefedrina (Radler y Fäth, 1991), lo que también puede dar lugar a migrañas tras ingestas de pequeñas cantidades (3 mg) de este compuesto (Sandler et al., 1974). En el caso de la tiramina, la acción vasoconstrictora se debe a la liberación de noradrenalina (Forysthe y Redmon, 1974) que produce un aumento de la presión arterial. Además, la tiramina puede reaccionar con medicamentos inhibidores de la actividad de la monoamino oxidasa (MAO) pudiendo producir crisis hipertensivas (Mariné-Font, 1978). Para que se produzcan dichos efectos, las ingestas deben ser mayores que en el caso de la feniletilamina, entre 10-80 mg pueden producir efectos adversos en el consumidor, y por encima de los 100 mg pueden causar migrañas (Askar y Terptow, 1986). A diferencia de la histamina, no se han establecido límites de tolerancia para tiramina y feniletilamina en los alimentos.

Las poliaminas, entre las que se incluyen putrescina, cadaverina, espermidina y espermina, son necesarias para los tejidos en crecimiento ya que se les atribuyen numerosas funciones en el metabolismo y crecimiento celular (Bardócz, 1989). Si bien las células tienen la capacidad de sintetizarlas, aparentemente la dieta parece ser su fuente principal. Estos

compuestos no presentan actividad tóxica directa, sin embargo tienen una toxicidad indirecta ya que reducen la acción de los enzimas monoamino oxidasa (MAO) y diamino oxidasa (DAO), encargados de la degradación de histamina, tiramina y feniletilamina, favoreciendo una acumulación de las mismas. El consumo de otros compuestos como etanol y acetaldehído también puede reducir la actividad de MAO y DAO (Cardona-Gálvez y González-Domínguez, 2005).

Las aminas que tienen en su estructura grupos amino secundarios como pirrolidina, dimetilamina, espermidina o espermina, pueden reaccionar con ácido nitroso y/o con sus sales produciendo nitrosaminas que son compuestos con actividad carcinogénica, mutagénica y teratogénica (Scandal et al., 1982, Glória et al., 1997). Si bien el vino apenas contiene nitritos (Ough y Crowell, 1980) estas sales pueden llegar al tracto intestinal como consecuencia de la ingestión de otros alimentos como carnes o verduras, y reaccionar con las aminas secundarias, como se observa en el esquema I.1, en una reacción catalizada por enzimas de la propia flora intestinal (Allison y McFarlane, 1989).



Esquema I.1 Esquema de la formación de nitrosaminas

Mientras que las aminas biógenas presentan efecto toxicológico, las aminas volátiles participan del efecto sensorial. Son compuestos que afectan negativamente al aroma del vino ya que estas aminas tienen aromas intensos y característicos, generalmente, desagradables. El pH ácido del vino hace que se presenten en forma de sales inodoras, sin embargo en boca pueden liberarse parcialmente llegando a la mucosa olfativa por vía retronasal (Lehtonen, 1996). Palamand et al. (1969) estudiaron como afectaban las concentraciones de las distintas aminas volátiles al aroma de la cerveza determinando umbrales de percepción, y junto a Slaughter y Uvgart (1971) estipularon que elevadas concentraciones de dichas aminas están asociadas a una disminución aromática y la aparición de un aroma desagradable o ligera aspereza en la cerveza. En el vino, debido al alcohol y al resto de compuestos aromáticos es necesaria una cantidad de aminas mayor que en la cerveza para percibir este defecto (Augh y Daudt, 1981). Palamand (1969) estableció los límites de concentración de cada amina para que estas afecten al aroma de la cerveza. A pesar de la escasez de estudios en este campo, diversos autores coinciden en

que la única amina que puede superar dichos límites, y por tanto afectar al aroma, es la dietilamina (Ough y Daudt, 1981; Torrea y Ancín, 2002, Jiménez et al., 2003).

Debido a los problemas que estos compuestos pueden generar, así como a la importancia que tienen en la evolución del vino se ha considerado importante la optimización de métodos de medida que permitan monitorizar estos compuestos. Así Wang et al. (2014) optimizaron un nuevo método utilizando HPLC para la determinación conjunta de aminoácidos y aminas biógenas durante la fermentación del vino con una duración de análisis de 30 minutos. Por su parte, Petri et al. (2015) pusieron a punto un nuevo método todavía más rápido que permite obtener el cromatograma de estas aminas en sólo 13 minutos, con el ahorro energético y de reactivos que ello conlleva. Este método permite la detección de aminas biógenas tanto en vino como en distintos zumos.

I.1.3. Compuestos volátiles en el vino

En lo que respecta a la calidad del vino el aroma es un factor crucial, y es consecuencia de la interacción entre sus constituyentes y los sentidos de gusto y olfato. Los compuestos volátiles que se producen en la fermentación del vino son los causantes del olor (Rapp y Versini, 1991), mientras que las sensaciones gustativas son producidas por los compuestos no volátiles como azúcares, polifenoles, ácidos orgánicos o sustancias minerales. En el vino existen más de 800 compuestos volátiles en distintos rangos de concentración, la mayoría de ellos por debajo de los límites de percepción humana por lo que si se considerasen individualmente no repercutirían en las características sensoriales del vino, pero al considerarse conjuntamente pueden llegar a ser muy significativos en el aroma global (Jackson, 1994).

Gran parte de los compuestos que influyen en el aroma del vino se producen durante la fermentación. Durante este proceso se modifican las condiciones del medio, lo que conlleva un aumento de la complejidad química y aromática del vino como consecuencia de la extracción y modificación de compuestos de la parte sólida de la uva y de la producción de metabolitos por las levaduras. En la figura I.3, se muestra, de manera esquemática, la ruta de biosíntesis de los compuestos volátiles del vino, incluyendo las rutas metabólicas que generan los ácidos grasos, ésteres, acetaldehídos y alcoholes superiores, por acción del metabolismo de las levaduras.

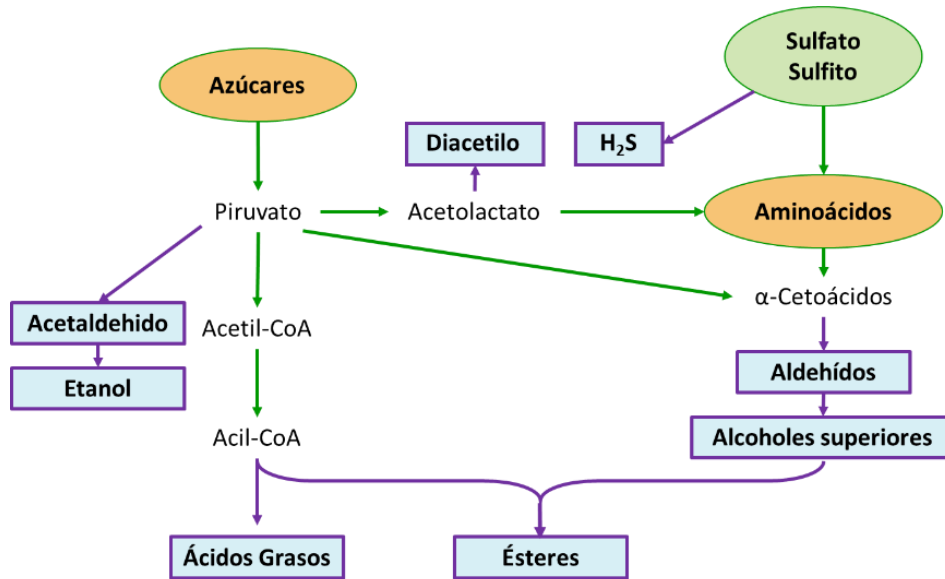


Figura I.3 Origen de los componentes del aroma del vino a partir de azúcares, aminoácidos y metabolismo del azufre de las levaduras (tomado de Henske y Jiranek, 1993)

A continuación se comentarán las características de cada uno de los grupos de compuestos volátiles de origen fermentativo por separado clasificados en función de su grupo funcional principal:

a) *Etanol y alcoholes superiores*

El etanol es el principal subproducto de la fermentación alcohólica. Este alcohol es crítico para la conservación y la estabilidad del vino, así como para la definición de sus propiedades sensoriales, pudiendo llegar a representar entre un 14-15%(v/v) del total. El etanol incrementa la sensación dulce en el vino, modificando también la percepción de la acidez. Actúa además como disolvente en la extracción de taninos y pigmentos durante la vinificación y la maduración del vino en barricas, y su concentración puede limitar el crecimiento de microorganismos. Durante el envejecimiento del vino interviene como materia prima para la generación de ésteres o acetales. Cabe destacar que combinado con la acidez, y en ausencia de oxígeno, favorece la conservación del vino durante años (Lea y Arnold, 1978).

Los alcoholes superiores están constituidos por cadenas carbonadas con más de dos átomos de carbono y son el grupo cuantitativamente más extenso de los compuestos aromáticos del vino. En él se incluyen los alcoholes alifáticos (n-propanol, isobutanol, alcoholes isoamílicos, n-hexanol) y aromáticos (2-feniletanol, tirosol, triptofol, alcohol bencílico). Estos alcoholes, que pueden reconocerse por un olor y sabor fuertes, realizan un aporte positivo al aroma del vino en concentraciones moderadas (< 0.3mg/L). Cuando su concentración es mayor, su aroma enmascara el del vino empeorando las características sensoriales del mismo (Rapp y

Mandery, 1986). Dentro de este grupo se encuentran también los alcoholes polihidroxiados como el 2,3-butanodiol (generado tras la reducción de la 3-hidroxi-2-butanona) que no tiene una gran influencia sobre olor pero sí sobre el sabor como consecuencia de su gusto ligeramente amargo y dulce al mismo tiempo (Herold et al., 1995). Estos compuestos pueden afectar también a la viscosidad del vino (Romano, 1997).

Estos alcoholes se producen por el metabolismo de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Estos microorganismos utilizan como fuente de nitrógeno el grupo amino de los aminoácidos y mediante una desaminación generan esqueletos carbonados que pueden excretarse en forma de α -cetoácidos o descarboxilarse dando lugar a su correspondiente aldehído, que posteriormente mediante una reacción de reducción dará lugar al alcohol (Rapp y Versini, 1991). En ausencia de los aminoácidos adecuados, por ejemplo al principio de la fermentación, puede ocurrir que los α -cetoácidos y sus correspondientes alcoholes superiores se formen a partir de la propia glucosa vía piruvato (Henske y Jiranek, 1993).

La proporción de alcoholes generados por una u otra vía depende, entre otros factores, de la cepa de levadura que actúe durante la fermentación, la temperatura del proceso, el pH del mosto, el grado de aireación y el nivel de sólidos presentes en el medio (Crowell y Guymon, 1963; Rankine, 1967; Zeeman et al., 1982; Ciolfi et al., 1985; Klingshirm et al., 1987). Otros dos factores importantes que influyen en la concentración final de alcoholes superiores en el vino, son la variedad y el grado de madurez de la uva así como la concentración de aminoácidos en el medio.

b) Ésteres

Cualitativamente, este es el grupo más amplio, dentro de los compuestos volátiles de origen fermentativo del vino, con más de 160 compuestos diferentes identificados. Su contribución a las características sensoriales del vino es importante ya que poseen un olor agradable, aunque es complicado asignar una propiedad particular del aroma del vino a un éster individualmente.

Pueden clasificarse de varias formas, atendiendo a su estructura química pueden ser ésteres alifáticos y ésteres aromáticos; mientras que teniendo en cuenta el ácido graso del que provienen pueden distinguirse ésteres de ácido mono, di o tricarbóxico y de hidroxilo u oxoácido. Dentro del grupo de los monocarbóxicos, los más importantes son los de ácido saturado (hexanoico, octanoico y decanoico) y etanol, y los de ácido acético y alcoholes superiores

(isobutanol, isoamílicos, 2-feniletanol...). Estos últimos son considerados con frecuencia constituyentes importantes del aroma del vino (Shinohara et al., 1994). A medida que aumenta la cadena carbonada del resto ácido el olor pasa de frutal a jabonoso; así el acetato de isobutilo posee un olor similar al de la piña, el acetato de 2-feniletilo posee un aroma más floral que recuerda a la rosa o el jazmín y los ésteres de ácidos hexadecanoico y octadecanoico poseen olores más similares al tocino. El acetato de etilo es el éster cuantitativamente más abundante en el vino. Se considera que su aportación al aroma del vino es positiva cuando no excede de 50 mg/L, pero a partir de los 150 mg/L aporta un aroma avinagrado desagradable (Ribéreau-Gayon, 1978; Amerine y Roessler, 1983). Por su parte, los ésteres derivados de ácidos di o tricarbónicos, como malatos, tartatos o succinatos no poseen olores demasiado intensos por lo que no suponen una gran aportación al aroma final del producto. En el caso de los hidroxí y de los oxoácidos su baja volatilidad hace que tengan poco impacto sensorial.

Los ésteres, así como los alcoholes, se producen por acción de las levaduras durante la fermentación alcohólica, aunque los ésteres se generan sobre todo en la parte final de esta etapa ya que su formación está inhibida por la presencia de oxígeno en el medio (Jackson, 1994). Según Nordström (1964), se forman a través de un conjunto de reacciones que comienza cuando las levaduras generan acetil-CoA, bien a través de la activación de ácidos grasos, o mediante de la descarboxilación oxidativa de un cetoácido. La diferencia principal entre estas dos vías radica en que la primera requiere ATP y la segunda no. Para llevar a cabo el alargamiento de la cadena carbonada de la parte ácida inicialmente se genera malonil-CoA, a partir de acetil-CoA y CO₂. Seguidamente se produce una reacción entre el malonil-CoA y el acil-CoA catalizada por un complejo enzimático denominado ácido graso sintetasa (FAS), que proporciona dos átomos de carbono a la cadena inicial. Esta etapa es la misma en la síntesis de ácidos que en la de ésteres. La etapa final de este proceso es la esterificación de los compuestos del acil-CoA que se produce por la presencia de un alcohol en el medio. Esta ruta metabólica genera tan sólo ácidos y ésteres de cadenas con un número par de carbonos. La producción de ésteres por parte de las levaduras depende de varios factores, entre otros, de la temperatura, las cepas de levadura, el oxígeno disuelto en el medio, la turbidez del mosto y la concentración de SO₂. Una baja concentración de SO₂ junto con la clarificación del vino ayuda a la síntesis de ésteres y a su retención en el vino (Boulton et al., 1995).

Posteriormente, la síntesis de ésteres continúa por reacciones no enzimáticas que forman parte del envejecimiento del vino. Dichas reacciones están supeditadas a la composición del vino y a las condiciones de almacenamiento (Rapp y Güntert, 1986).

c) *Ácidos*

La acidez del vino se puede separar en dos categorías, volátil y fija. Se entiende por acidez volátil a la que depende de los ácidos que pueden destilarse fácilmente por arrastre de vapor (desde el fórmico hasta el butírico), y por acidez fija a aquella producida por ácidos no volátiles (tartárico, málico, cítrico, isocítrico, fumárico y ácidos orgánicos). El ácido acético es cuantitativamente, el más importante de los ácidos volátiles.

A diferencia de los alcoholes, la fermentación no tiene un gran efecto sobre la acidez del vino, pero favorece el aumento de la variedad de los ácidos presentes que, posteriormente, pueden afectar al desarrollo del aroma final tras el envejecimiento. Esto se debe a que los ácidos participan en las reacciones de ésterificación y a que además la acidez favorece las reacciones de reducción durante el envejecimiento.

Los ácidos, en concentraciones adecuadas, producen un sabor refrescante en el vino, pero si su concentración es demasiado elevada pueden generar sensaciones desagradables y afectar a la apreciación del resto de compuestos (Drawert et al., 1974). Los olores suaves de los ácidos láctico y succínico no se consideran perjudiciales para el aroma del vino.

Durante la fermentación, los ácidos de cadena corta (hasta el butírico) aumentan su concentración al mismo tiempo que desciende la de los ácidos de cadena más larga (Henscke y Jiranek, 1993). Estos ácidos de cadena larga como el octanoico o el dodecanoico son productos intermedios en la formación de los ácidos hexadecanoico y octadecanoico que forman parte de las membranas celulares.

La síntesis de los ácidos es similar a la descrita para los ésteres en el apartado anterior, con la diferencia de que tras la ésterificación se produce una hidrólisis del éster que genera el correspondiente ácido (Erwin, 1973). Para la síntesis de ácidos grasos insaturados las levaduras utilizan los ésteres de ácidos grasos producidos del CoA. Para la formación de ácidos monoinsaturados interviene una enzima desaturasa que introduce el doble enlace en la posición Δ^9 de la cadena (Meyer y Bloch, 1963; Erwin y Bloch, 1964).

d) *Compuestos carbonílicos*

Los compuestos carbonílicos constituyen la fracción más volátil del aroma del vino. En el mosto se ha encontrado gran variedad de aldehídos tanto saturados como insaturados cuyos precursores son lípidos (Schreier, 1979; Crouzet, 1986). En el vino sin embargo, apenas pueden

detectarse unos pocos aldehídos de cadena corta de origen fermentativo. Este hecho puede explicarse por dos razones; por un lado, algunos de estos compuestos como el 2-hexanal pueden dar lugar a alcoholes durante la fermentación como se ve en la figura 1.3; y por otro lado, el SO₂ libre puede reaccionar con los aldehídos para dar lugar a ácidos 2-hidroxisulfónicos. La concentración de aldehídos en el vino depende del tipo de levadura que lleve a cabo la fermentación. La biosíntesis de estos compuestos tiene lugar durante la fase más vigorosa de desarrollo de dichos microorganismos (Radler, 1973).

Dentro de los compuestos carbonílicos, los aldehídos son los que más destacan en el aroma del vino como consecuencia de sus bajos niveles de percepción (Suomalainen y Lehtonen, 1979). El acetaldehído representa aproximadamente el 90% del total de los aldehídos presentes (Nykaenen, 1986) lo que hace que sea considerado como el principal compuesto carbonílico. Posee un aroma similar al de la manzana verde. Este compuesto se forma a partir del piruvato, por lo que su concentración está directamente relacionada con la actividad de la piruvato descarboxilasa. La acumulación de acetaldehído se ve favorecida por la falta de nutrientes, niveles bajos de oxígeno y concentraciones de etanol por encima del 10% (v/v) (Zoecklin et al., 1995; Fugelsang, 1997). Concentraciones elevadas de este compuesto se consideran en general negativas para la calidad del vino (Nykaenen y Suomalainen, 1983).

Otros compuestos carbonílicos habituales en el aroma del vino son la 2,3-butanodiona (diacetilo) y la 3-hidroxi-2-butanona (acetoína). El primero de estos compuestos posee un olor que recuerda al de la mantequilla y sus concentraciones en vino son muy variables, favoreciéndose su descomposición las temperaturas elevadas y/o los medios ácidos (Ronkainen et al., 1970; Meilgaard, 1975).

e) Otros compuestos volátiles

Un grupo de compuestos de los que no se ha hablado son las lactonas. Estos compuestos son un subgrupo pertenecientes a los ésteres. Se forman mediante una reacción de ésterificación interna de hidroxiaácidos que genera un éster cíclico. La mayor parte de las lactonas presentes en el vino se caracteriza por tener anillos de cuatro átomos de carbono. Además la gran mayoría son γ -lactonas ya que el grupo hidroxilo involucrado en la reacción se encuentra en el carbono 4 del ácido. La mayor parte de estos compuestos parecen provenir de aminoácidos y ácidos orgánicos, y se generan durante la fermentación (Webb y Muller, 1972). Las lactonas aportan aromas agradables que recuerdan al coco.

I.2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente trabajo fue la búsqueda de conservantes naturales para el vino con el fin de reducir la concentración de SO₂, así como el estudio de su influencia en la calidad del vino. Otro objetivo importante fue el uso de métodos cromatográficos como son el HPLC con detector de fluorescencia y la cromatografía de gases con un detector de masas.

Para el estudio de alternativas al SO₂ se emplearon dos extractos comerciales uno de salvia (*Salvia officinalis* L) y otro de olivo (*Olea europea* L) en combinación con bajas concentraciones de SO₂. Las combinaciones de extractos con SO₂, y el SO₂ control, se añadieron para la conservación del vino producto de tres variedades de uva distintas, Garnacha, Graciano y Cabernet Sauvignon, en barrica.

La influencia de dichos conservantes en la calidad del vino de cada una de las 3 variedades de uva utilizadas, se estudió determinando las concentraciones de aminos mediante HPLC y las de algunos compuestos volátiles de origen fermentativo mediante GC-MS.

MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

II. MATERIAL Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

En el siguiente apartado, se describirán tanto el tipo de muestras utilizadas como los métodos analíticos utilizados para la realización del presente Trabajo Fin de Máster.

II.1. MUESTRAS UTILIZADAS.

En este estudio se han utilizado uvas de la vendimia de 2015 de tres variedades diferentes, Garnacha, Graciano y Cabernet Sauvignon. Todas ellas realizaron la fermentación alcohólica a una temperatura controlada de 28°C con inoculación de levaduras seleccionadas y adición de nutrientes. Asimismo, se añadió metabisulfito potásico hasta alcanzar una concentración de 50 mg/L de SO₂ total. En el caso de la uva Garnacha además, se adicionaron cortezas de levaduras y se realizó sangrado de mosto para elaboración de Rosado de Garnacha, quedando entonces un 40% de mosto en los depósitos, concentrándose de esta manera para la elaboración para Tinto de Garnacha. Tras la fermentación alcohólica se realizó el descube de los distintos depósitos.

Tras la fermentación maloláctica, que se realizó en los tres casos de manera espontánea sin adición de bacterias malolácticas, cada uno de los vinos se introdujo en 3 barricas de roble francés de 225 litros. A cada una estas barricas, se les añadió una de las 3 combinaciones diferentes de conservante que se presentan en la tabla II.1. En el caso control, se utilizó SO₂ como único conservante, mientras que en los otros dos se añadieron combinaciones de un 50% del SO₂ del control con 22.5 g de extracto bien de salvia o de olivo. La adición de las distintas combinaciones de conservantes se realizó el 11 de febrero de 2016.

Las muestras utilizadas para el presente estudio se tomaron una vez terminada la fermentación alcohólica, una vez terminada la fermentación maloláctica, el 14 de marzo de 2016 (un mes después de la adición de conservantes en barrica) y el 13 de abril de 2016 (dos meses después de la adición de conservantes en barrica). Para cada una de las determinaciones llevadas a cabo se tomaron dos alícuotas de cada una de las muestras, que posteriormente se analizaron por duplicado (n=4)

Tabla II.1 Tratamiento de los distintos vinos

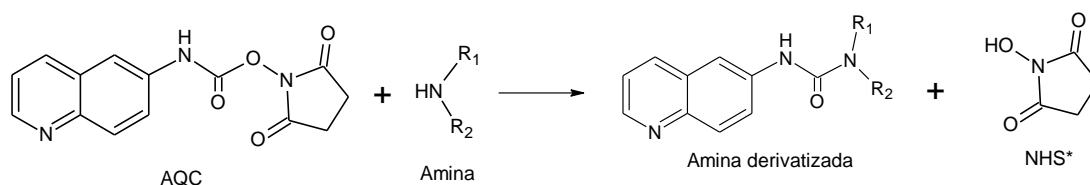
		SO ₂		Extracto salvia		Extracto Olivo	
		(g/barrica)	(g/L)	(g/barrica)	(g/L)	(g/barrica)	(g/L)
Garnacha	Control	10,8	0,047	-	-	-	-
	Salvia	5,4	0,024	22,5	0,100	-	-
	Olivo	5,4	0,024	-	-	22,5	0,100
Graciano	Control	8,77	0,039	-	-	-	-
	Salvia	4,4	0,020	22,5	0,100	-	-
	Olivo)	4,4	0,020	-	-	22,5	0,100
Cabernet Sauvignon	Control	12,15	0,054	-	-	-	-
	Salvia	6,075	0,027	22,5	0,100	-	-
	Olivo	6,075	0,027	-	-	22,5	0,100

II.2. PARÁMETROS ENOLÓGICOS GENERALES

Los parámetros enológicos generales se midieron con un aparato WineScan 79000 Auto (Foss Analytical, Dinamarca) equipado con tecnología infrarroja con transformada de Fourier. El rango de longitudes de onda empleado para os análisis fue de 240 a 1295 nm. Los valores presentados en este trabajo son la media de dos réplicas.

II.3. DETERMINACIÓN DE AMINAS POR HPLC

Para la determinación de las aminas presentes en los vinos estudiados se utilizó el método desarrollado por Torrea y Ancín-Azpilicueta (2001), basado en la derivatización precolumna de las aminas mediante el reactivo 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) según la reacción:



*NHS: N-hidroxisuccinimida

Esquema II.1 Esquema de la derivatización de aminas

Los derivados así obtenidos se separaron por HPLC en fase reversa utilizándose para su detección un detector de fluorescencia, las longitudes de onda de excitación y emisión utilizadas fueron 250 nm y 395 nm respectivamente. Las aminas se identificaron por sus tiempos de retención obtenidos tras inyectar un patrón de aminas, y sus concentraciones mediante rectas de calibrado.

II.3.1. Reactivos

A continuación se describen los reactivos utilizados tanto en la preparación de las muestras y de las rectas de calibrado, como en la preparación de las fases móviles empleadas en el análisis cromatográfico.

II.3.1.1. Preparación de la muestra y de las rectas de calibrado

Para la preparación de las muestras y las rectas de calibrado se utilizaron los reactivos que se citan a continuación:

- Reactivo de derivatización, obtenido por reconstitución del 6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato (AQC) en acetonitrilo, de modo que la concentración final fuese 10 mM aproximadamente. Ambos reactivos de Waters (Milford, Massachussets, EEUU).
- Disolución tampón de tetraborato disódico (0,2 M) a pH 8,8 ajustado con ácido bórico. Ambos reactivos de Waters.
- Metanol calidad HPLC Scharlau.
- Patrones de cada una de las aminas a analizar: dicloruro de histamina, trihidrocloruro de espemidina (Carbosynth), hidrocloreuro de etilamina, hidrocloreuro de dietilamina, isobutilamina (Alfa Aesar), dihidrocloruro de 1,5-diaminopentano (dihidrocloruro de cadaverina) (TCI), hidrocloreuro de dimetilamina, pirrolidina, isopropilamina, hidrocloreuro de tiramina, dihidrocloruro de 1,4-diaminobutano (dihidrocloruro de putrescina), hidrocloreuro de feniletilamina, amilamina, tetrahidrocloruro de espermina y hexilamina (Aldrich). Todos de calidad de estándar analítico.

II.3.1.2. Análisis cromatográfico

Los reactivos utilizados para la preparación de las fases móviles fueron los que se citan a continuación:

- AccQ·Tag Eluente concentrado A para análisis de aminoácidos hidroxilados, Waters.
- Agua mili Q – Ultrapure master system (Mili Q Plus 185, Millipore)
- Metanol calidad HPLC, Scharlau.

La composición de las fases móviles fue:

- **Fase A**, disolución de 200 mL de Eluente concentrado A enrasando a 2 L con agua mili-Q, desgasificada por ultrasonidos.
- **Fase B**, metanol puro calidad HPLC, desgasificado por ultrasonidos.

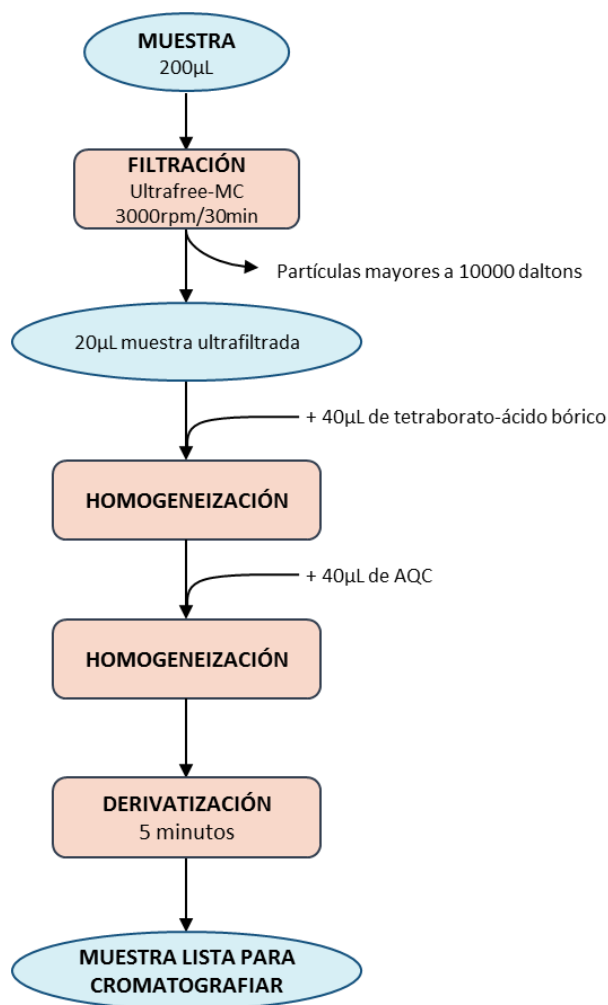
II.3.2. Preparación de la muestra y de las rectas de calibrado

Se comenzó por la reconstitución del reactivo derivatizante. Para ello, en primer lugar se añadió 1 mL de disolvente (acetonitrilo) al AQC sólido. A continuación, se introdujo la mezcla en un baño a 55 °C durante 10 minutos. Una vez transcurrido este tiempo el reactivo ya estuvo preparado para utilizarse.

En el esquema II.2 se muestran las fases de la preparación de las distintas muestras. En primer lugar se tomó una alícuota de la muestra de vino de 200 µL y se filtró para eliminar las moléculas de tamaño superior a 10000 daltons. Para ello se utilizaron ultrafiltros Ultrafree-MC de Merk Millipore y una centrifuga Hermle modelo Z320, sometiendo a la muestra durante 30 minutos a 3000 rpm. Seguidamente se tomaron 20 µL de muestra filtrada y se añadieron 40 µL de disolución tampón de tetraborato-ácido bórico, consiguiendo así el pH básico necesario para la derivatización. Tras homogeneizar la muestra, se añadieron otros 40 µL de reactivo derivatizante reconstituido (AQC) y se volvió a homogeneizar la muestra. La mezcla se mantuvo entonces 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la formación de derivados antes de cromatografiar.

Para la obtención de las rectas de calibrado se prepararon disoluciones madre de 2 g/L de cada amina en metanol puro calidad HPLC. A partir de estas se prepararon disoluciones hijas de 5000 µg/L, y a partir de esta las restantes disoluciones de 100, 500, 1000 y 2000 µg/L. La

derivatización de estos patrones siguió los mismos pasos que la derivatización de muestras descrita anteriormente a partir de la filtración



Esquema II.2 Diagrama de la preparación de muestras para el análisis de aminas

II.3.3. Análisis cromatográfico

En primer lugar se procederá a describir las condiciones experimentales y la instrumentación utilizada para la determinación de aminas por HPLC, para después comentar aspectos sobre la identificación y cuantificación de los compuestos estudiados.

II.3.3.1. Condiciones cromatográficas

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo líquido Waters, equipado con dos bombas modelo 510, un módulo de control de temperatura TCM, un inyector automático 717 plus y un detector de fluorescencia modelo 474. Para la separación de los

compuestos se utilizó una columna cromatográfica Pico-Tag (300 mm de longitud x 3,9 mm de diámetro interno) de fase reversa, que contiene fase estacionaria de 4 μm de tamaño de partícula, compuesta de sílice amorfa enlazada junto a grupos dimetiloctadecilsililo (Waters). El control del cromatógrafo y el procesamiento de los datos se realizaron mediante el programa Empower 2.0 (Waters).

La temperatura de la columna se fijó en 65 °C y se trabajó en gradiente, con las fases A y B descritas en el apartado anterior. En la tabla II.2 se muestra el programa de gradiente utilizado para la separación de las aminas estudiadas. La longitud de onda de absorción de las aminas derivatizadas se fijó en 250 nm, y la de emisión en 395 nm. Los análisis se realizaron por duplicado, y el volumen de inyección, tanto para muestras como para patrones fue de 10 μL .

Tabla II.2 Programa de gradiente de las fases móviles A y B

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	1	80	20
5	1	80	20
25	1	20	80
26	1	0	100
31	1	0	100
33	1	80	20
40	1	80	20

II.3.3.2. Identificación y cuantificación de aminas

Se utilizó el software Empower 2.0 como ayuda en la identificación y cuantificación de las aminas analizadas. La identificación de los compuestos se realizó mediante los tiempos de retención obtenidos tras inyectar los patrones de las aminas y su cuantificación mediante rectas de calibrado. En el caso de la feniletilamina y la espermidina no se consiguió su separación y se cuantificaron conjuntamente utilizando para este fin una recta de calibrado con ambas aminas al 50%. El orden de elución fue el siguiente: histamina, dimetilamina, etilamina, pirrolidina, isopropilamina, tiramina, dietilamina, putrescina, isobutilamina, cadaverina, fenietilamina+espermidina (F+E), amilamina, espermina y hexilamina. En las figuras II.2 y II.3 se presentan dos cromatogramas de estándares de aminas biógenas y volátiles respectivamente.

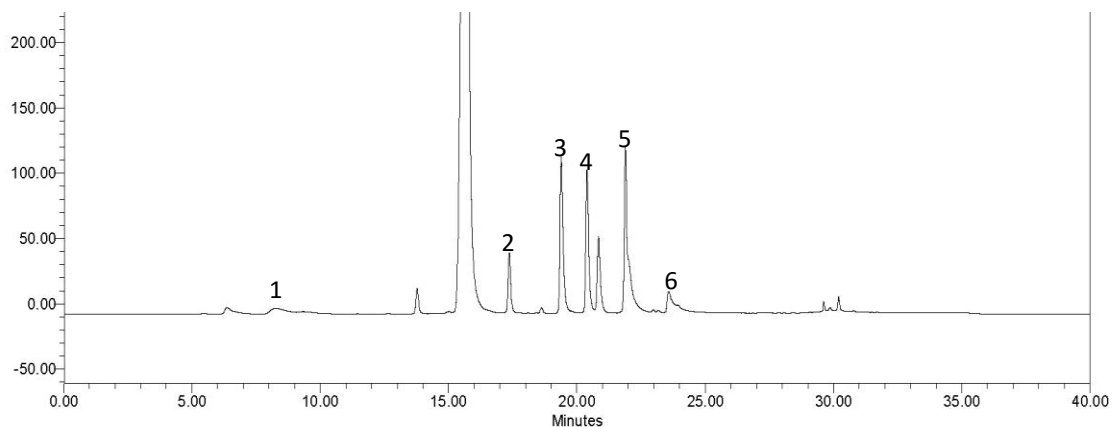


Figura II.2 Cromatograma aminas biógenas (1.histamina, 2.tiramina, 3.putrescina, 4.cadaverina, 5.feniletilamina+espermidina, 6.espemina)

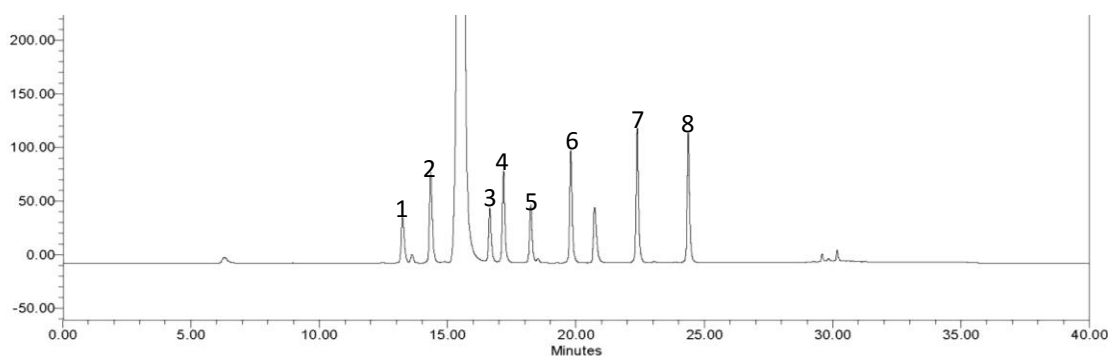


Figura II.3 Cromatograma aminas volátiles (1. dimetilamina, 2. etilamina, 3. pirrolidina, 4. isopropilamina, 5.dietilamina, 6.isobutilamina, 7.amilamina, 8.hexilamina)

II.3.3.3. Precisión y exactitud del método

La precisión del método se determinó con el coeficiente de variación (CV), definido como el porcentaje de la desviación típica de los resultados respecto a la media (Miller y Miller, 1993).

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (1)$$

Donde σ es la desviación típica y \bar{x} la media aritmética.

Para la determinación del coeficiente de variación se llevaron a cabo 6 análisis independientes de vino. Seguidamente se calculó el coeficiente de variación de cada amina a partir de la media y la desviación estándar obtenidas. Los valores de coeficiente de variación

estuvieron comprendidos entre un 1,8% para la feniletilamina+espermidina y un 9,7% para la pirrolidina

La exactitud del método se expresa como porcentaje de recuperación (R). Para ello se adicionaron dos concentraciones conocidas de cada una de las aminas a la muestras del vino previamente analizado para la determinación de la precisión del método. A partir de estos resultados el porcentaje de recuperación se calculó utilizando la ecuación (2).

$$R = \frac{(y-x)}{A} \cdot 100 \quad (2)$$

Donde y es el valor medio de la concentración de cada amina tras la adición, x la de cada amina en la muestra original y A es la concentración de la amina añadida.

El porcentaje de recuperación del método quedó entre 71% para dietilamina y 122% para putrescina.

II.4. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE ORIGEN FERMENTATIVO

Para la determinación de los compuestos volátiles de origen fermentativo se utilizó la cromatografía de gases usando como detector un espectrómetro de masas. Para todos los compuestos se usó un mismo método cromatográfico con dos tipos de inyección diferentes en función de la concentración de los compuestos analizados.

II.4.1. Reactivos

A continuación se describirán los reactivos utilizados tanto para la preparación de las muestras como la de las rectas de calibrado.

II.4.1.1. Preparación de la muestra y de las rectas de calibrado

- Metanol calidad HPLC, Scharlau.
- Etanol calidad HPLC, Aldrich.
- Diclorometano calidad HPLC, Aldrich.
- Agua mili Q – Ultrapure mater system (Mili Q Plus 185, Millipore)
- Ácido heptanoico, Aldrich

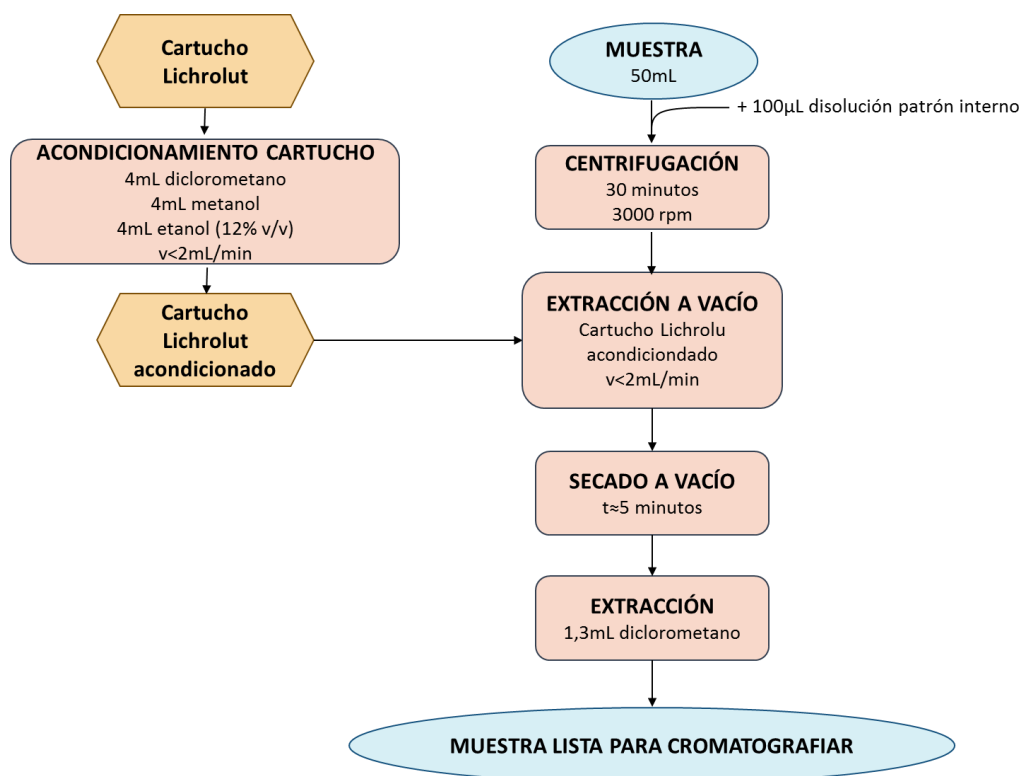
- Patrones de cada uno de los compuestos volátiles a analizar: alcoholes isoamílicos, 2-feniletanol, triptofol, *n*-hexanol, 1-butanol, 3-(metiltio)-1-propanol, alcohol bencílico, alcohol feniletílico, tirosol, γ -butirolactona, acetovainillona, 3-hidroxi-2-butanona (acetoína), malato de dietilo, acetato de isoamilo, lactato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, succinato de dietilo, succinato ácido de etilo, 3-hidroxibutirato de etilo, ácido butírico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido hexadienoico, ácido octadecanoico y ácido octadecadienoico; todos de Aldrich, excepto 1-butanol (Fluka) y 3-hidroxi-2-butanona (Merk). Todos de calidad de estándar analítico.

II.4.2. Preparación de la muestra y de las rectas de calibrado

Para el análisis de los compuestos volátiles fue preciso concentrar y purificar las muestras. Para ello se utilizó, como técnica preparativa la extracción en fase sólida (SPE) descrita por López et al. (2002) siguiendo el esquema II.2. El disolvente escogido para la extracción fue diclorometano ya que posee las características favorables de la baja solubilidad del etanol y un punto de ebullición adecuado (40°C). Se utilizaron cartuchos Lichrolut EN rellenos con 200 mg de resina de 3 mL de volumen total.

En primer lugar se llevó a cabo el acondicionamiento de la resina de los cartuchos para evitar las posibles pérdidas de compuestos volátiles que pudiesen quedar retenidos en ella. Para ello se hicieron pasar por el cartucho, en este orden, 4 mL (2x2 mL) de diclorometano, 4 mL de metanol y 4 mL de una disolución de etanol al 12% (v/v) a una velocidad de 2 mL/min. Para controlar la circulación del líquido a través de los cartuchos se utilizó una estación de vacío Vac Elut 20 (Varian, CA, EEUU). A continuación, se tomó una alícuota de 50 mL de cada una de las muestras se adicionaron 100 μ L de disolución de patrón interno (ácido heptanoico) y se centrifugó durante 30 minutos a 3000 rpm utilizando una centrífuga Hermle modelo Z320. Posteriormente, la muestra ya centrifugada se hizo pasar por el cartucho ya acondicionado a una velocidad de 2 mL/min. Seguidamente, se dejó secar el cartucho durante 5 minutos con el vacío al máximo. Finalmente los compuestos volátiles se recuperaron haciendo pasar 1,3 mL de diclorometano a través del cartucho y recogéndolo en un vial. Las muestras así obtenidas se conservaron en el congelador a -30 °C hasta ser cromatografiadas.

Se prepararon dos rectas de calibrado con patrón interno para la identificación de los compuestos volátiles. Para ello se prepararon dos disoluciones madre a partir de los patrones de los compuestos y diclorometano. Para los compuestos mayoritarios (alcoholes isoamílicos, 2-feniletanol y triptofol) se preparó una disolución madre de 5 g/L, a partir de la cual se prepararon las correspondientes disoluciones hijas con concentraciones comprendidas entre 200 y 1600 ppm. Para los compuestos minoritarios (*n*-hexanol, 1-butanol, 3-(metiltio)-1-propanol, alcohol bencílico, alcohol feniletílico, tirosol, γ -butirolactona, acetovainillona, 3-hidroxi-2-butanona, malato de dietilo, acetato de isoamilo, lactato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, decanoato de etilo, succinato de dietilo, succinato ácido de etilo, 3-hidroxibutirato de etilo, ácido butírico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido hexadienoico, ácido octadecanoico y ácido octadecadienoico) se preparó una disolución madre de 0,5 g/L, a partir de la cual se prepararon las correspondientes disoluciones hijas con concentraciones comprendidas entre 0,5 y 160 ppm. Antes de cromatografiar las disoluciones hijas se les añadió 100 μ L de disolución de patrón interno a todas ellas.



Esquema II.2 Diagrama de la preparación de muestras para el análisis de compuestos volátiles

II.4.3. Análisis cromatográfico

Como en el caso anterior, en primer lugar se procederá a describir las condiciones experimentales y la instrumentación utilizada para la determinación de de compuestos volátiles de origen fermentativo, para después comentar aspectos sobre la identificación y cuantificación de los compuestos estudiados.

II.4.3.1. Condiciones cromatográficas

La técnica escogida para la separación, identificación y cuantificación de los compuestos de las extracciones de las muestras fue la cromatografía de gases acoplada a un detector de masas (GC-MS), se empleó un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón), con detector analizador por cuadrupolo y un inyector automático Shimadzu AOC-20i. Se utilizó una columna capilar TRB-WAX (fase estacionaria polietilenglicol polimerizado y ligado) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de espesor de fase estacionaria (Teknokroma, Barcelona). En ambos casos las condiciones cromatográficas fueron similares. Se utilizó helio como gas portador a 30 kPa de presión en cabeza; la temperatura del inyector fue de 250°C; la temperatura inicial del horno de 50°C, mantenida durante 10 minutos, con una rampa de subida de 2°C/min hasta llegar a una temperatura de 240°C; la temperatura de la línea de transferencia fue de 280°C. La ionización se realizó por impacto electrónico a 70 eV y el análisis de los compuestos llevó a cabo en Full Scan con m/z: 35/300. La inyección en ambos casos fue de 1 μL , en el caso de los compuestos mayoritarios se realizó mediante un flujo dividido (1:200), mientras que en el caso de los compuestos minoritarios el análisis se optó por una inyección sin división de flujo (splitless), ajustando mediante el voltaje del detector su sensibilidad para evitar que se produjese saturación en las zonas donde aparecen los compuestos mayoritarios.

II.4.3.2. Identificación y cuantificación de compuestos volátiles

La identificación inicial de los compuestos en el sistema GC-MS consistió en la comparación informática de los espectros de masas de cada uno de los picos obtenidos en las disoluciones de los patrones con los contenidos en la biblioteca comercial WILEY 229, que almacena los espectros de más de 229.000 compuestos. El criterio definitivo para la identificación de los compuestos separados en las extracciones fue la doble coincidencia de los tiempos cromatográficos y la correspondencia con los espectros de masas de sus correspondientes

patrones. El análisis cuantitativo precisó, en el equipo utilizado, la extracción de iones del espectro de cada uno de los picos identificados como paso previo a la comparación de las áreas. En la tabla II.3, se resumen los “iones diana” escogidos para cada uno de los compuestos.

En las figuras II3 y II4, se presentan los cromatogramas obtenidos con patrones de los compuestos volátiles de origen fermentativos mayoritarios y minoritarios respectivamente.

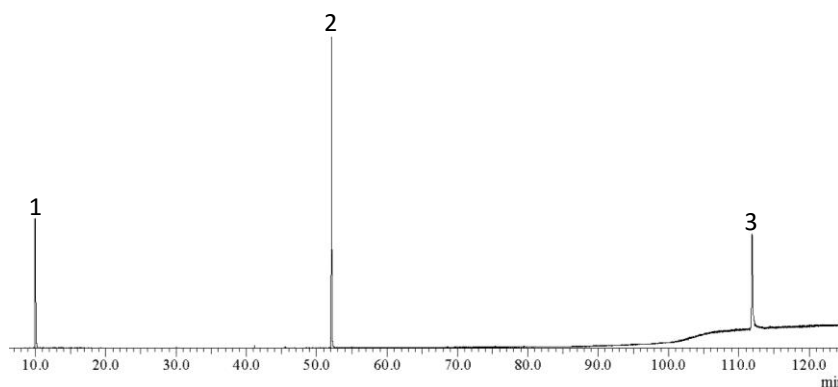


Figura II.3 Cromatograma de compuestos volátiles de origen fermentativo mayoritarios (1.Alcoholes isoamílicos, 2.2-feniletanol, 3.triptofol)

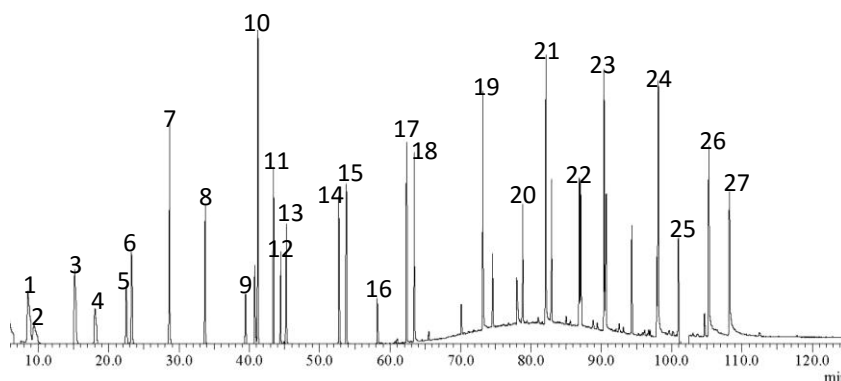


Figura II.4 Cromatograma de compuestos volátiles de origen fermentativo minoritarios (1.acetato de isoamilo, 2.1-isobutanol, 3.hexanoato de etilo, 4.3-hidroxi-2-butanona, 5.lactato de etilo, 6.n-hexnol, 7.octanoato de etilo, 8.3-hidroxi-2-butanona, 9.γ-butirolactona, 10.ácido butírico, 11.decanoato de etilo, 12.succinato de etilo, 13.3-(metiltio)-1-propanol, 14.ácido hexanoico, 15.alcohol bencílico, 16.ácido heptanoico, 18.ácido octanoico, 19.ácido decanoico, 20.succinato ácido de etilo, 21.ácido dodecanoico, 22.acetovainillona, 23.ácido tetradecanoico, 24.ácido hexadecanoico, 25.tirosol, 26.ácido octadecanoico, 27.ácido octadecadienoico).

Tabla II.3 Fragmentos seleccionados para la identificación de compuestos volátiles fermentativos

Compuesto	Ion (<i>uma</i>)	Compuesto	Ion (<i>uma</i>)
alcoholes isoamílicos	41/57	malato de dietilo	71/117
<i>n</i> -hexanol	43/56/69	lactato de etilo	43/45/75
alcohol bencílico	79/108	hexanoato de etilo	43/60/88
3-(metiltio)-1-propanol	61/106	octanoato de etilo	57/60/88
2-feniletanol	91/122	decanoato de etilo	88/101
1-butanol	41/56	3-hidroxibutirato de etilo	43/45/60
tirosol	107/138	ácido butírico	60/73
triptofol	130/161	ácido hexanoico	41/60/73
γ-butirolactona	42/56/86	ácido octanoico	60/73/101
acetovainillona	151/166	ácido decanoico	60/73/129
3-hidroxi-2-butanona	43/45	ácido dodecanoico	60/73/101
succinato de dietilo	101/129	ácido tetradecanoico	60/71/228
acetato de isomilo	43/55/0	Ácido hexadecanoico	73/129
succinato ácido de etilo	101/128	ácido octadecanoico	181
		ácido octadecacienoico	124

II.4.3.3. Precisión y exactitud del método

La precisión y exactitud del método se determinaron mediante las ecuaciones (1) y (2) como en el apartado II.3.3.3. Los coeficientes de recuperación se encontraron entre un 0,8% para el 3-hidroxibutirato de etilo y un 15% para el succinato ácido de etilo. Para el estudio de recuperación se adicionaron concentraciones conocidas, que variaron entre 500 y 4000 µg/L, de cada uno de los compuestos volátiles estudiados a una muestra de vino de concentración conocida. Los porcentajes de recuperación obtenidos quedaron entre 76% para el decanoato de etilo y el 109% para el ácido hexanoico.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

III. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

III.1. PARÁMETROS ENOLÓGICOS GENERALES

Los parámetros enológicos generales de los vinos obtenidos tras la fermentación alcohólica se recogen en la tabla III.1.

Tabla III.1 Parámetros enológicos de los vinos tras la fermentación alcohólica

<i>Parámetro enológico</i>	Garnacha	Graciano	Cabernet Sauvignon
Grado alcohólico (% vol)	15,10	14,75	14,30
pH	3,3	3,5	3,4
Acidez total (g/L ác. tartárico)	7,05	6,52	6,20
Acidez volátil (g/L ác. acético)	0,36	0,36	0,58
Azúcares (g/L)	1,9	1,8	1,9
SO ₂ libre (mg/L)	17,92	14,72	12,80
SO ₂ total (mg/L)	30,7	24,3	19,2

Se observa una correlación entre el grado alcohólico y la concentración de azúcares bastante coherente, ya que presenta un grado alcohólico elevado con una baja concentración de azúcares. La acidez volátil está en todos los casos por debajo de 0,60 g/L por lo que la calidad del vino no se debería ver afectada (Peynaud, 1993). El pH es correcto respecto a lo esperado, ya que se trata de un pH ácido.

No se aprecian grandes diferencias entre los resultados obtenidos en cada una de las tres variedades de vino estudiadas, salvo la acidez volátil de la variedad Cabernet Sauvignon que es significativamente mayor que la de las otras dos variedades, y las concentraciones de SO₂ libre y total en el caso de la uva Garnacha, que como en el caso anterior, son más elevadas que las de las otras dos variedades de uva.

III.2. EVOLUCIÓN DE LAS AMINAS BIÓGENAS

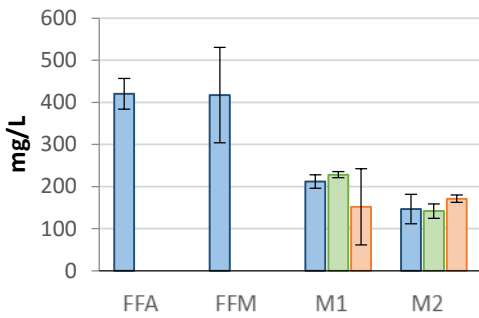
En las figuras III.1, III.2 y III.3 se recoge la evolución de las aminas biógenas tras la fermentación alcohólica y la maloláctica y durante los dos primeros meses tras la adición de los conservantes a las barricas, en cada una de las 3 variedades de uva utilizadas en el presente estudio; Garnacha, Graciano y Cabernet Sauvignon.

Destaca la concentración muy elevadas de histamina en todas los vinos estudiados, ya que es más elevada que la de putrescina, considerada en general como la amina que presenta mayor concentración en el vino (Lehtonen, 1996; Gloria et al., 1998; Torrea et al., 2002).

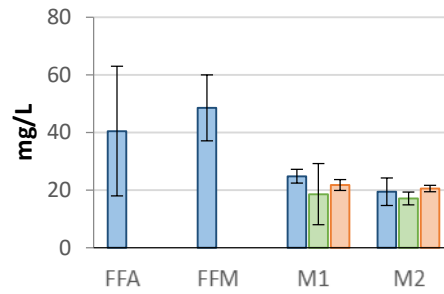
Durante la conservación en barrica con las distintas combinaciones de conservantes las evoluciones de las diferentes aminas presentan mayor variación. En general la muestra control presenta una disminución de la concentración de aminas durante los primeros meses para las tres variedades de uva. Las combinaciones con extracto de salvia y con extracto de olivo dan resultados diferentes, sin embargo, en general, las concentraciones son menores que tras la fermentación maloláctica. Este hecho contradice el aumento de la concentración de aminas durante el envejecimiento observado por Jimenez-Moreno et al. (2003), o al menos durante el inicio del mismo. A continuación se estudia, más detalladamente, la evolución de las aminas en función de las variedades de uva.

Cabe destacar también la diferencia importante en las concentraciones de feniletilamina y espermidina en función del tipo de uva estudiada. En el caso de la uva Garnacha las concentraciones están entre 10-20 ppm, mientras que en Graciano y en Cabernet Sauvignon se encuentra entre 1-5 ppm y 1-3 ppm respectivamente. En el caso de tiramina también se observa un suceso similar, en el caso de Garnacha y Graciano las concentraciones de esta amina se encuentran entre 20-60 ppm, mientras que en Cabernet Sauvignon está entre 10-30 ppm. En el resto de aminas biógenas no se aprecia una diferencia tan clara entre los vinos de las distintas uvas.

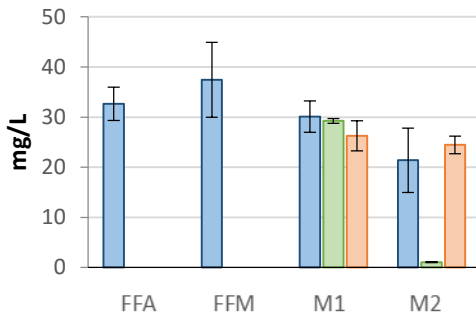
a. Histamina



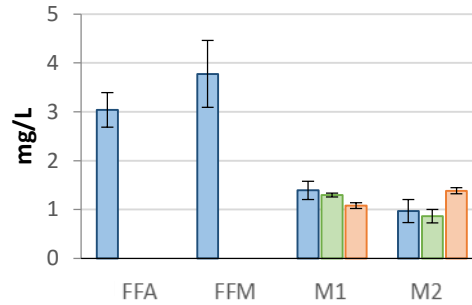
b. Tiramina



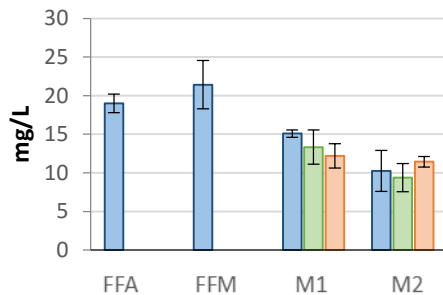
c. Putrescina



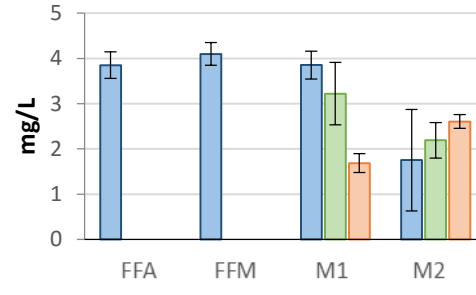
d. Cadaverina



e. Feniletilamina + Espermidina



f. Espermina



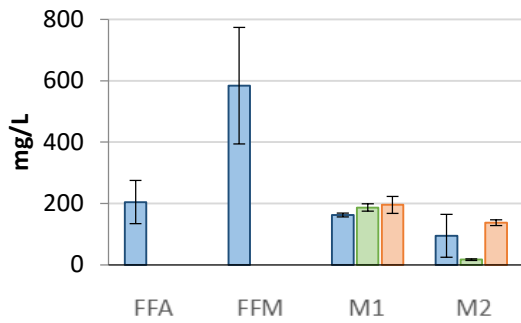
■ Control ■ Salvia ■ Olivo

Figura III.1 Evolución de las aminas biógenas en vino de uva Garnacha tras las fermentaciones alcohólica (FFA), la fermentación maloláctica (FFM), tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

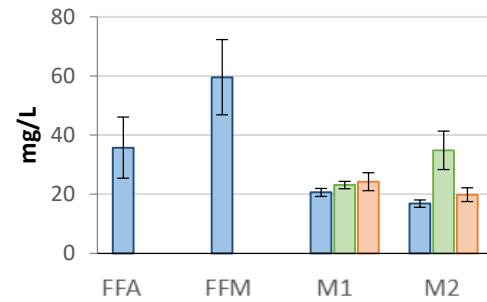
En uva Garnacha la muestra control presenta una disminución de la concentración de todas las aminas, respecto a la del final de la fermentación maloláctica, durante los dos primeros meses tras la adición de los conservantes salvo putrescina y espermina, cuya concentración durante el primer mes es similar a su concentración tras la fermentación maloláctica. Por su parte, en la combinación de SO₂ con extracto de olivo, cadaverina y espermina disminuyen respecto al control y a resultados obtenidos tras la fermentación maloláctica durante el primer mes, mientras que el resto tiene valores similares al control. Durante el segundo mes las concentraciones son similares a las del control salvo en el caso de la cadaverina que aumenta

ligeramente. Por su parte la combinación con extracto de salvia, presenta una disminución de concentración de todas las aminas durante los dos primeros meses respecto a su concentración tras la fermentación maloláctica aunque no se produce variación respecto del control tras el segundo mes cuando la concentración de histamina se reduce drásticamente.

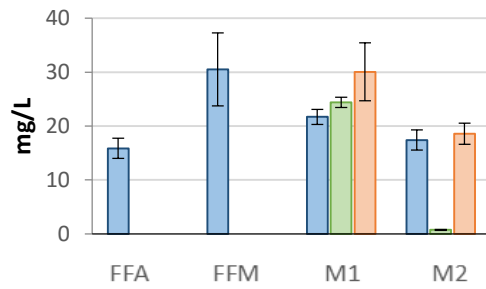
a. Histamina



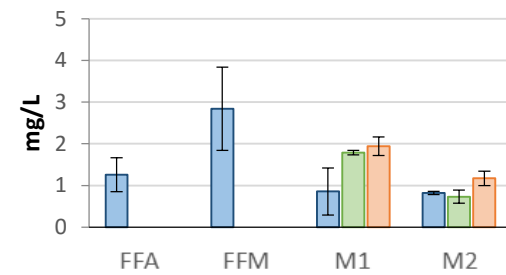
b. Tiramina



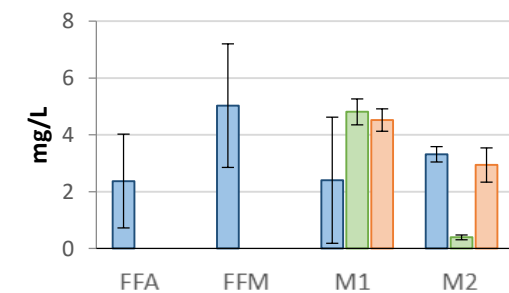
c. Putrescina



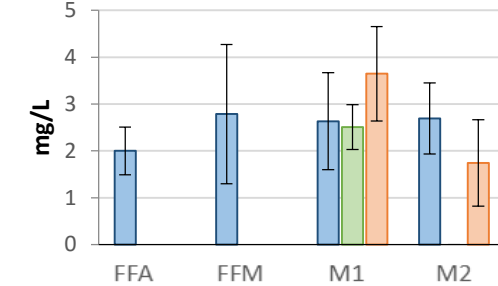
d. Cadaverina



e. Feniletilamina+ Espermidina



f. Espermina



■ Control ■ Salvia ■ Olivo

Figura III.2 Evolución de las aminas biógenas en vino de uva Graciano tras las fermentaciones alcohólica (FFA), la fermentación maloláctica (FFM), tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

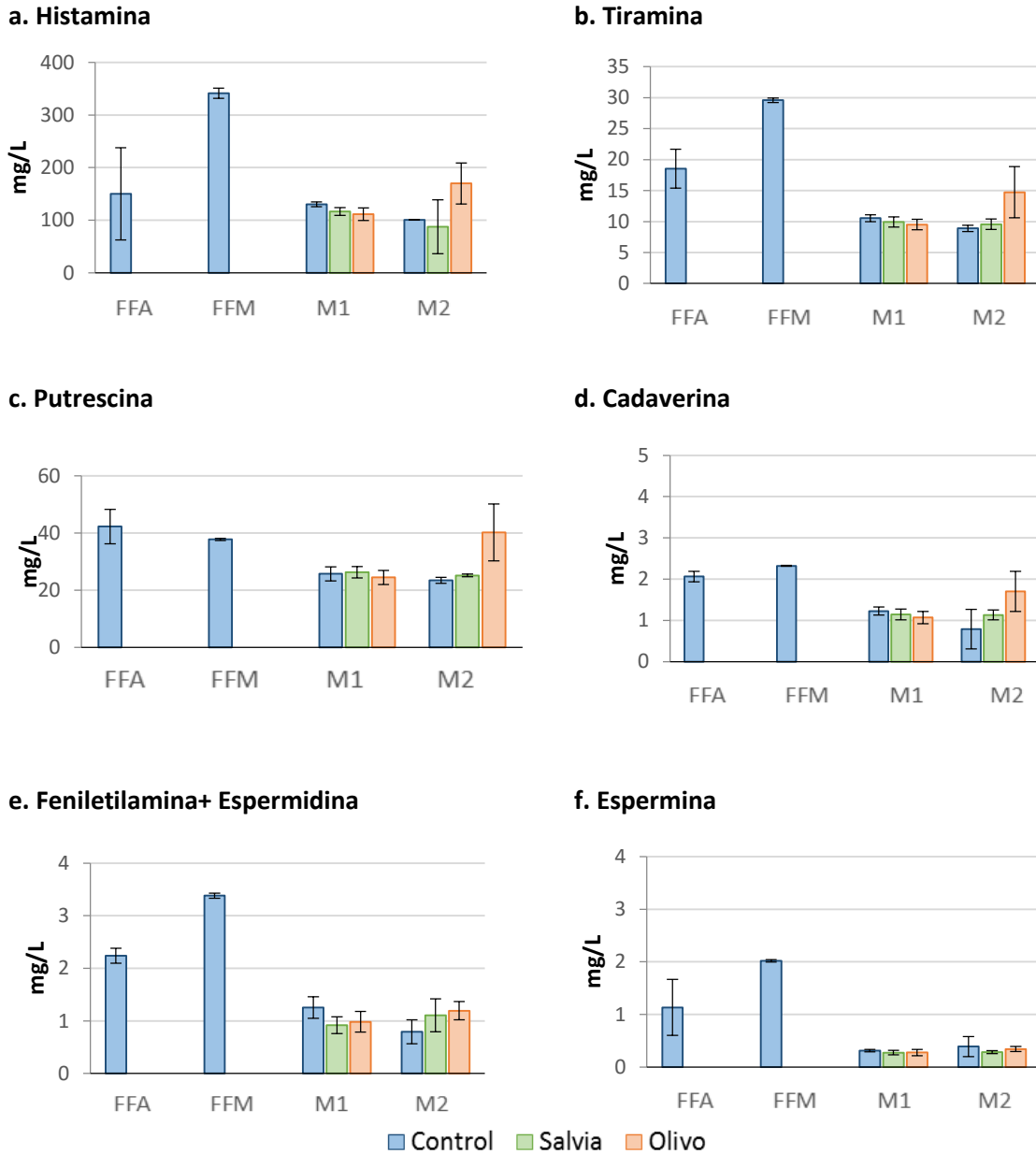


Figura III.3 Evolución de las aminas biógenas en vino de uva Cabernet Sauvignon tras las fermentaciones alcohólica (FFA), la fermentación maloláctica (FFM), tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

En uva Graciano, la muestra control presenta un disminución en la concentración de aminas durante los dos primeros meses tras la adición de los conservantes, salvo en el caso de espermina y feniletilamina+espermidina cuyas concentraciones no varían respecto al final de la fermentación maloláctica. En el caso de la muestra con extracto de olivo, un mes después de la adición de los conservantes, las concentraciones de aminas son similares a las de control salvo las de histamina, putrescina y cadaverina que aumentan. Tras el primer mes sólo las concentraciones de feniletilamina+espermidina y espermina son igual al control. El resto de aminas aumentan su concentración. Tras el segundo mes las concentraciones de las aminas que

varían respecto del control son tiramina y cadaverina que son, de nuevo, mayores que en el control. Por su parte la combinación con extracto de salvia presenta un aumento tras el segundo mes en el caso de la tiramina y un drástico descenso de concentración en el resto de aminas, salvo la cadaverina que se mantiene igual que en el control.

En uva Cabernet Sauvignon, la muestra control se comporta como en los casos anteriores, presentando una disminución en la concentración de todas las aminas después del primer mes tras la adición de los conservantes, respecto al final de la fermentación maloláctica. En el caso de la combinación de SO₂ con extracto de olivo, tras el primer mes la concentración es igual al control salvo la de histamina que disminuye ligeramente. Tras el segundo mes las concentraciones que se desvían del control son histamina, tiramina, putrescina y cadaverina que aumentan. En el caso de la combinación con extracto de salvia las concentraciones son iguales al control salvo histamina y feniletilamina+espermina cuya concentración disminuye respecto del control un mes después de la adición de los conservantes, y putrescina con una concentración ligeramente mayor que el control dos meses después de la adición de dichos conservantes.

III.3. EVOLUCIÓN DE LAS AMINAS VOLÁTILES

En las figuras III.4, III.5 y III.6 se recoge la evolución de las aminas volátiles tras la fermentación alcohólica y la maloláctica y después de los dos primeros meses tras la adición de los conservantes, en cada una de las 3 variedades de uva utilizadas en el presente estudio; Garnacha, Graciano y Cabernet Sauvignon.

Tras la fermentación alcohólica y la maloláctica las concentraciones de las distintas aminas en uva Garnacha se mantienen bastante similares. Por su parte en uva Graciano se observa un aumento en la concentración tras la fermentación maloláctica de etilamina, isopropilamina, dietilamina e isobutilamina. En el caso de uva Cabernet Sauvignon en ninguna muestra se ha detectado dimetilamina. La evolución del resto de aminas en este vino, ha sido de un claro aumento en la concentración tras la fermentación maloláctica en etilamina, pirrolidina e isopropilamina, mientras que en el caso de hexilamina, amilamina, isobutilamina y dietilamina la concentración se ha mantenido.

En el control del vino de uva Garnacha, todas las aminas presentan una disminución de su concentración, respecto a la obtenida tras la fermentación maloláctica, dos meses después de

la adición de los conservantes, salvo dietilamina, isobutilamina y hexilamina cuya concentración tras el primer mes es similar a la de después de la fermentación maloláctica. En las combinaciones de SO₂ tanto con extracto de salvia como con extracto de olivo ocurre algo similar a lo comentado sobre la muestra control, las concentraciones de las aminas disminuyen en general respecto a la concentración FFM. Se debe destacar el caso de isobutilamina y hexilamina que un mes después de la adición de los conservantes disminuyen su concentración respecto del control en ambas combinaciones (SO₂+olivo y SO₂+salvia), mientras que la combinación SO₂ con extracto de olivo produce un aumento de la concentración de hexilamina y una disminución de la de isobutilamina respecto al control dos meses después de la adición de los conservantes. También disminuyen las concentraciones de pirrolidina e isopropilamina un mes después de la adición, en la combinación con olivo, y disminuyen drásticamente las concentraciones de isopropilamina después del segundo mes en la combinación con olivo, y de dietilamina en la combinación con salvia.

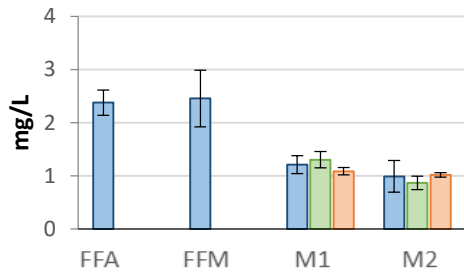
En el caso del vino de uva Graciano se observa, en general, una disminución de la concentración de las aminas volátiles dos meses después de la adición de los conservantes, tanto en el control como en la combinación de SO₂ con extractos naturales, salvo en la etilamina, donde tras el primer mes no se observa variación, y en el caso de dimetilamina y pirrolidina se produce un aumento considerable de la concentración tras el segundo mes en la combinación con salvia. La combinación con olivo produce un aumento de la concentración respecto del control un mes después de la adición de los conservantes en la dietilamina. La concentración de amilamina disminuye únicamente en la combinación de salvia tras el segundo mes respecto al control. Se debe destacar, en el caso de la combinación de SO₂ con extracto de salvia, el importante incremento en la concentración tanto de dimetilamina como de pirrolidina dos meses después de la adición de los conservantes, así como la importante disminución de dietilamina, amilamina, isopropilamina, etilamina y hexilamina.

En el vino de uva Cabernet Sauvignon se observa una disminución de la concentración de aminas volátiles en la muestra control un mes después de la adición de los conservantes, respecto a la determinada tras la fermentación maloláctica, salvo en el caso de la amilamina. Destacar que en el caso de la muestra control analizada dos meses después de producirse la adición de conservantes no se detectó presencia de isobutilamina. En el caso del vino tratado con una combinación de SO₂ con extracto de salvia la etilamina, la isobutilamina, la amilamina y la pirrolidina presentan un descenso en su concentración respecto al control tras el primer mes mientras que tras el segundo mes aumenta la concentración de etilamina, dietilamina,

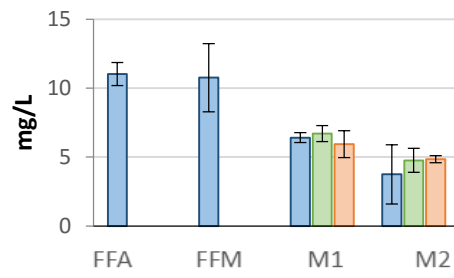
isobutilamina y hexilamina respecto del control. Cabe destacar el aumento en la concentración de dietilamina en la combinación SO_2 +olivo, que alcanza la concentración que tenía tras la fermentación maloláctica dos meses después de la adición de los conservantes. Por otro lado, en el caso del vino tratado con una combinación de SO_2 y extracto de olivo, se observa una disminución de la concentración de pirrolidina, amilamina, etilamina e isobutilamina un mes después de adicionar los conservantes, pero tras el segundo mes aumentan las concentraciones de etilamina, pirrolidina, isopropilamina, dietilamina y hexilamina, permaneciendo estable la de amilamina y disminuyendo la de isobutilamina.

Por último, al igual que sucedía con las concentraciones de feniletilamina+espermidina en las aminas biógenas, la concentración de pirrolidina es muy distinta en función de la uva utilizada.

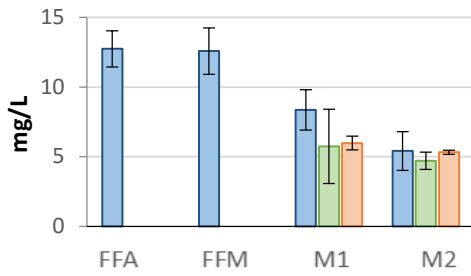
a. Dimetilamina



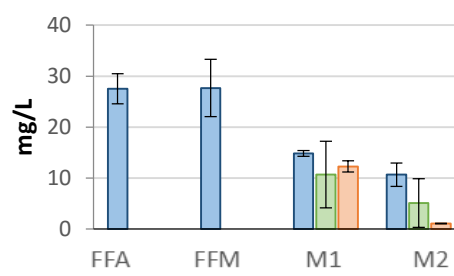
b. Etilamina



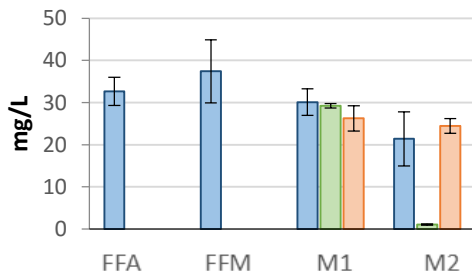
c. Pirrolidina



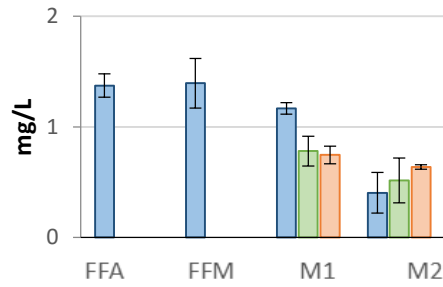
d. Isopropilamina



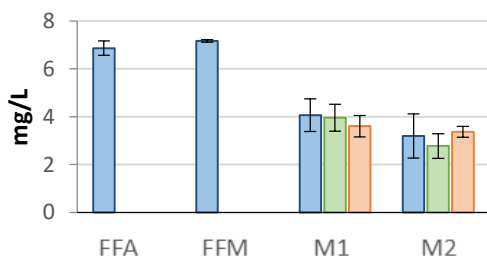
e. Dietilamina



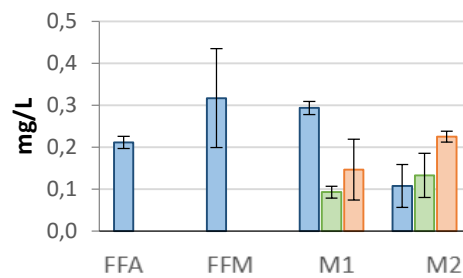
f. Isobutilamina



g. Amilamina



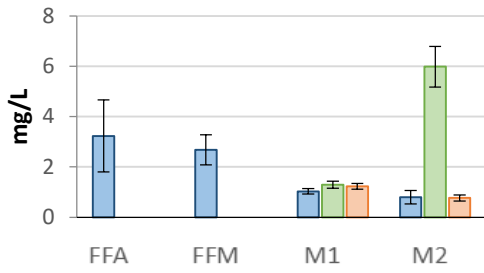
h. Hexilamina



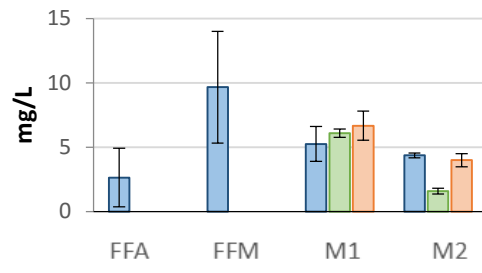
■ Control ■ Salvia ■ Olivo

Figura III.4 Evolución de las aminas volátiles en vino de uva Garnacha tras las fermentaciones alcohólica (FFA), la fermentación maloláctica (FFM), tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

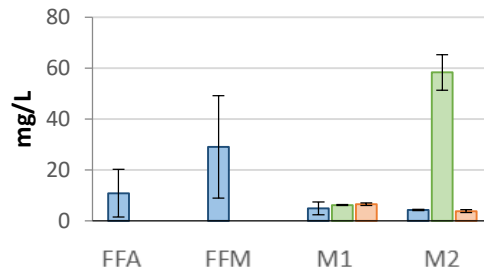
a. Dimetilamina



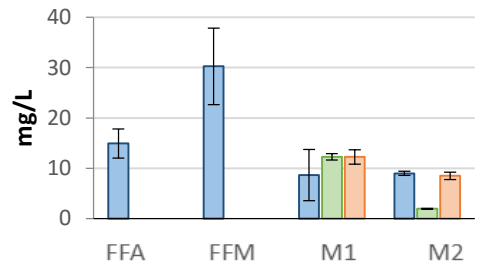
b. Etilamina



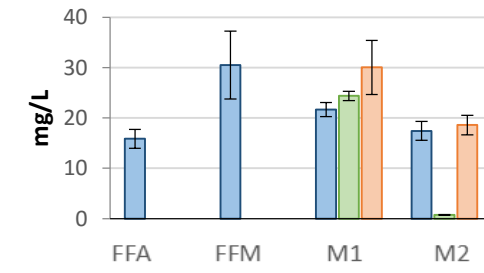
c. Pirrolidina



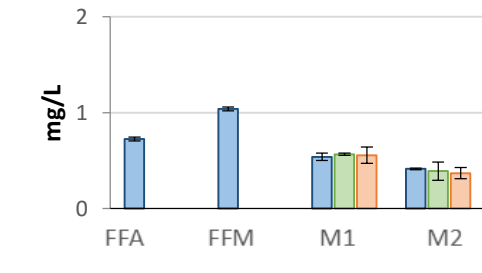
d. Isopropilamina



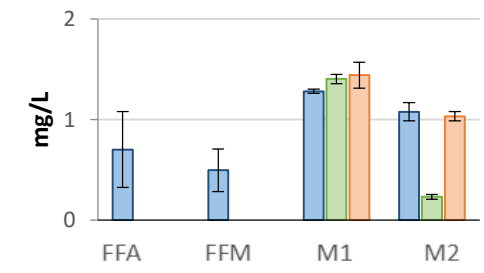
e. Dietilamina



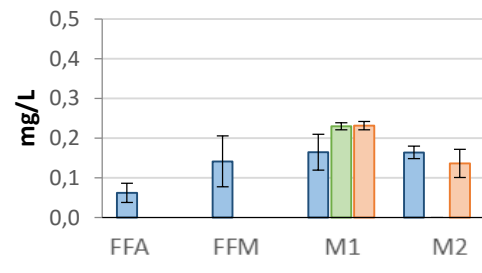
f. Isobutilamina



g. Amilamina



h. Hexilamina



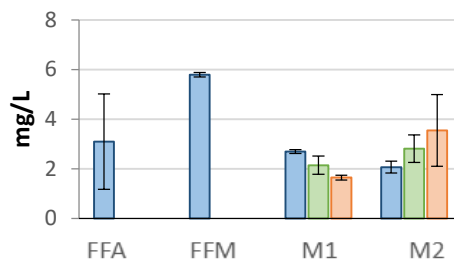
Control Salvia Olivo

Figura III.5 Evolución de las aminas volátiles en vino de uva Graciano tras las fermentaciones alcohólica (FFA), la fermentación maloláctica (FFM), tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

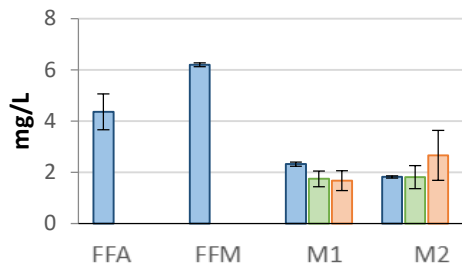
a. Dimetilamina

n.d.

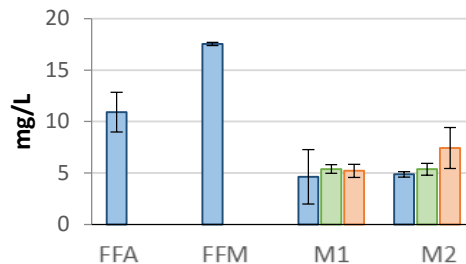
b. Etilamina



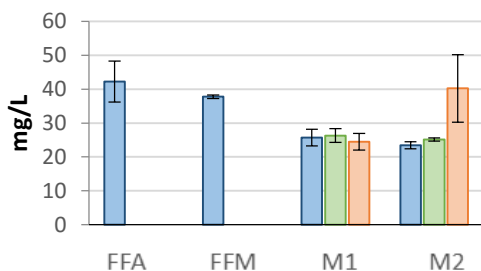
c. Pirrolidina



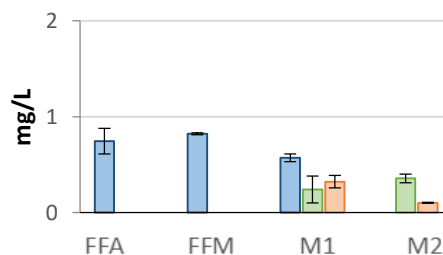
d. Isopropilamina



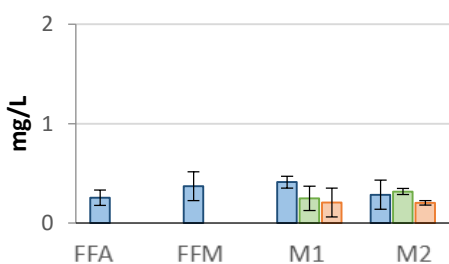
e. Dietilamina



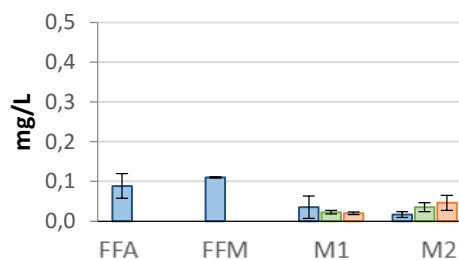
f. Isobutilamina



g. Amilamina



h. Hexilamina



Control Salvia Olivo

n.d. no detectada

Figura III.6 Evolución de las aminas volátiles en vino de uva Cabernet Sauvignon tras las fermentaciones alcohólica (FFA), la fermentación maloláctica (FFM), tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

III.4. EVOLUCIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES DE ORIGEN FERMENTATIVO

A continuación se detallará la evolución de los compuestos volátiles de origen fermentativo en el vino procedente de uva Cabernet Sauvignon. En un futuro se completará este trabajo con el estudio de la evolución de los compuestos volátiles de origen fermentativo de las otras dos variedades de vino.

III.4.1. Alcoholes superiores

A continuación, en las tablas III.2, III.3 y III.4 se recogen los valores de las concentraciones medias (\bar{x}) de alcoholes superiores así como sus umbrales de percepción (UP) y valores de la actividad del olor (OAV) en las distintas fases del estudio realizado, y según los conservantes utilizados. Los valores de actividad del olor se han calculado dividiendo las concentraciones medias por el umbral de percepción de cada compuesto (UP).

Rapp y Versini (1991), encontraron que concentraciones totales de alcoholes superiores por encima de 400 mg/L enmascaran los aromas del vino, mientras que concentraciones por debajo de 300 mg/L producen mayor complejidad el mismo. En el presente estudio, en ningún caso se ha sobrepasado la concentración límite de 300 mg/L.

Por otro lado, se puede apreciar que el único compuesto por encima del umbral de percepción (OAV>1) ha sido el 1-butanol, manteniéndose en concentraciones muy similares en todas las muestras de vinos estudiadas.

Las concentraciones de alcoholes superiores después de la fermentación maloláctica se mantienen constantes respecto a las obtenidas tras la fermentación alcohólica, salvo en el caso del 2-feniletanol cuya concentración disminuye.

Tabla III.2 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los alcoholes superiores tras la fermentación alcohólica (FFA) y tras la fermentación maloláctica (FFM) (n=4).

<i>Compuesto volátil</i>	FFA		FFM		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
1-butanol	131±2	3,27	130,6±0,9	3,27	40 ¹
n-hexanol	350±8	0,04	359±16	0,04	8000 ³
3-(metiltio)-1-propanol	127,0±0,9	0,13	126,3±0,6	0,13	1000 ²
alcohol bencílico	114,2±0,2	0,001	114,4±0,7	0,001	200000 ⁴
tirosol	277±25	-	258±24	-	Desc.
triptofol	n.d.	-	n.d.	-	Desc.
alcoholes isoamílicos	52261±1205	0,87	50873±1938	0,85	60000 ²
2-feniletanol	6086±161	0,43	5201±143	0,37	14000 ²
alcoholes totales	59347±1401		57063±2123		

¹Etievant (1991); ²Ferreira et al. (2000); ³Guth (1997); ⁴Gómez-Mínguez et al. (2007)

n.d. no detectado

Un mes después de la adición de los conservantes, las concentraciones de los distintos alcoholes siguen siendo similares a las obtenidas tras la fermentación maloláctica, salvo la de alcoholes isoamílicos, en los tres casos estudiados, y las de n-hexanol, 3-(metiltio)-1-propanol y tirosol, en el caso de la muestra control, que disminuyen. Se observa también que la concentración de 3-(metiltio)-1-propanol aumenta después de este primer mes al aplicar la combinación de SO_2 con extracto de salvia.

Trancurridos dos meses desde la adición de los conservantes la evolución de las concentraciones de los alcoholes superiores sigue siendo similar a la observada en los casos anteriores, es decir, en general se mantiene similar respecto a la determinada tras la fermentación alcohólica con algunas excepciones. En este caso, aumenta la concentración de 3-(metiltio)-1-propanol en la muestra control y en la de combinación de SO_2 con extracto de salvia, mientras que las de alcoholes isoamílicos y de 2-feniletanol disminuyen en las muestras tratadas con combinaciones de SO_2 con extractos, tanto de salvia como de olivo.

Tabla III.3 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los alcoholes superiores un mes después de la adición de los conservantes en muestras control (CbC), muestra tratada con la combinación de SO_2 y extracto de salvia (CbS) y muestra tratada con SO_2 y extracto de olivo (CbO) (n=4).

<i>Compuesto volátil</i>	CbC		CbS		CbO		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
1-butanol	129,6±0,6	3,24	130±1	3,26	130±2	3,24	40 ¹
n-hexanol	356±9	0,04	362±53	0,05	298±69	0,04	8000 ³
3-(metiltio)-1-propanol	135±2	0,13	136±5	0,14	125±4	0,12	1000 ²
alcohol bencílico	117±3	0,001	115±2	0,001	114±4	0,001	200000 ⁴
tirosol	244±30		249±72		233±43		Desc.
triptofol	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	Desc.
alcoholes isoamílicos	46398±4448	0,77	43034±2329	0,72	43715±2354	0,73	60000 ²
2-feniletanol	5160±350	0,37	4560±491	0,33	4773±218	0,34	14000 ²
alcoholes totales	52539±4843		48585±2952		49388±2693		

¹Etievant (1991); ²Ferreira et al. (2000); ³Guth (1997); ⁴Gómez-Mínguez et al. (2007)

n.d. no detectado

Tabla III.4 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los alcoholes superiores tras el segundo mes después de la adición de conservantes en muestras control (CbC), muestra tratada con la combinación de SO_2 y extracto de salvia (CbS) y muestra tratada con SO_2 y extracto de olivo (CbO) (n=4).

<i>Compuesto volátil</i>	CbC		CbS		CbO		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
1-butanol	130,4±0,5	3,26	129,2±0,2	3,23	129,0±0,4	3,23	40 ¹
n-hexanol	318±4	0,04	360±9	0,05	333±49	0,04	8000 ³
3-(metiltio)-1-propanol	126,8±0,9	0,13	134±2	0,13	132±4	0,13	1000 ²
alcohol bencílico	114,5±0,5	0,001	117,4±0,4	0,001	117±3	0,001	200000 ⁴
tirosol	191±8		279±3		247±51		Desc.
triptofol	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	Desc.
alcoholes isoamílicos	40192±683	0,67	28335±433	0,47	29797±814	0,50	60000 ²
2-feniletanol	5059±52	0,37	4283±261	0,33	4876±335	0,34	14000 ²
alcoholes totales	46132±749		33637±709		35630±1256		

¹Etievant (1991); ²Ferreira et al. (2000); ³Guth (1997); ⁴Gómez-Mínguez et al. (2007)

n.d. no detectado

III.4.2. Ésteres

A continuación, en las tablas III.5, III.6 y III.7 se recogen los valores de las concentraciones medias (\bar{x}) de ésteres así como sus umbrales de percepción (UP) y valores de la actividad del olor (OAV) en las distintas fases del estudio realizado, y según los conservantes utilizados. Los valores de actividad del olor se han calculado como en el caso de los alcoholes.

Observando los resultados queda claro que los compuestos que contribuyen en mayor medida al aroma de estos vinos son el acetato de isoamilo, el hexanoato de etilo y el octanoato de etilo, ya que sus valores de actividad (OAV) están muy por encima de 1. Asimismo, se observa que en general la concentración de ésteres disminuye después de la fermentación maloláctica, excepto en los casos del decanoato de etilo, malato de dietilo y 3-hidroxibutirato de etilo en los que se mantiene similar a la obtenida tras la fermentación alcohólica, y en el caso del acetato de isoamilo que aumenta.

Tabla III.5 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los ésteres tras la fermentación alcohólica y maloláctica (n=4).

<i>Compuesto volátil</i>	FFA		FFM		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
acetato de isoamilo	352±22	11,7	427±31	14,2	30 ²
hexanoato de etilo	355±7	25,4	253±20	18,1	14 ²
octanoato de etilo	201±3	40,2	153±14	30,6	5 ²
decanoato de etilo	20,1±0,3	0,1	20±5	0,1	200 ²
succinato de dietilo	178±2	0,0	123±6	0,0	200000 ¹
succinato ácido de etilo	991±282	0,0	648±126	0,0	1200000 ³
lactato de etilo	212±5	0,0	160±2	0,0	155000 ⁴
malato de dietilo	124,1±0,9	0,0	124,1±2	0,0	10000 ³
3-hidroxibutirato de etilo	95,9±0,2	0,0	96,8±0,3	0,0	20000 ⁵
esteres totales	2530±322		2005±206		

¹Etievant (1991); ²Ferreira et al. (2000); ³Peinado et al. (2004); ⁴Duarte et al. (2004); ⁵Gómez-Mínguez et al (2007)

n.d. no detectado

Un mes después de la adición de los distintos conservantes al vino las concentraciones de ésteres se mantienen constantes salvo en hexanoato de etilo, octanoato de etilo y succinato de dietilo al utilizarse el conservante control y la combinación con salvia, y decanoato de etilo al

empleare el conservante control quienes aumentan su concentración respecto a la determinada tras la fermentación maloláctica.

Tabla III.6 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los ésteres un mes después de la adición de los conservantes en muestras control (CbC), muestra tratada con la combinación de SO_2 y extracto de salvia (CbS) y muestra tratada con SO_2 y extracto de olivo (CbO) (n=4).

<i>Compuesto volátil</i>	CbC		CbS		CbO		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
acetato de isoamilo	382±45	12,7	392±49	13,1	374±71	12,5	30 ²
hexanoato de etilo	373±7	26,7	372±43	26,6	318±70	22,7	14 ²
octanoato de etilo	244±19	48,8	211±27	42,1	175±18	35,0	5 ²
decanoato de etilo	35±5	0,2	28±6	0,1	20±4	0,1	200 ²
succinato de dietilo	145±1	0,001	146±16	0,001	132±31	0,001	200000 ¹
succinato ácido de etilo	753±49	0,001	740±86	0,001	911±199	0,001	1200000 ³
lactato de etilo	163±2	0,001	160±15	0,001	177±30	0,001	155000 ⁴
malato de dietilo	126,5±0,9	0,013	125±3	0,012	124±5	0,012	10000 ³
3-hidroxibutirato de etilo	96,7±0,3	0,005	96,0±0,9	0,005	95±2	0,005	20000 ⁵
ésteres totales	2318±129		2269±245		2326±430		

¹Etievant (1991); ²Ferreira et al. (2000); ³Peinado et al. (2004); ⁴Duarte et al. (2004); ⁵Gómez-Mínguez et al (2007)
n.d. no detectado

Durante el segundo mes las concentraciones hexanoato de etilo, octanoato de etilo y succinato de dietilo, en los casos de los tres conservantes empleados, la de succinato ácido de etilo en las combinaciones de SO_2 con extractos, y la de malato de etilo, tan sólo tras el empleo de la combinación con salvia aumentan respecto a la de la fermentación maloláctica, mientras que las de acetato de isoamilo, en la combinación de SO_2 con extracto de olivo, y de 3-hidroxibutirato de etilo y de lactato de etilo, en el caso del control, disminuyen.

Comparando las concentraciones de ésteres uno y dos meses después de la adición de los conservantes, se observa que tras dos meses las concentraciones en la muestra control disminuyen salvo la de acetato de isoamilo y malato de dietilo que permanecen constantes. En cuanto a los vinos tratados con salvia y olivo, la mayoría de concentraciones de ésteres se mantienen constantes respecto al primer mes salvo en el caso de la combinación de SO_2 con

extracto de salvia la de succinato de dietilo y en la combinación con extracto de olivo la de octanoato de etilo, que aumentan ligeramente.

Tabla III.7 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los ésteres dos meses después de la adición de los conservantes en muestras control (CbC), muestra tratada con la combinación de SO_2 y extracto de salvia (CbS) y muestra tratada con SO_2 y extracto de olivo (CbO) (n=4).

<i>Compuesto volátil</i>	CbC		CbS		CbO		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
acetato de isoamilo	395±23	13,2	366±32	12,2	316±32	10,5	30 ²
hexanoato de etilo	340±11	24,3	412±18	29,4	389±56	27,8	14 ²
octanoato de etilo	192±7	38,4	222±21	44,3	220±41	43,9	5 ²
decanoato de etilo	20±4	0,1	21±3	0,1	25±7	0,1	200 ²
succinato de dietilo	133±4	0,001	168±4	0,001	166±29	0,001	200000 ¹
succinato ácido de etilo	589±17	0,000	823±18	0,001	1056±197	0,001	1200000 ³
lactato de etilo	153±3	0,001	158±1	0,001	173±16	0,001	155000 ⁴
malato de dietilo	125,1±0,2	0,013	128,7±0,9	0,013	127±4	0,013	10000 ³
3-hidroxi-butarato de etilo	95,7±0,3	0,005	96,4±0,2	0,005	96,1±1	0,005	20000 ⁵
esteres totales	2043±70		2395±99		2568±383		

¹Etievant (1991); ²Ferreira et al. (2000); ³Peinado et al. (2004); ⁴Duarte et al. (2004); ⁵Gómez-Mínguez et al (2007)

III.4.3. Ácidos

A continuación, en las tablas III.8, III.9 y III.10 se recogen los valores de las concentraciones medias (\bar{x}) de ácidos así como sus umbrales de percepción (UP) y valores de la actividad del olor (OAV) en las distintas fases del estudio realizado, y según los conservantes utilizados. Los valores de actividad del olor se han calculado como en los casos anteriores.

La concentración de los ácidos se mantiene constante tras la fermentación maloláctica salvo la del ácido hexanoico y la del ácido octanoico que aumentan. Henscke y Jiranek (1993), observaron que durante la fermentación aumenta la concentración de ácidos de cadena corta mientras que la de los de cadena larga se reduce.

Las concentraciones de ácido butírico, de ácido tetradecanoico y de ácido octadecadienoico se han mantenido constantes durante todo el periodo estudiado, sin haberse visto afectadas por el tipo de conservante utilizado.

Tabla III.8 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los ácidos tras la fermentación alcohólica (FFA) y tras la fermentación maloláctica (FFM) ($n=4$).

<i>Compuesto volátil</i>	FFA		FFM		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
ác. butírico (C4:0)	107 \pm 1	-	109 \pm 1	-	173 ¹
ác. hexanoico (C6:0)	349 \pm 10	8,3	438 \pm 30	10,4	42 ¹
ác. octanoico (C8:0)	1512 \pm 55	3,0	2031 \pm 55	4,1	500 ¹
ác. decanoico (C10:0)	311 \pm 14	0,3	337 \pm 17	0,3	1000 ¹
ác. dodecanoico (C12:0)	102,0 \pm 0,4	-	104 \pm 2	-	Desc.
ác. tetradecanoico (C14:0)	73,3 \pm 0,5	-	73,5 \pm 0,4	-	Desc.
ác. hexadecanoico (C16:0)	84 \pm 3	-	93 \pm 6	-	Desc.
ác. octadecanoico (C18:0)	279 \pm 66	-	288 \pm 121	-	Desc.
ác. octadecadienoico (C18:2)	115 \pm 2	-	121 \pm 5	-	Desc.
ácidos totales	2895 \pm 153	-	3595 \pm 237	-	

¹Ferreira et al. (2000)

Un mes después de la adición de conservantes, se observa que las concentraciones de todos los ácidos se mantienen constantes salvo la del los ácidos decanoico y dodecanoico en la muestra control y la del ácido octadecanoico en las combinaciones de SO₂ que aumentan respecto a la determinada tras la fermentación maloláctica.

Tras el segundo mes se observa que las concetraciones de los ácidos dodecanoico y hexadecanoico, en las tres combinaciones conservantes, los ácidos octanoico y decanoico, en la muestra control y en la combianción con salvia, y el ácido octadecanoico, en ambas combianciones con extracto, disminuyen su concentración respecto al primer mes. El comportamiento de la concentración de ácido hexanoico tras este segundo mes es diferente para cada uno de los conservantes utilizados. En el caso control disminuyen, mientras que en la combinación con salvia se mantiene similar a la del primer mes, y por último, en la combinación de SO₂ con extracto de olivo aumenta.

En el caso de los tres vinos estudiados, la aportación al aroma más importante en este grupo de compuesto la realizará el ácido hexanoico, ya que es el que posee mayor valor de actividad del olor. El ácido octanoico tendrá también cierta contribución, más importante en el caso del vino tratado con una combinación de SO₂ con extracto de olivo.

Tabla III.9 Concentraciones (µg/L), umbrales de percepción (UP, µg/L) y valores de la actividad del olor (OAV) para los ácidos un mes después de la adición de conservantes en muestras control (CbC), muestra con la combinación de SO₂ y extracto de salvia (CbS) y muestra con SO₂ y extracto de olivo (CbO) (n=4).

<i>Compuesto volátil</i>	CbC		CbS		CbO		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
ác. butírico (C4:0)	108±1	-	109±3	-	107±4	-	173 ¹
ác. hexanoico (C6:0)	428±21	10,2	416±53	9,9	334±73	8,0	42 ¹
ác. octanoico (C8:0)	2048±107	4,1	1855±178	3,7	1488±451	3,0	500 ¹
ác. decanoico (C10:0)	390±17	0,4	325±35	0,3	304±62	0,3	1000 ¹
ác. dodecanoico (C12:0)	110±1	-	106±1	-	106±3	-	Desc.
ác. tetradecanoico (C14:0)	75±1	-	75,0±0,6	-	73,4±0,4	-	Desc.
ác. hexadecanoico (C16:0)	114±27	-	111±8	-	101±11	-	Desc.
ác. octadecanoico (C18:0)	226±40	-	1595±245	-	704±253	-	Desc.
ác. octadecadienoico (C18:2)	129±18	-	126±12	-	121±7	-	Desc.
ácidos totales	3628±234		4717±537		3338±863		

¹Ferreira et al. (2000)

Tabla III.10 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los ácidos dos meses después de la adición de los conservantes en muestras control (CbC), muestra tratada con la combinación de SO_2 y extracto de salvia (CbS) y muestra tratada con SO_2 y extracto de olivo (CbO) ($n=4$).

<i>Compuesto volátil</i>	CbC		CbS		CbO		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
ác. butírico (C4:0)	106,8 \pm 0,4	-	110,1 \pm 0,2	-	108 \pm 2	-	1731
ác. hexanoico (C6:0)	386 \pm 4	9,2	455 \pm 14	10,8	419 \pm 67	10,0	421
ác. octanoico (C8:0)	382 \pm 64	0,8	894 \pm 436	1,8	1676 \pm 164	3,4	5001
ác. decanoico (C10:0)	280 \pm 7	0,3	298 \pm 14	0,3	323 \pm 35	0,3	10001
ác. dodecanoico (C12:0)	101,5 \pm 0,3	-	100,8 \pm 0,6	-	105 \pm 4	-	Desc.
ác. tetradecanoico (C14:0)	73,0 \pm 0,4	-	73,2 \pm 0,2	-	78 \pm 6	-	Desc.
ác. hexadecanoico (C16:0)	90 \pm 6	-	93 \pm 7	-	97 \pm 11	-	Desc.
ác. octadecanoico (C18:0)	259 \pm 56	-	333 \pm 57	-	233 \pm 22	-	Desc.
ác. octadecadienoico (C18:2)	117 \pm 6	-	118 \pm 4	-	117 \pm 4	-	Desc.
ácidos totales	1796 \pm 143		2476 \pm 532		3156 \pm 316		

¹Ferreira et al. (2000)

III.4.4. Compuestos carbonílicos y otros compuestos volátiles del vino

A continuación, en las tablas III.11, III.12 y III.13 se recogen los valores de las concentraciones medias (\bar{x}) de compuestos carbonílicos y de la γ -butirolactona así como sus umbrales de percepción (UP) y valores de la actividad del olor (OAV) en las distintas fases del estudio realizado, y según los conservantes utilizados. Los valores de actividad del olor se han calculado como anteriormente.

La 3-hidroxi-2-butanona mantiene su concentración tras la fermentación maloláctica y después del primer mes tras la adición de los conservantes, salvo en el caso control en el que aumenta ligeramente. Tras el segundo mes su concentración disminuye en las muestras control y de combinación de SO_2 con extracto de olivo, manteniéndose estable en la combinación con salvia.

Tanto la acetovainillona como la γ -butirolactona presentan una concentración similar a la obtenida tras la fermentación alcohólica a lo largo de todo el estudio, sin mostrar diferencias en función del tipo de conservante utilizado, salvo en la muestra control dos meses después de añadir los conservantes en el que la concentración de acetovainillona disminuye.

Tabla III.11 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los compuestos carbonílicos y demás compuestos volátiles tras la fermentación alcohólica y maloláctica (n=4).

<i>Compuesto volátil</i>	FFA		FFM		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
3-hidroxi-2-butanona	132±2	0,001	134±4	0,001	100000 ¹
acetovainillona	123±1		121±2		Desc.
γ -butirolactona	123±1		119,4±0,7		Desc.

¹Moreno et al. (2005)

Tabla III.12 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los compuestos carbonílicos y demás compuestos volátiles un mes después de la adición de conservantes en muestras control (CbC), muestra tratada con la combinación de SO_2 y extracto de salvia (CbS) y muestra tratada con SO_2 y extracto de olivo (CbO) (n=4).

<i>Compuesto volátil</i>	CbC		CbS		CbO		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
3-hidroxi-2-butanona	149±3	0,001	138±4	0,001	136±6	0,001	100000 ¹
acetovainillona	122±3		124±4		120±6		Desc.
γ -butirolactona	120±2		120±5		115±7		Desc.

¹Moreno et al. (2005)

Tabla III.13 Concentraciones ($\mu\text{g/L}$), umbrales de percepción (UP, $\mu\text{g/L}$) y valores de la actividad del olor (OAV) para los compuestos carbonílicos y demás compuestos volátiles dos meses después de la adición de conservantes en muestras control (CbC), muestra tratada con la combinación de SO_2 y extracto de salvia (CbS) y muestra tratada con SO_2 y extracto de olivo (CbO) (n=4).

<i>Compuesto volátil</i>	CbC		CbS		CbO		UP
	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	\bar{x}	OAV	
3-hidroxi-2-butanona	138,6±0,6	0,001	136±2	0,001	128±4	0,001	100000 ¹
acetovainillona	116±2		124,6±0,9		125±4		Desc.
γ -butirolactona	116,4±0,8		120,4±0,8		117±6		Desc.

¹Moreno et al. (2005).

CONCLUSIONES

IV. CONCLUSIONES

Como conclusiones del presente trabajo se puede señalar:

1. Durante la fermentación alcohólica se generan aminos y no sólo durante la fermentación maloláctica.
2. Las concentraciones de las distintas aminos en el vino dependen de la uva utilizada para la producción del vino
3. La concentración de aminos fue muy semejante con los tres tipos de conservantes, aunque con la combinación de SO₂ con salvia las concentraciones de putrescina, feniletilamina+espermidina y espermina se reducen respecto al control dos meses después de la adición de los conservantes.
4. La aplicación de combinaciones de bajas concentraciones de SO₂ con extracto de salvia generan menores concentraciones de los denominados alcoholes mayoritarios (alcoholes isoamílicos y 2-feniletanol) respecto al control, mientras que las de los alcoholes minoritarios se mantienen similares o incluso aumentan.
5. Las combinaciones de SO₂ con extractos de salvia y olivo mejoran las concentraciones de los compuestos volátiles, ya que se observó una mayor concentración de ésteres y de γ -butirolactona respecto del control, dos meses después de la adición de los conservantes.

REFERENCIAS

V. REFERENCIAS

- Abe, K., Ohnishi, F., Yagi, K., Nakajima, T., Higuchi, T., Sano, M., Machida, M., Sardes, R. I., Maloney, P. C. **2002**. Plasmide-encoded as operon confers a proton motive metabolic cycle catalyzed by aspartate-alanine Exchange reaction. *Journal of Bacteriology*, 184, 2906-2913.
- Aerny, J. **1985**. Origène de l'histamine dans le vins. Connaissances actuelles. *Bulletin de l'Office International de la Vigne et du Vin*. 656-657,1016-1019.
- Aerny J. **1990**. Présence d'histamine et d'autres amines biogènes dan le vins. *Office International de la Vigne et le Vin*. 656-657, 1017-1020
- Allison, C., McFarlane, G. T. **1989**. Influence of pH, nutrients availability and growth rate on amine production by *Bacterioides fragilis* and *Clostridium perfringend*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55, 2894-2898.
- Amerine, M. A., Roessler, E. B. **1983**. Wines. Their sensory evaluation. Freeman, New York.
- Ancín, C., Torrea, D., Fraile, P., Garde, T. **2004**. Amino acids and volatile compounds in the fermentation of inoculated musts: biogenic amines in the wine. En: *Nutraceutical Beverages. Chemical Nutrition and Health effects*. Shahidi, F. Weerasinghe, D. K. (Eds). ACS Symposium Series 871, Whashington. Pp 302-313.
- Askar, A., Terptor, H. **1986**. Biogene amine in Lebensmitteln. Vorkornmen, Bedeutung und Bestimmung. Eugen Ulmer GmbH and co, Stuttgart, Germany.
- Barril, C., Clark, A. C., Scollary, G. R. **2012**. Chemistry of ascorbic acid and sulfur dioxide as an antioxidant system relevant to white wine. *Analytica Chimica Acta*, 732, 186-193.
- Bauza, T., Blaise, A., Teissedre, P., Mestre, J. P., Daumas, F., Cabanis, J.C. **1995**. Evolution de teneurs en amines biogènes des moûts et des vins au cours de la vinification. *Science des Aliments*, 15, 559-570.
- Bertrand, A., Ingargiola, M. C., Delas, J. **1991**. Effect of nitrogen fertilization snd grafting on the composition of must and wine from merlot grapes, particularly onthe prescence of ethyl carbamate. En: *Proceeding of the International Symposium of Nitrogen in Grapes and Wine*, Rantz, J. (Ed.) American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA. pp 215-220.
- Bover-Cid, S., Holzapfel, W. H. **1999**. Improved dccreeing procedure for biogenic amine production bay lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 53, 33-41.
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E. **1995**. Yeast and biochemistry of etanol fermentation. En: *Principles and practices of wine making*. Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L.F., Kunkee, R. E. (Eds). Champan and Hall, New York. pp 102-181.

- Busto, O., Guasch, J., Borrull, F. **1995**. Improvement of solid-phase extraction applied to the determination of biogenic amines in wines. *Journal of Chromatography*, 718, 307-317.
- Cardona-Gálvez M., Gonzáles-Domínguez, A. **2005**. Intoxicación histamínica o escombroidosis en pescado. *Alimentaria*, 365, 68-73.
- Cejudo-Bastante, M. J., Sonni, F., Chinnici, F., Versari, A., Perez-Coello, M. S., Riponi, C. **2010**. Fermentation of sulphite-free musts with added lysozyme and oenological tannins: Nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 1501-1507.
- Cerutti, C., Remondi, L. **1972**. Histamina, tiramina e altre amine fisiche nei vini italiani. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 25, 66-78.
- Ciolfi, C., Castino, M., Di Stefano, R. **1985**. Studio sulla risposta metabolica di lieviti di specie diverse fermentati un unico mosto a temperatura comprese fra 10 e 40°C. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, 10, 489-507.
- Crouzet, J. **1986**. Les enzymes et l'arôme des vins. *Revue Française d'Oenologie*, 102, 42-49
- Crowell, E.A., Guymon, J. F. **1963**. Influence of aeration and suspended material on higher alcohols, acetoin and diacetyl during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 14, 214-222.
- Drawert, F., Schreier, P., Scherer, W. **1974**. Gaschromatographisch-massenspektrometrische Untersuchung flüchtiger Inhalstoffe des Weines. III. Säuren des Weinaromas. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 155, 342.
- Duarte, W. F., Dias, D. R., Oliveira, J. M., Teixeira, J. A., de Almeida e Silva, J. B., Schwan, R. F. **2010**. Characterization of different fruit wines made from cacao, cupuassu, gabioba, jaboticada and umbu. *LWT – Food Science and Technology*, 43, 1564-1572.
- Erwin, J., Bloch, K. **1964**. Biosynthesis and distribution of unsaturated fatty acids. En: *Metabolism and Physiological Significance of Lipids. The Proceedings of the advanced study course*. Dawson, R. M., Rhodes, D. N. (Eds.) John Wiley & Sons, London. pp 29-31.
- Etievant, P. X. **1991**. Volatile compound in food and beverages, Marcel Dekker, New York, EEUU.
- Farbas, J. **1988**. Technology and biotechnology of wine. Volume 1. Gordon and Breach Science publishers. New York.
- Ferreira, V., López, R., Cacho, J. **2000**. Quantitative determination of odorants of Young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1659-1667.
- Forsythe, W.I., Redmond, A. **1974**. Two controlled trials of tyramine in children with migraine. *Development Medicine and Child Neurology*, 16, 794-799.
- Fugelsang, K.C. **1997**. Wine Microbiology. Chapman and Hall, New York.

- Gerbaux, V., Monamy, C. **2000**. Biogenic amines in Burgundy wines. Content san origin in wines. *Revue Français de Oenologues*, 183,25-28.
- Glória, M. B. A., Barbour, J. F., Scnlan, R. A. **1997**. N-Nitrosodimethylamine in Brazilian, U. S. domestic and U.S. imported beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 814-816.
- Glória, M. B. A., Watson, B. T., Simon-Sarkadi, L., Daeschel, M. A. **1998**. A survey of biogenic amines in Oregon Pinot noir and Cabernet sauvignon wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 279-282.
- Gómez-Mínguez, M. J., Cacho, J., Ferreira, V., Vicario, I. M., Heredia, F. J. **2007**. Volatile components of Zalema white wines. *Food Chemistry*, 100, 1464-1473.
- González-Marco, A., Ancín-Azpilicueta, C. **2006**. Amine concentrations in wine stored in bottles at different temperatures. *Food Chemistry*, 99, 680-685.
- González-Marco, A., Jimenez-Moreno, N., Ancín-Azpilicueta, C. **2006**. Influence of addition of yeast autolysate on the formation of amines in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86, 2221-2227.
- González-Rompinelli, E. M., Rodríguez-Bencomo, J. J., García-Ruiz, A., Sánchez-Patán, F., Martín-Álvarez, J., Bartolomé, B., Moreno-Arribas, M. V. **2013**. A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extract as preservatives during wine ageing in barrels. *Food Control*, 33, 440-447.
- Guerrero, R. F., Cantos-Villar, E. **2015**. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. *Trends in Food Science & Technology*, 42, 27-43.
- Guth, H. **1997**. Quantitation and sensory studies of carácter impact odorants of different white wines varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 3027-3032.
- Halász, A., Baraáth, A., Simon-Sarkadi, L., Holzapfel, W. **1994**. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 42-49.
- Herbert, P., Cabrita, M. J., Ratola, N., Laureano, O., Alves, A. **2005**. Free amino acids and biogenic amines in wines and musts from the Alentejo región. Evolution of amines during alcoholic fermentation and relationship with variety, sub-region and vintage. *Journal of Food Engineering*. 66, 315-322.
- Henske P. A., Jiranek V. **1993**. Yeast-metabolism of nitrogen compounds. En: Wine microbiology and biotechnology. Fleet, G.H. (Ed). Hardwood Academic publishers, Chur, pp 77-164.
- Herold, B., Pfeiffer, P. Radler, F. **1995**. Determination of the three isomers of 2,3-butanediol formed by yeasts or lactic acid bacteria during fermentation. *Journal of Enology and Viticultue*, 46, 134-137.

- Izquierdo-Cañas, P. M., García Romero, E., Huertas-Nebreda, B., Gomez-Alonso, S. **2012**. Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control*, 23, 73-81.
- Jackson, R. S. **1994**. Chemical constituents of grapes and wine. En: *Wine Science Principles and Applications*. Academic Press, San Diego, California.
- Jimenez-Moreno, N., Torrea-Goñi, D., Ancín-Azpilicueta, C. **2003**. Changes in amine concentrations during aging of red wine in oak barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5732-5737.
- Klingshirm, L. M., Liu, J. R., Gallanger, J. F. **1987**. Higher alcohol formation in wines as related to the particle size profiles of juice insoluble solids. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 207-210.
- Konnings, W. N., Lolkema, J. S., Bolhuis, H., van Veen, H. W., Poolman, B., Driessen, A. J. M. **1997**. The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek*, 71, 117-128.
- Kovacevi Ganic, K., Gracin, L., Komes, D., Curko, N., Lovric T. **2009**. Changes of the content of biogenic amines during winemaking of Sauvignon wines. *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1 (2), 21-27.
- Lea, A.G., Arnold, G. M. **1978**. The phenolics of ciders: Bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 478-483.
- Lehtonen, P., Saarinen, M., Vesanto, M., Riekkola, M. L. **1992**. Determination of wine amines by HPLC using automated precolumn derivatisation with o-phthalaldehyde and fluorescence detection. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 194, 434-437.
- Lehtonen, P. **1996**. Determination of amines and amino acids in wine. A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 127-133.
- Lonvaud-Funel, A. **2001**. Biogenic amines in wine: role of acid lactic bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 199, 9-13.
- López, R., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V. **2002**. Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 136, 65-74.
- Maga, J. A. **1978**. Amines in food. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 12, 373-403.
- Mariné-Font, A. **1978**. Alimentos y medicamentos: Interacciones (3ª parte). *Circular Farmacéutica*, 258, 43-45.
- Martín-Álvarez, P. J., Marcobal, A., Polo, C., Moreno-Arribas, M.V. **2006**. Influence of technological practices on biogenic amine content in red wines. *European Food Research and Technology*, 222, 420-424.

- Mayer, K., Pause, G. **1973**. Nicht-flüchtige biogene amine im wein. *Mitteilungen aus dem Geibiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 64, 171-179.
- Meilgaard, M. C. **1975**. Aroma volátiles in beer: purification, flavour, threshold and interaction. En: Geruch und Geschmacksstoffe. Draw, F. (Ed). Verlag Hans Carl, Nuremberg. pp 211-254.
- Meyer, F., Bloch, K. 1963. Effect of temperatura on the enzymatic synthesis of unsaturated fatty acids in *Torulopsis utilis*. *Biochimica and Biophysica Acta*, 77, 671-673.
- Miller, J. C., Miller, J. N. **1993**. Estadística para Química Analítica, 2ªEd., Addison-Wesley Iberoamericana, S.A., Wilmington, Detroit, EEUU.
- Molenaar, D., Bosscher, J. C., ten Brink, B., Driessen, A. J. M., Konings, W. N. **1993**. Generation of a proton motive force by histidine decarboxylation and electrogenic histidine/histamine antiport in *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Bacteriology*, 175, 2864-2870
- Moreno, J. A., Zea, L., Moyano, L., Medina, M. **2005**. Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control*, 16, 333-338.
- Muller, C. J., Kepner, R. E., Webb, A. D. **1973**. Lactones in wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 24, 5-9.
- Nieto-Rojo, R., Luquin, A., Ancín-Azpilicueta, C. **2015**. Improvement of wine aromatic quality using mixtures of lysozyme and dimethyl dicarbonate, with low SO₂ concentration. *Food Additives & Contaminants*, 32, 1965-1975.
- Nordström, K. **1964**. Studies on the formation of volatile esters in fermentation with brewer's yeast. *Svensk Kemiska Tidskrift*, 76, 510-543.
- Nykaenen, L., Suomalainen, H. **1983**. Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. D. Reidel Publishing Company. Dordrecht, Holland.
- Nykaenen, L. **1986**. Formation and occurrence of flavour compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 84-96.
- Ough, C. S., Crowel, E. A. **1980**. Nitrate determination in California USA musts and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 31, 344-346.
- Ough, C. S., Daudt, C. E. **1981**. Quantitative determination of volatile amines in grapes and wines. I. Effect of fermentation and storage temperature on amine concentration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 32, 185-188.
- Ough, C. S., Daudt, C. E., Crowell, E. A. **1981**. Identification of new volatile amines in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29, 938-941.

- Palamand, S. R., Hardwick, W. A., Markl, K. S. **1969**. Volatile amines in beer and their influence on beer flavour. *Proceedings of the American Society of Brewing Chemists*, American Society of Brewing Chemists, Baltimore 78-83.
- Peinado, R. A., Mauricio, J. C., Medina, M., Moreno, J. J. **2004**. Effect of *Schizosaccharomyces pombe* on aromatic compounds in dry Sherry wines containing high levels of gluconic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4529-4534.
- Petri, R., Antonelli, M. L., Bernacchia, R., Vinci, G. **2015**. Fast determination of biogenic amines in beverages by core-shell particle column. *Food Chemistry*, 187, 555-562.
- Peynaud, E. **1993**. Enología práctica. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Radler, F. **1973**. Bedeutung und Möglichkeiten der Verwendung von Reinkulturen von Hefen bei der Weinbereitung. *Weinberg und Keller*, 20, 339-350.
- Radler, F., Fäth, K. P. **1991**. Histamine and others amines in wines. En: *Proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wine*. Rantz, J. (Ed). American Society for Enology and Viticulture, Davis, CA. pp 185-195.
- Rankine, B. C. **1967**. Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste threshold. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 18, 583-589.
- Rapp, A., Güntert, M. **1986**. Change in aroma substances during the storage of white wines in bottles. En: *The self life of foods and beverages*. Charambolus, G. (Ed). Elsevier, Amsterdam. pp 141-167.
- Rapp, A., Mandery, H. **1986**. Wine aroma. *Experientia*, 42, 873-884.
- Rapp, A., Versini, G. **1991**. Influence of nitrogen compounds in grapes on aroma compounds in wine. En: *Proceedings of the International Symposium on Nitrogen in Grapes and Wine*. Ratz, J. (Ed). American Chemical Society for Enology and Viticulture, Seattle. pp 156-164.
- Rasposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M., Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R. F., Cantos-Villar, E. **2016**. Effect of hydroxytyrosol on quality of dioxide-free red wine. *Food Chemistry*, 192, 25-33.
- Rasposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M., Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R. F., Ortiz, V., Cantos-Villar, E. **2016**. Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine, *Food Chemistry*, 197, 1102-1111.
- Rasposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M., Zafrilla, P., Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R. F., Cantos-Villar, E. **2016**. Replacement of sulfur dioxide by hydroxytyrosol in white wine: Influence on both quality parameters and sensory. *LWT – Food Science and Technology*, 65, 214-221.
- Ribéreau-Gayon. P. **1978**. Wine flavour. En: *Flavour of foods and beverages. Chemistry and Technology*. Charambous, G., Inglette, G. E. (Eds). Academic Press, New York. pp 182-223.

- Rice, S. L., Eitenmiller, R. R., Koehler, P. E. **1976**. Biologically active amines in food. A review. *Journal of Milk and Food Technology*, 39, 353-358.
- Romano, P. **1997**. Metabolic characteristics of wine strains during spontaneous and inoculated fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 35, 255-260.
- Ronkainen, P., Brummer, S., Suomalainen, H. **1970**. Diacetyl and formic acid as a decomposition product of 2-acetolactic acid. *Acta Chemica Scandinavica*, 24, 340-346.
- Ruiz-Moreno, M. J., Rasposo, R., Moreno-Rojas, J. M., Zafrilla, P., Cayuela, J.M., Mulero, J., Puertas, B., Guerrero, R. F., Piñeiro, Z., Giron, F., Cantos-Villar, E. **2015**. Efficacy of olive oil mill in replacing dioxide in wine model. *LWT – Food Science and Technology*, 61, 117-123.
- Sandler, M., Youdin, M. B. H., Hanington, E. **1974**. A phenylethylamine oxidase defect in migraine. *Nature*, 250, 335-336.
- Salaha, M. I., Kallithraka, S., Marmara, I., Koussiss, E., Tzourou, I. **2008**. A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on color, antioxidant activity and anthocyanin content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 660-666.
- Scandal, R.A., Barbour, J. F., Castegnaro, M., Clark, T., Fazio, T., Feit, M., Fiddler, W., Griffith, A., Herwig, W., Koski, P. **1982**. Nitrosamines in malt and beer. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 40, 461-466.
- Schreier, P. **1979**. Flavor composition of wines. A review. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59-111.
- Shinohara, T., Saito, K., Yanagida, F., Goto, S. **1994**. Selection and hybridization of wine yeasts for improved winemaking properties: Fermentation rate and aroma productivity. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 77, 428-431.
- Silla-Santos, M. H., **1996**. Biogenic amines: their importance in food. *International Journal of Food Microbiology*, 29, 213-231.
- Slaughter, J. C., Uvgard, A. R. **1971**. Volatile amines of malt and beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 77, 446-450.
- Sonni, F., Cejudo-Bastante, M. J., Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. **2009**. Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 688-696.
- Sonni, F., Chinnici, F., Natali, N., Riponi, C. **2011**. Pre-fermentative replacement of sulphur dioxide by lysozyme and oenological tannins: Effect on the formation and evolution of volatile compounds during the bottle storage of white wines. *Food Chemistry*, 129, 1193-1200.
- Soufleros, E., Barrios, M., Bertrand, A. **1998**. Correlation between the content of biogenic amines and other wine compounds. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 266-278.

- Straub, B. W., Kichere, M., Schilcher, S. M., Hammes, W. P. **1995**. The formation of biogenic amines by fermentation organisms. *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung A*, 201, 79-82.
- Suomalainen, H., Lehtonen, M. **1979**. The production of aroma compounds by yeasts. *Journal of the Institute of Brewing*, 85, 149-156.
- Ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. M. L. J., Huis in't Veld, J. H. J. **1990**. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food and Microbiology*, 11, 73-84.
- Torrea-Goñi, D., Ancín-Azpilicueta, C. **2001**. Influence of yeast strain in biogenic amines content in wine: relationship with the utilization of amino acids during fermentation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 185-190.
- Torrea, D., Ancín, C. **2002**. Content of biogenic amines in a Chardonnay wine obtained through spontaneous and inoculated fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 4895-4899.
- Vally, H., Thompson, P. J., **2001**. Role of sulfite additives in wine induces asthma: single dose and cumulative dose studies. *Thorax*, 56, 763-769.
- Vally H., Misso N. L. A., Mandan, V. **2009**. Clinical effects of sulphite additives. *Clinical & Experimental Allergy*, 39, 1643-1651.
- Vally H., Misso N. L. A. **2012**. Adverse reactions to the sulphite additives. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 5(1), 16-23.
- Vidal-Carou, M. C., Mariné-Font, A. **1985**. Histamina en vinos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos*, 25, 58-78.
- Wang, Y. Q., Ye, D. Q., Zhu, B. Q., Wu, G. F., Duan, C. Q. **2014**. Rapid HPLC analysis of amino acids and biogenic amines in wine during fermentation and evaluation of matrix effect. *Food Chemistry*, 163, 6-15.
- Webb, A. D., Muller, C. J. **1972**. Volatile aroma components of wines and other fermented beverages. *Advances in Applied Microbiology*, 15, 75-146.
- Zee, I. A., Simard, R. E., L'Heureux, L. **1983**. Biogenic amines in wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 34, 6-9.
- Zeeman, W., Snyman, J. P., van Wyk, C. J. **1982**. The influence of yeast strain and malolactic fermentation on some volatile bouquet substances and on quality of table wines. En: *Proceeding of the Grape and Wine Centennial Symposium*. University of California Press, Davis. pp 79-90.
- Zoecklin, B.W., Fugelesang, K. C., Gump, B. H., Nury, F. S. **1995**. *Wine Analysis and Production*. Chapman and Hall, New York.

ANEXOS

VI. ANEXOS

VI.1. ANEXO 1: TABLAS DE RESULTADOS

En este Anexo se recogen las tablas con los resultados correspondientes a los análisis cromatográficos de las aminas que han sido representados en el capítulo 3 del presente trabajo.

Tabla VI.1 Evolución de las aminas biógenas en vino de uva Garnacha tras las fermentaciones alcohólica (FFA) y maloláctica (FFM) y tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

		Histamina	Tiramina	Putrescina
Control	FFA	420 ± 37	40 ± 22	33 ± 3
	FFM	417 ± 113	49 ± 11	37 ± 7
	M1	212 ± 16	25 ± 2	30 ± 3
	M2	147 ± 35	19 ± 5	21 ± 6
Salvia	M1	228 ± 7	19 ± 11	29 ± 1
	M2	142 ± 17	17 ± 2	1,1 ± 0,1
Olivo	M1	152 ± 90	22 ± 2	26 ± 3
	M2	171 ± 9	21 ± 1	24 ± 2
		Cadaverina	F+E*	Espermina
Control	FFA	3,0 ± 0,4	19 ± 1	3,9 ± 0,3
	FFM	3,8 ± 0,7	21 ± 3	4,1 ± 0,2
	M1	1,4 ± 0,2	15,1 ± 0,5	3,9 ± 0,3
	M2	1,0 ± 0,2	10 ± 3	2 ± 1
Salvia	M1	1,30 ± 0,04	13,3 ± 0,5	3,2 ± 0,7
	M2	0,9 ± 0,1	10 ± 3	2,1 ± 0,4
Olivo	M1	1,08 ± 0,06	12 ± 2	1,7 ± 0,2
	M2	1,38 ± 0,06	11,4 ± 0,7	2,6 ± 0,1

*Feniletilamina + Espermidina

Tabla VI.2 Evolución de las aminas biógenas en vino de uva Graciano tras las fermentaciones alcohólica (FFA) y maloláctica (FFM) y tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

		Histamina	Tiramina	Putrescina
Control	FFA	207 ± 70	36 ± 10	16 ± 2
	FFM	584 ± 190	60 ± 13	31 ± 7
	M1	162 ± 6	21 ± 1	22 ± 1
	M2	95 ± 70	17 ± 1	17 ± 2
Salvia	M1	187 ± 12	23 ± 1	24 ± 1
	M2	17 ± 3	35 ± 6	0,7 ± 0,1
Olivo	M1	195 ± 28	24 ± 3	30 ± 5
	M2	138 ± 10	20 ± 2	19 ± 2
		Cadaverina	F+E	Espermina
Control	FFA	1,2 ± 0,4	2 ± 2	2,0 ± 0,5
	FFM	3 ± 1	5 ± 2	3 ± 1
	M1	0,9 ± 0,6	2 ± 2	3 ± 1
	M2	0,82 ± 0,04	3,3 ± 0,3	2,7 ± 0,8
Salvia	M1	1,79 ± 0,06	4,8 ± 0,5	2,5 ± 0,5
	M2	0,7 ± 0,2	0,39 ± 0,08	-
Olivo	M1	1,9 ± 0,2	4,5 ± 0,4	3 ± 1
	M2	1,1 ± 0,2	2,9 ± 0,6	1,7 ± 0,9

*Feniletilamina + Espermidina

Tabla VI.3 Evolución de las aminas biógenas en vino de uva Cabernet Sauvignon tras garnacha tras las fermentaciones alcohólica (FFA) y maloláctica (FFM) y tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

		Histamina	Tiramina	Putrescina
Control	FFA	150 ± 88	19 ± 3	42 ± 6
	FFM	341 ± 10	30 ± 0,4	38 ± 0,1
	M1	130 ± 5	11 ± 1	26 ± 2
	M2	101 ± 0,1	9 ± 1	147 ± 35
Salvia	M1	116 ± 7	10 ± 1	26 ± 2
	M2	88 ± 51	10 ± 1	25 ± 0,5
Olivo	M1	111 ± 12	10 ± 1	24 ± 2
	M2	170 ± 39	15 ± 4	40 ± 10
		Cadaverina	F+E	Espermina
Control	FFA	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,1 ± 0,5
	FFM	2,321 ± 0,001	3,38 ± 0,05	2,02 ± 0,02
	M1	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,2	0,31 ± 0,02
	M2	0,8 ± 0,5	0,8 ± 0,2	0,4 ± 0,2
Salvia	M1	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,27 ± 0,04
	M2	1,1 ± 0,1	1,1 ± 0,3	0,28 ± 0,03
Olivo	M1	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,28 ± 0,06
	M2	1,7 ± 0,5	1,2 ± 0,2	0,34 ± 0,05

*Feniletilamina + Espermidina

Tabla VI.4 Evolución de las aminas volátiles en vino de uva tras Garnacha tras las fermentaciones alcohólica (FFA) y maloláctica (FFM) y tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

		Dimetilamina	Etilamina	Pirrolidina	Isopropilamina
Control	FFA	2,4 ± 0,2	11,0 ± 0,8	13 ± 1	28 ± 3
	FFM	2,5 ± 0,5	11 ± 2	13 ± 2	28 ± 6
	M1	1,2 ± 0,2	6,7 ± 0,4	8 ± 1	14,8 ± 0,6
	M2	1,0 ± 0,3	4 ± 2	5 ± 1	11 ± 2
Salvia	M1	1,3 ± 0,2	6,7 ± 0,6	6 ± 3	11 ± 7
	M2	0,9 ± 0,1	4,8 ± 0,9	4,7 ± 0,6	5 ± 5
Olivo	M1	1,09 ± 0,07	6 ± 1	6,0 ± 0,5	12 ± 1
	M2	1,02 ± 0,04	4,8 ± 0,3	5,3 ± 0,2	1,11 ± 0,05
		Dietilamina	Isobutilamina	Amilamina	Hexilamina
Control	FFA	33 ± 3	1,4 ± 0,1	6,9 ± 0,3	0,21 ± 0,01
	FFM	37 ± 7	1,4 ± 0,2	7,17 ± 0,05	0,3 ± 0,1
	M1	30 ± 3	1,17 ± 0,05	4,1 ± 0,7	0,29 ± 0,02
	M2	21 ± 6	0,4 ± 0,2	3,2 ± 0,9	0,11 ± 0,05
Salvia	M1	29 ± 0,5	0,8 ± 0,1	4,1 ± 0,6	0,09 ± 0,01
	M2	1,1 ± 0,1	0,5 ± 0,2	2,8 ± 0,5	0,13 ± 0,05
Olivo	M1	21 ± 6	0,75 ± 0,08	3,6 ± 0,4	0,15 ± 0,07
	M2	24 ± 2	0,64 ± 0,02	3,3 ± 0,2	0,23 ± 0,01

Tabla VI.5 Evolución de las aminas volátiles en vino de uva Graciano garnacha tras las fermentaciones alcohólica (FFA) y maloláctica (FFM) y tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

		Dimetilamina	Etilamina	Pirrolidina	Isopropilamina
Control	FFA	3 ± 1	3 ± 2	11 ± 9	15 ± 3
	FFM	2,7 ± 0,6	10 ± 4	29 ± 20	30 ± 8
	M1	1,0 ± 0,1	5 ± 1	5 ± 2	9 ± 5
	M2	0,8 ± 0,3	4,4 ± 0,2	4,3 ± 0,2	9,0 ± 0,4
Salvia	M1	1,3 ± 0,1	6,1 ± 0,3	6,2 ± 0,2	12,3 ± 0,6
	M2	6,0 ± 0,8	1,7 ± 0,2	58 ± 7	1,9 ± 0,1
Olivo	M1	1,2 ± 0,1	7 ± 1	6,7 ± 0,5	12 ± 1
	M2	0,8 ± 0,1	4,0 ± 0,5	3,8 ± 0,6	8,5 ± 0,7
		Dietilamina	Isobutilamina	Amilamina	Hexilamina
Control	FFA	16 ± 2	0,72 ± 0,01	0,7 ± 0,4	0,06 ± 0,02
	FFM	31 ± 7	1,04 ± 0,01	0,5 ± 0,2	0,14 ± 0,06
	M1	22 ± 1	0,54 ± 0,04	1,3 ± 0,2	0,16 ± 0,05
	M2	17 ± 2	0,41 ± 0,01	1,1 ± 0,9	0,16 ± 0,02
Salvia	M1	24,4 ± 0,9	0,57 ± 0,01	1,40 ± 0,05	0,02 ± 0,01
	M2	0,74 ± 0,09	0,4 ± 0,1	0,23 ± 0,02	no detectado
Olivo	M1	30 ± 5	0,56 ± 0,09	1,4 ± 0,1	0,02 ± 0,01
	M2	19 ± 2	0,37 ± 0,06	1,03 ± 0,05	0,14 ± 0,04

Tabla VI.6 Evolución de las aminas volátiles en vino de uva Cabernet Sauvignon tras las fermentaciones alcohólica (FFA) y maloláctica (FFM) y tras el primer mes (M1) y tras el segundo mes (M2) después de la adición de los conservantes (n=4).

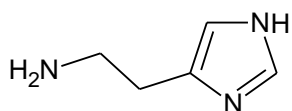
		Dimetilamina	Etilamina	Pirrolidina	Isopropilamina
Control	FFA	no detectado	3 ± 2	4,4 ± 0,7	11 ± 2
	FFM	no detectado	5,79 ± 0,09	6,20 ± 0,08	17,53 ± 0,06
	M1	no detectado	2,69 ± 0,08	2,32 ± 0,08	5 ± 3
	M2	no detectado	2,1 ± 0,2	1,82 ± 0,05	4,9 ± 0,3
Salvia	M1	no detectado	2,1 ± 0,4	1,7 ± 0,3	5,4 ± 0,4
	M2	no detectado	2,8 ± 0,6	1,81 ± 0,05	5,4 ± 0,6
Olivo	M1	no detectado	1,7 ± 0,1	1,7 ± 0,3	5,2 ± 0,6
	M2	no detectado	3,6 ± 1	3 ± 1	7 ± 2
		Dietilamina	Isobutilamina	Amilamina	Hexilamina
Control	FFA	42 ± 6	0,8 ± 0,1	0,25 ± 0,08	0,09 ± 0,03
	FFM	37,78 ± 0,09	0,823 ± 0,004	0,4 ± 0,1	0,110 ± 0,002
	M1	26 ± 2	0,57 ± 0,04	0,41 ± 0,06	0,03 ± 0,03
	M2	23 ± 1	no detectado	0,3 ± 0,1	0,02 ± 0,01
Salvia	M1	26 ± 2	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,023 ± 0,005
	M2	25 ± 0,5	0,36 ± 0,05	0,3 ± 0,1	0,03 ± 0,01
Olivo	M1	24 ± 2	0,32 ± 0,06	0,2 ± 0,1	0,020 ± 0,003
	M2	40 ± 10	0,103 ± 0,005	0,20 ± 0,02	0,05 ± 0,02

VI.2. ANEXO 2: ESTRUCTURAS DE LOS COMPUESTOS ANALIZADOS

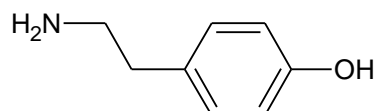
En este Anexo se detallan las estructuras químicas de los compuestos analizados en el presente trabajo. Los compuestos se encuentran ordenados en función de los grupos químicos a los que pertenecen.

VI.2.1. Estructura química de las aminas

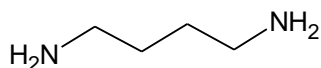
VI.2.1.1. Aminas biógenas



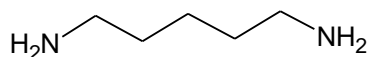
Histamina



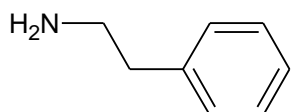
Tiramina



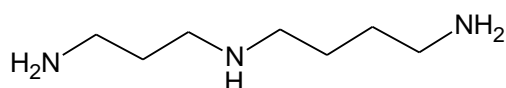
Putrescina



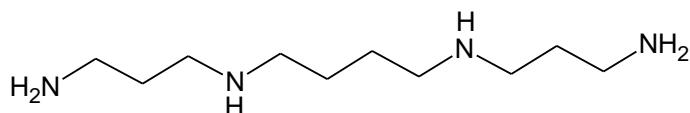
Cadaverina



Feniletilamina

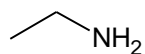


Espermidina

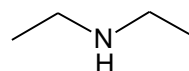


Espermina

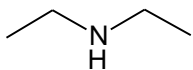
VI.2.1.2. Aminas volátiles



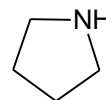
Etilamina



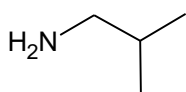
Dietilamina



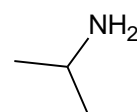
Dimetilamina



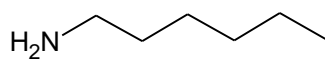
Pirrolidina



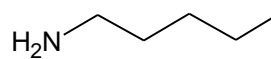
Isobutilamina



Isopropilamina



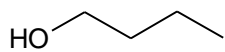
Hexilamina



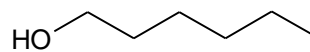
Amilamina

VI.2.2. Estructura química de los compuestos volátiles de origen fermentativo

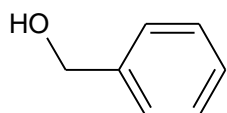
VI.2.2.1. Alcoholes superiores



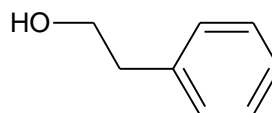
n-Butanol



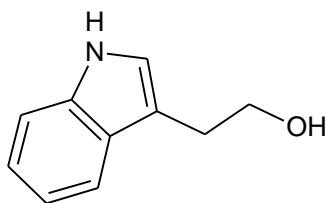
n-Hexanol



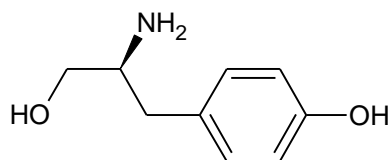
Alcohol bencílico



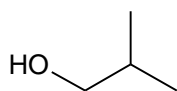
2-Feniletanol



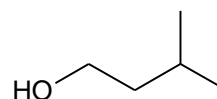
Triptofol



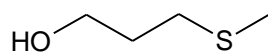
Tirosol



Isobutanol

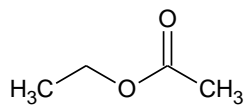


Alcohol isoamílico

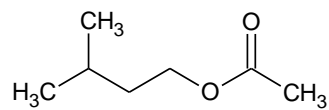


3-(metiltio)-1-propanol

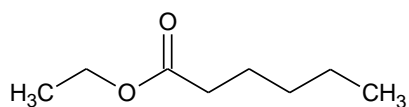
VI.2.2.2. Ésteres



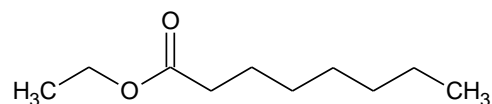
Acetato de etilo



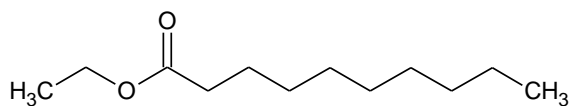
Acetato de isoamilo



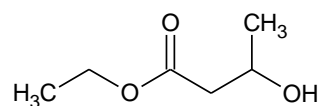
Hexanoato de etilo



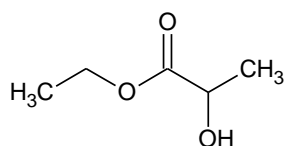
Octanoato de etilo



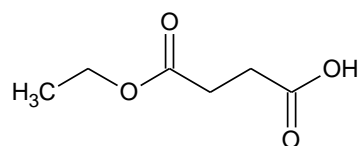
Decanoato de etilo



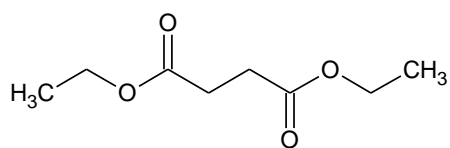
3-Hidroxibutirato de etilo



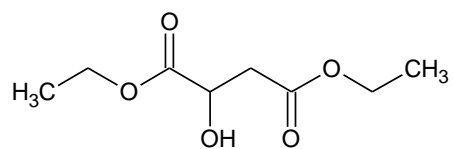
Lactato de etilo



Succinato ácido de etilo

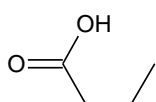


Succinato de dietilo

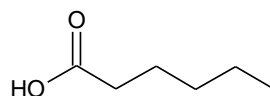


Malato de dietilo

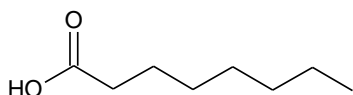
VI.2.2.3. Ácidos



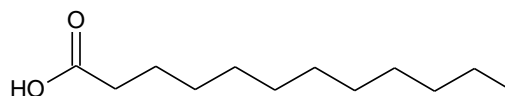
Ácido butírico (C4:0)



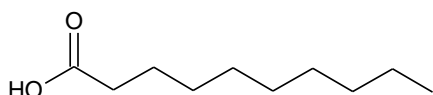
Ácido hexanoico (C6:0)



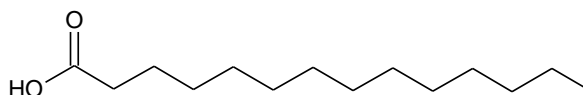
Ácido octanoico (C8:0)



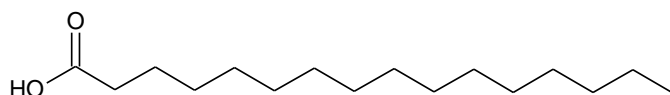
Ácido decanoico (C10:0)



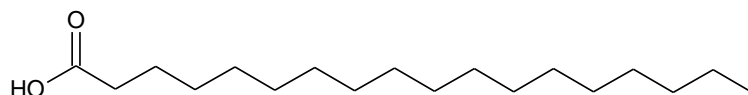
Ácido dodecanoico (C12:0)



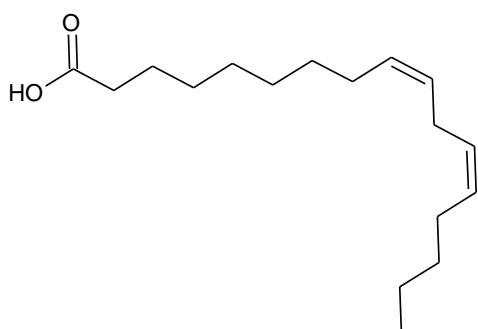
Ácido tetradecanoico (C14:0)



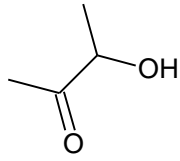
Ácido hexadecanoico (C16:0)



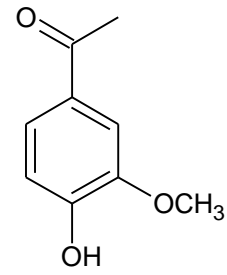
Ácido octadecanoico (C18:0)



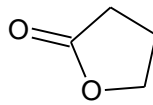
Ácido 9,12-octadecadienoico (C18:2)

VI.2.2.4. Compuestos carbonílicos y otros compuestos

3-hidroxi-2-butanona



Acetovainillona

 γ -butirolactona