



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo de Fin de Máster en Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos

Estudio de la reactividad de anhídrido sulfuroso, acetaldehído y ácido
sulfhídrico en vinos tintos de diferente composición fenólica

Study of sulfur dioxide, acetaldehyde and hydrogen sulfide reactivity on
red wines with different phenolic composition

Autor

Becker Andrés Anasi Castillo

Directora

Dra. Ana Escudero Carra

Zaragoza, 2019

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Ana Escudero Carra, por su acertada guía en la elaboración de este trabajo. A Diego Sánchez y Almudena Marrufo por su gran ayuda en el desarrollo experimental del estudio.

Muchas Gracias.

"Un sutil pensamiento erróneo puede dar lugar a una indagación fructífera que revela verdades de gran valor."

Isaac Asimov

A mi familia..

CONTENIDO

1. RESUMEN.....	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. VINO Y MISTELA.....	3
3.1.1. EL VINO COMO ALIMENTO.....	3
3.2. TIEMPO DE VIDA DEL VINO.....	3
3.2.1. APORTACIÓN DE OXÍGENO AL VINO A LO LARGO DE SU VIDA.....	4
3.2.2. ENVEJECIMIENTO DEL VINO	4
3.3. ANTIOXIDANTES DEL VINO.....	6
3.3.1. ANHÍDRIDO SULFUROSO (SO ₂) COMO AGENTE ANTIOXIDANTE.....	7
3.4. VARIABILIDAD EN EL APORTE DE OXÍGENO.....	7
3.4.1. EXCESO DE OXÍGENO.....	8
3.4.2. DÉFICIT DE OXÍGENO	8
4. OBJETIVO.....	11
5. MATERIAL Y MÉTODOS	12
5.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS	12
5.2. DISOLUCIONES MADRE.....	13
5.3. INSTRUMENTACIÓN.....	13
5.4. OBTENCIÓN DE MISTELAS Y FFAs	14
5.4.1. OBTENCIÓN DE MISTELAS	14
5.4.2. OBTENCIÓN DE FFAs.....	14
5.5. ELABORACIÓN DE VINO SINTÉTICO.....	15
5.6. CONDICIONES DE ANOXIA.....	16
5.7. EXPERIMENTO 1: REACTIVIDAD DE ANHÍDRIDO SULFUROSO	16

5.7.1. DOPADO	16
5.7.2. MÉTODO RANKINE.....	17
5.7.3. SULFUROSO ACTIVO	18
5.8. EXPERIMENTO 2: REACTIVIDAD DE ACETALDEHÍDO.....	19
5.8.1. DOPADO	19
5.8.2. DETERMINACIÓN DE ACETALDEHÍDO TOTAL	19
5.9. EXPERIMENTO 3: REACTIVIDAD DE ÁCIDO SULFHÍDRICO	20
5.9.1. DOPADO	20
5.9.2. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN LIBRE	21
5.9.3. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN BR (LIBRES + ACOMPLEJADOS).....	21
5.10. DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS.....	22
5.10.1. ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES.....	22
5.10.2. COLOR	22
5.11. DETERMINACIÓN DE POTENCIAL REDOX	23
5.12. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
6.1. CONTENIDO FENÓLICO DE MISTELAS.....	24
6.2. MUESTRAS CONTROL SIN FORTIFICAR.....	25
6.1. EXPERIMENTO 1: REACTIVIDAD DE ANHÍDRIDO SULFUROSO	28
6.2. EXPERIMENTO 2: REACTIVIDAD DE ACETALDEHÍDO.....	33
6.3. EXPERIMENTO 3: REACTIVIDAD DE ÁCIDO SULFHÍDRICO	35
6.4. EXPERIMENTO 3: REACTIVIDAD DE H ₂ S (2ª INCUBACIÓN).....	39
7. CONCLUSIONES.....	44
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47
9. ANEXO.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cámara de anoxia Jacomex GPcampus.	16
Figura 2. Sistema Rankine para la determinación de SO ₂ libre y combinado en vino.	18
Figura 3. Mecanismo de reacción: Formación de hidrazonas a partir de acetaldehído.	19
Figura 4. Medidor de pH/ORP/ISE portátil HANNA Instruments HI98191.	23
Figura 5. Parámetros espectrofotométricos de las uvas utilizadas en la elaboración de mistelas	24

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales compuestos azufrados ordenados según su umbral de percepción	10
Tabla 2. Límites de detección y cuantificación del método de análisis de azufrados libres y BR.	21
Tabla 3. Azufrados libres en muestras control antes y después de la incubación en anoxia. ...	25
Tabla 4. Azufrados BR en las muestras control antes y después de la incubación en anoxia. .	26
Tabla 5. Potencial redox, IPT e intensidad de color en las muestras control.....	27
Tabla 6. SO ₂ libre, combinado y activo en muestras dopadas con 80 mg/L de sulfuroso.....	30
Tabla 7. IPT, intensidad de color y CS ₂ en muestras dopadas con 80 mg/L de sulfuroso.....	31
Tabla 8. Acetaldehído total, IPT e Intensidad de Color en muestras dopadas con 50 mg/L de acetaldehído.....	34
Tabla 9. Azufrados libres en muestras dopadas con 70 µg/L de H ₂ S.....	36
Tabla 10. Azufrados BR en muestras dopadas con 70 µg/L de H ₂ S	37
Tabla 11. Potencial Redox, IPT e Intensidad de color en muestras dopadas con 70 µg/L de H ₂ S	38
Tabla 12. Azufrados libres en muestras de menor potencial dopadas con 70 µg/L de H ₂ S	40
Tabla 13. Azufrados BR en muestras de menor potencial dopadas con 70 µg/L de H ₂ S.....	41
Tabla 14. Potencial Redox, IPT e Intensidad de color en muestras de menor potencial dopadas con 70 µg/L de H ₂ S	42

1. RESUMEN

El presente estudio pretende evaluar la reactividad de anhídrido sulfuroso, acetaldehído y ácido sulfhídrico en 12 vinos modelo de diferente composición fenólica y describir los cambios químicos ocurridos tras su incubación a 35 °C durante 1.5 meses en anoxia. Esta incubación simula el proceso de envejecimiento del vino, y se llevó a cabo luego de medir el punto inicial de todos los parámetros experimentales. El vino almacenado en condiciones anóxicas experimenta una disminución en su potencial redox, se cree que los compuestos polifenólicos ceden electrones al vino, enriqueciendo las formas reducidas de los pares redox presentes. Este trabajo busca determinar cómo la diferente composición fenólica influye en el vino final al interactuar con las sustancias comúnmente presentes en la bebida. Se utilizaron varias técnicas para la determinación de los parámetros experimentales. La determinación de SO₂ libre y combinado se llevó a cabo por el método de Rankine, el acetaldehído total se determinó por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y los compuestos azufrados (H₂S, MeSH, CS₂ y SO₂ activo) por cromatografía de gases. El índice de polifenoles (IPT) y la intensidad de color fueron determinados mediante espectrofotometría, y el potencial redox mediante voltamperometría con un medidor portátil con electrodo de titanio y un sistema de referencia Ag/AgCl incorporado. En términos generales, hubo un consumo de sulfuroso y acetaldehído a lo largo de la incubación, mientras que el sulfhídrico aumentó en vinos con potenciales iniciales altos, y varió de manera diferente en cada muestra cuando el potencial redox de partida fue bajo. El IPT experimentó una disminución estadísticamente significativa al añadir sulfuroso y acetaldehído, pero no al fortificar con sulfhídrico. El color por otro lado disminuyó significativamente al dopar las muestras con sulfuroso y sulfhídrico. Tras la incubación, los compuestos fenólicos reaccionaron de manera diferente con sulfuroso, acetaldehído y sulfhídrico, lo cual se relaciona con el potencial redox de la matriz en la que se trabaja, que repercute además en sus propiedades organolépticas, mismas que en el vino van transformándose a lo largo del envejecimiento.

Palabras clave: anoxia, composición fenólica, envejecimiento, potencial redox.

2. ABSTRACT

The aim of this study was to assess the reactivity of sulfur dioxide, acetaldehyde and hydrogen sulfide in 12 model wines with different phenolic composition, by describing the chemical changes that were presented after 1.5 months of incubation at 35°C under anoxic conditions. This was made in order to simulate the wine ageing process that have been accomplished by working under these conditions in previous studies. The initial point measurement of all experimental parameters was carried out right before the incubation, so as to evidence the changes occurred after the incubation. Wine stored under anoxic conditions experiences a decrease on its redox potential, it is believed that polyphenols donate electrons to the wine, enriching the reduced forms of redox pairs contained. The following research seeks to determine how the different polyphenolic content influences the final quality of the wine by interacting with the substances commonly present in the beverage. Several techniques were used to determine the experimental parameters; the determination of free and combined SO₂ was carried out by the Rankine method, the total acetaldehyde was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and the sulfur compounds (H₂S, MeSH, CS₂ and active SO₂) were measured by gas chromatography. The total polyphenol index (IPT) and the color intensity were determined by spectrophotometry, and the redox potential was measured by voltammetry with a portable meter with a titanium electrode and a built-in Ag/AgCl reference system. In general terms, there was a consumption of sulfur dioxide and acetaldehyde throughout the incubation, while hydrogen sulfide consumption increased in wines with high initial potentials, and varied differently in each sample when the initial redox potential was low. The IPT experienced a statistically significant decrease by adding sulfurous and acetaldehyde, but not by fortifying with hydrogen sulfide. The color on the other hand, experienced significant decreases when samples were fortified with sulfur dioxide and hydrogen sulfide. After incubation, the phenolic compounds reacted differently with sulfur dioxide, acetaldehyde and hydrogen sulfide, which is related to the redox potential of the matrix, that affects its organoleptic properties, transformed throughout the wine ageing.

Keywords: *anoxia, phenolic composition, ageing, redox potential.*

3. INTRODUCCIÓN

3.1. VINO Y MISTELA

El vino es una bebida alcohólica obtenida del proceso de fermentación del mosto de uva, su calidad y longevidad están determinadas por el contenido fenólico y aromático de la uva de partida, compuestos a los que se atribuye la intensidad de sensaciones en boca, capacidad antioxidante, color, calidad e intensidad aromática, factores que influyen significativamente en la calidad final del vino (Flanzy, 2003).

Durante la fermentación alcohólica del mosto de uva, muchos componentes son transformados, principalmente los azúcares, que son los responsables del grado alcohólico del vino. En condiciones ambientales normales la fermentación se detiene espontáneamente, cuando la graduación alcohólica ha alcanzado los quince grados. También se puede detener el proceso fermentativo, al añadir alcohol vínico al mosto en fermentación antes de que alcance los quince grados, de esta manera se conserva el sabor a mosto y los caracteres frutales de la uva de partida, aportando el medio etéreo del alcohol para producir una bebida licorosa denominada mistela, cuya graduación alcohólica oscila entre los 13 y 23° (Cáceres y Lizárraga, 2016). Según la Real Academia Española, la mistela es el líquido resultante de la adición de alcohol vínico al mosto de uva en cantidades equilibradas para impedir que tenga lugar la fermentación (RAE, 2018).

3.1.1. EL VINO COMO ALIMENTO

El aroma y flavor de un vino son factores determinantes de su calidad y son el resultado de una serie de equilibrios entre las sustancias aromáticas y elementos sápidos que rigen el agrado gustativo (Peynaud, 1996). El agrado gustativo que genera el vino al beberlo se complementa con los efectos beneficiosos que ejerce sobre la salud. En este contexto se pueden resaltar los compuestos fenólicos, que además de ser los responsables del color del vino, tienen propiedades antioxidantes, además son capaces de coagular proteínas, clarificar los vinos y actúan como bactericidas (Díaz-García *et al.*, 2013).

3.2. TIEMPO DE VIDA DEL VINO

Durante el envejecimiento, el vino atraviesa una serie de transformaciones profundas. Los vinos tintos experimentan principalmente cambios en su color, bouquet y

sabor. Desaparece el aroma de vino joven y se afinan características sensoriales como la astringencia, cuerpo y notas varietales. El tiempo durante el cual el vino experimenta estas transformaciones, caracterizan su vejez y por ende su calidad, este tiempo fluctúa en función a la variedad de uva, origen y condiciones de cosecha. El contenido de compuestos fenólicos, ha sido relacionado con la longevidad de los vinos tintos, sin embargo, fenómenos como la oxidación, transformación de compuestos colorantes y sustancias aromáticas son factores que también intervienen en su tiempo de vida (Peynaud, 1996).

3.2.1. APORTACIÓN DE OXÍGENO AL VINO A LO LARGO DE SU VIDA

El oxígeno es un elemento que puede afectar positiva o negativamente al vino a través de complejas interacciones. El equilibrio entre sus efectos positivos y negativos depende de la concentración de oxígeno disuelto, momento de la disolución y características del vino. Los principales efectos del oxígeno en el vino suelen ser modificaciones de las fracciones fenólica y aromática del vino, aunque también puede contribuir al crecimiento y multiplicación de microorganismos (Vilanova *et al.*, 2011).

Cuando los compuestos fenólicos son oxidados se evidencian fenómenos mayoritariamente relacionados con el color del vino, como el pardeamiento. Pero también efectos positivos en el envejecimiento del vino, pues se reduce la astringencia y se estabiliza la fracción fenólica (Bridle y Timberlake, 2006).

Cuando la fracción aromática se oxida, el vino tiende a perder sus aromas varietales, y evidentemente se desarrollan notas oxidativas. En las primeras etapas de vinificación los compuestos aromáticos volátiles se encuentran relativamente protegidos del oxígeno, pues están presentes en forma de precursores, es decir, unidos a otras moléculas, siendo así menos sensibles a la oxidación que en su forma libre (Zironi *et al.*, 2009).

3.2.2. ENVEJECIMIENTO DEL VINO

El efecto del oxígeno en el vino se ve influenciado también por la presencia de metales pesados como el cobre y el hierro, y en menor medida el Mn, que actúan como potentes catalizadores de reacciones oxidativas. Además, algunos productos de la oxidación de compuestos fenólicos, como radicales libres y peróxidos, pueden intervenir como compuestos oxidantes (Danilewicz, 2016).

Durante el envejecimiento, el consumo de oxígeno es menor que en la fermentación y más controlado, siendo el tiempo un factor crítico para que la transformación de sus características organolépticas dé como resultado un vino de mayor calidad que el vino joven de partida. Existen dos etapas del envejecimiento: la fase oxidativa que se produce en bodega y la fase reductora que se produce en botella (García, 2015).

El envejecimiento en bodega (generalmente de roble) es un proceso mediante el cual el vino joven es microoxigenado con el fin de mejorar sus cualidades olfativas y gustativas. Estos micro volúmenes de oxígeno que atraviesan la madera por sus poros se disuelven en el vino y se combinan con sus componentes, produciendo una oxidación lenta, que permite la evolución y estabilización del color del vino de un rojo - violáceo característico de vinos tintos jóvenes a un rojo – teja. Además, las características cromáticas del vino no son las únicas que cambian, pues se consigue también mejorar el cuerpo y la astringencia del vino, así como su aroma, al incrementar las notas afrutadas y disminuir las vegetales (Gómez, 2016).

Por otro lado, durante el envejecimiento en botella el vino se encuentra en un ambiente anóxico, es decir, en ausencia de oxígeno. Para conseguir esto, las botellas se colocan en posición horizontal, de tal manera que el vino entre en contacto con el corcho, manteniéndolo húmedo, hinchado y consecuentemente hermético. De esta manera se consigue que los sabores y aromas adquiridos en la fase oxidativa se afinen, desarrollando el bouquet del vino, el cual solo se manifiesta con potenciales redox bajos (Peynaud, 1996).

El vino es una matriz compleja donde coexisten numerosas especies oxidorreductoras. Su potencial redox se ve directamente influenciado por el pH y el oxígeno disuelto en él. Durante la fermentación este potencial se modifica, afectando principalmente la composición polifenólica, que se evidencia con una importante caída del color, asociada a las formas antocianicas que se encuentran libres. Estas especies lábiles inducen reacciones de polimerización, puesto que su carácter lábil aumenta (Gómez, 2015). La función del oxígeno en estos casos es reducir la cantidad de antocianos libres e incrementar la condensación entre antocianos y taninos, sin embargo, se debe tener en cuenta que un exceso de oxígeno puede inducir el crecimiento bacteriano y aumentar la oxidación de compuestos fenólicos (Del Álamo *et al.*, 2013).

Durante el envejecimiento del vino, otros compuestos altamente lábiles pueden verse afectados, mayoritariamente moléculas de naturaleza aromática. Los más destacables son mercaptanos polifuncionales, cuya estructura presenta al menos un grupo –SH (tiol). En el vino se encuentran principalmente el 4-mercapto-4-metil-2-pentanona (4MMP), acetato de 3-mercapto-hexilo (3MHA) y el 3-mercaptohexanol (3MH), responsables de las notas tiólicas (Floch *et al.*, 2016). También se encuentran otros tioles como el bencilmercaptano (BM) que aporta notas aromáticas a pelo quemado o el furfuriltiol (FFT) con aroma a café tostado que no tienen sus precursores en las uvas. La alta reactividad de estos compuestos hace que se vean muy influenciados por envejecimiento del vino (Culleré *et al.*, 2019)

3.3. ANTIOXIDANTES DEL VINO

Una sustancia antioxidante es aquella que en bajas concentraciones en relación a un sustrato oxidable retrasa significativamente o previene la oxidación de dicho sustrato (Halliwell, 1995). En el vino la acción antioxidante es atribuida mayoritariamente a los compuestos fenólicos, además, estos son los responsables del color del vino y contribuyen también a su astringencia (Lutz *et al.*, 2012).

Los compuestos fenólicos se encuentran en los tejidos de la fruta y se clasifican según su estructura en dos grupos: flavonoides y no flavonoides (Cotea *et al.*, 2012). Los flavonoides son los más estudiados y están presentes en el hollejo, tallo y semillas de la uva y según su estructura molecular se dividen en antocianos, taninos, flavonoles, flavononas y flavonas, compuestos que proporcionan pigmentos rojos, anaranjados, rosas, púrpuras y azules respectivamente (Gürbüz *et al.*, 2007).

Los polifenoles no flavonoides abarcan a los ácidos fenólicos y estilbenos. Los primeros se caracterizan por tener un grupo carboxilo en su estructura, y a pesar de ser incoloros, pueden tornarse de color amarillo por procesos oxidativos (Stalikas, 2007). Los estilbenos en cambio son sustancias no flavonoides que actúan en respuesta a ataques patógenos y reaccionan ante factores abióticos como la luz ultravioleta (Belajova, 2012).

Debido a la amplia gama de colores de estos compuestos, son capaces de absorber luz a diferentes longitudes de onda, razón por la cual se emplea la espectroscopía ultravioleta visible para su determinación en vino (Boggia *et al.*, 2013; Mulero *et al.*, 2013).

3.3.1. ANHÍDRIDO SULFUROSO (SO₂) COMO AGENTE ANTIOXIDANTE

El SO₂ es un agente antioxidante adicionado al vino que no reacciona directamente con el oxígeno. Su función principal es reducir los polifenoles oxidados reconstituyendo sus formas iniciales, esto con el fin de evitar reacciones de polimerización, además impide la producción de acetaldehído, compuesto relacionado con el olor “a oxidado” del vino (Gómez, 2016). Es el compuesto químico más importante utilizado para prevenir la oxidación del vino, además, no solamente actúa como antioxidante, pues tiene también propiedades antibacterianas y antioxidásicas (Carrascón *et al.*, 2018). En el vino el SO₂ está presente en estado libre y combinado con algunos constituyentes orgánicos, de tal manera que el anhídrido sulfuroso total corresponde a la suma de sus fracciones libre y combinada.

La fracción libre se encuentra en estado salificado, en forma de sales ácidas o bisulfitos. Parte del SO₂ libre corresponde al sulfuroso disuelto en estado gaseoso, esta porción se conoce como sulfuroso activo, y ejerce una función antiséptica en el vino.

En el vino, el SO₂ se combina con sustancias pertenecientes al grupo de los aldehídos y las cetonas, generando compuestos de diferente estabilidad. Cuando se une al acetaldehído producido por las levaduras fermentativas se produce una combinación muy estable e irreversible denominada ácido aldehído-sulfuroso o etanolsulfónico. Existen también reacciones de equilibrio cuando el SO₂ se combina con compuestos como la glucosa, el ácido galacturónico, polisacáridos y polifenoles. Este equilibrio depende mucho de la temperatura, es así que, si el vino es enfriado los índices de anhídrido sulfuroso combinado aumentan, y disminuyen cuando el vino se calienta. Por lo tanto estas combinaciones poco estables constituyen una reserva que alimenta la fracción de SO₂ libre a medida que esta desciende progresivamente por oxidación (Peynaud, 1996).

3.4. VARIABILIDAD EN EL APORTE DE OXÍGENO

El oxígeno juega un papel muy importante en la elaboración de vino, pues sus efectos pueden ser beneficiosos para la calidad de la bebida, o pueden causar daños irreversibles. Como se sabe, el oxígeno puede ser introducido en las diferentes etapas de la vinificación, desde el macerado de la uva hasta el envejecimiento del vino, por lo cual es sumamente importante que las interacciones oxígeno-vino sean monitorizadas permanentemente hasta el punto final de su envejecimiento en botella (Arapitsas *et al.*, 2016).

3.4.1. EXCESO DE OXÍGENO

Una exposición excesiva del vino al oxígeno induce el desarrollo de colores amarillos y marrones, además de un deterioro aromático. Esto se debe principalmente a la formación de aldehídos que aportan notas “a oxidación” al vino.

El mecanismo de las reacciones que tienen lugar en el vino, cuando éste es expuesto al oxígeno ha sido ampliamente estudiado, se conoce que el oxígeno disuelto en el vino es activado por iones metálicos en su estado de oxidación más bajo (Fe^{2+} y Cu^+), formando el radical hidroperoxi ($\text{HO}_2\bullet$) y Fe^{3+} , estos iones oxidados reaccionan con el grupo catecol de los polifenoles del vino, generando nuevamente Fe^{2+} . Subsecuentemente el radical ($\text{HO}_2\bullet$) reacciona con los polifenoles para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2), mismo que puede inducir a la reacción de Fenton al reaccionar con Fe^{2+} , formando el radical hidroxil ($\text{HO}\bullet$), que es capaz de oxidar prácticamente cualquier compuesto orgánico (Bueno *et al.*, 2018).

El principal producto de oxidación de Fenton es el acetaldehído, sin embargo, los denominados aldehídos de Strecker (isobutiraldehído, 2-metilbutanal, isovaleraldehído, metional y fenilacetaldehído) juegan también un rol muy importante en la calidad organoléptica del vino (San Juan *et al.*, 2012).

Los aldehídos de Strecker son formados por una peroxidación de sus alcoholes precursores, aunque también pueden formarse por degradación de sus aminoácidos precursores, donde el aminoácido reacciona con un α -dicarbonilo como el diacetilo, o una o-quinona que son particularmente abundantes durante la oxidación (Monforte *et al.*, 2017).

Las reacciones más relevantes de los aldehídos en vino son la formación de aductos reversibles con el sulfuroso y uniones irreversibles con compuestos fenólicos, pues el anillo A de los flavonoides es un floriglucinol con diferentes posiciones nucleofílicas que pueden reaccionar con carbonilos, especialmente con aquellos que tienen una forma -enol estable como el acetaldehído, formando una amplia variedad de productos como las piroantocianinas, formadas por antocianos con un anillo pirano (Marquéz *et al.*, 2013).

3.4.2. DÉFICIT DE OXÍGENO

La principal consecuencia del déficit de oxígeno en el vino es la reducción, generándose compuestos azufrados muy volátiles, lo cual aporta notas aromáticas desagradables (huevos podridos, col cocida, algas en descomposición) al vino. Estos

problemas de reducción representan una gran preocupación en la industria del vino, puesto que se pueden dar después del embotellamiento, es decir, cuando ninguna acción correctiva puede ser aplicada. Los malos olores son principalmente causados por compuestos tiólicos (-SH), gas sulfhídrico (H_2S), metanotiol (MeSH) y eventualmente por otros mercaptanos y compuestos volátiles azufrados (VSC), que normalmente son subproductos de la fermentación alcohólica, y que usualmente son purgados de manera natural por la corriente de CO_2 generada también durante la fermentación, dejando en la mayoría de los casos, concentraciones remanentes a niveles muy por debajo del umbral de percepción de estos compuestos (Ferreira *et al.*, 2018)

Sin embargo, existen diversas situaciones que pueden provocar la presencia de estos compuestos a niveles por encima del umbral. Estos casos se pueden relacionar con mostos con deficiencia de nitrógeno o vitamina B, cepas específicas de levadura o mostos con concentraciones proteica o de glutatión muy elevadas (Jinarek *et al.*, 2009).

Otra de las situaciones que el vino puede experimentar a bajas concentraciones de oxígeno, es la oxidación catalizada por el Fe^{3+} de los polifenoles del vino que contienen grupos catecol o pirogalol, los cuales forman radicales semi-quinona, que se oxidan aún más formando o-quinonas. Estas pueden reaccionar fácilmente con moléculas nucleófilas como bisulfitos o tioles a través de la adición de Michael reduciendo las quinonas a catecoles irreversiblemente, lo cual podría tener efectos perjudiciales al causar la pérdida oxidativa de compuestos aromáticos importantes, como el 3-mercaptohexanol (3MH), o un efecto beneficioso al reaccionar con sulfuro de hidrógeno (H_2S) (Krietman *et al.*, 2016).

El reducido contacto con el oxígeno que las técnicas actuales de vinificación emplean, ha incrementado la frecuencia de problemas de reducción en el vino, y por ende la aparición de compuestos azufrados. Con el fin de disminuir sus niveles en el vino, se utilizan técnicas como el *copper fining*, que consiste en la adición de sales de cobre, de tal manera que los iones Cu^{2+} reaccionen con los compuestos azufrados para formar un precipitado coloidal de sulfuro de cobre (CuS) (insoluble) que teóricamente es eliminado por filtración. La realidad es, que con las concentraciones de compuestos azufrados volátiles (VSC) en el vino no se produce ningún precipitado. También se emplean técnicas de aireación y adición de lías. Generalmente al aplicar estas acciones correctivas el efecto es inmediato, disminuyendo la intensidad de los problemas sensoriales (Krietman *et al.*,

2016). Sin embargo, cuando el potencial del vino vuelve a disminuir, las formas libres de los VSC vuelven a aparecer, manifestándose de nuevo el mal olor, ya que los complejos con el cobre permanecen en el vino y se van liberando poco a poco (Ferreira *et al.*, 2018).

Se conoce que bajo condiciones de anoxia el potencial redox del vino disminuye, provocando con ello que algunas especies presentes en él donen electrones al medio, enriqueciéndolo en las formas reducidas de los pares redox activos presentes. La fuente de estos electrones podría atribuirse a la acción antioxidante de los polifenoles en el vino que pueden experimentar reacciones de condensación espontánea. Por lo tanto, se considera que en ausencia de oxígeno, el vino tiende a un estado de equilibrio que depende de su contenido polifenólico (Ferreira *et al.*, 2018).

Los compuestos azufrados constituyen una de las fracciones aromáticas del vino más evidentes, presentan un umbral de percepción bajo como se puede ver en la Tabla 1, que disminuye según aumenta su peso molecular. Desde el punto de vista enológico se dividen en dos grupos concretos: los de contribución sensorial positiva, que intervienen en la identidad varietal del vino; y los de contribución sensorial negativa que presentan caracteres sensoriales reductivos, y además ocultan las características frutales y varietales (López, 2011).

Tabla 1. Principales compuestos azufrados ordenados según su umbral de percepción

	Origen	Concentración media en vino	Umbral de percepción	Olor	
↑ Ligeros	Disulfuro de carbono (CS₂)	F	2 - 2.5 µg/L	30 µg/L	-
	Dimetilsulfuro (DMS)	V	0 - 500 µg/L	25 µg/L	Trufa, oliva, espárrago, frambuesa, escabeche
	Sulfuro de hidrógeno (H₂S)	F	0.3 - 17 µg/L	1 µg/L	Huevo podrido
↓ Pesados	Metanotiol (MeSH)	F	0 - 5 µg/L	0.3 µg/L	Huevo podrido / Col cocida
	3-mercaptohexanol (3MH)	V	0.01 - 5 µg/L	0.06 µg/L	Pomelo
	Furfuriltiol	F/B	0 - 0.05 µg/L	0.4 ng/L	Madera ahumada

F: Fermentativo. V: Varietal. B: Barrica

(López, 2011).

4. OBJETIVO

El objetivo general de la presente investigación será estudiar los procesos químicos asociados a la maduración del vino en anoxia, en función de la composición fenólica proveniente de las uvas.

Para dicho fin, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar la reactividad del anhídrido sulfuroso en vinos modelo elaborados a partir de fracciones fenólicas y aromáticas (FFAs) con diferente composición fenólica.
2. Evaluar la reactividad del acetaldehído en vinos modelo elaborados a partir de FFAs con diferente composición fenólica.
3. Evaluar la reactividad del ácido sulfhídrico en vinos modelo elaborados a partir de FFAs con diferente composición fenólica.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. DISOLVENTES Y REACTIVOS

Cloruro de Hierro (II) Tetrahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) Sigma-Aldrich.

Cloruro de Cobre (II) anhidro (CuCl_2) Sigma-Aldrich.

Cloruro de Cobre (I) anhidro (CuCl) Sigma-Aldrich.

Cloruro de Manganeso (II) anhidro (MnCl_2) Sigma-Aldrich.

L-Glutatión reducido $\geq 98.0\%$ (GSH) Sigma-Aldrich.

L-Cisteína 97 % (Cys) Sigma Aldrich.

Ácido Tartárico anhidro $(\text{CHOH})_2(\text{COOH})_2$ Panreac AppliChem.

Metabisulfito de potasio anhidro ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$) Panreac AppliChem.

Indicador mixto (azul de metileno-rojo de metilo 1:2 en etanol al 50%) VINIKIT, Panreac AppliChem.

Hidróxido de sodio 0.01 M VINIKIT, Panreac AppliChem.

Etil metil sulfuro (EMS) estándar analítico Sigma-Aldrich.

Acetaldehído $\geq 99.5\%$ (CH_3CHO) Sigma-Aldrich.

2,4-Dinitrofenilhidrazina (2,4-DNPH) estándar analítico Sigma-Aldrich.

Cloruro de sodio 99.5 % anhidro (NaCl) Panreac AppliChem.

Ácido L (+) ascórbico 99.0 % ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) Panreac AppliChem.

Sulfuro de sodio (Na_2S) Sigma-Aldrich.

Glicerina pura (99.0-101.0 %), grado farma ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$) Panreac AppliChem.

Etanol absoluto grado HPLC ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) Scharlau.

Ácido ortofosfórico 85 % (H_3PO_4) Panreac AppliChem.

Peróxido de hidrógeno 33 % p/v (H_2O_2) Panreac AppliChem.

Ácido sulfúrico 96% grado técnico (H_2SO_4) Panreac AppliChem.

Ácido fórmico 98-100 % (HCOOH) Merck.

Acetonitrilo grado HPLC (CH_3CN) Merck.

Ácido clorhídrico 37 % (HCl) Panreac AppliChem.

5.2. DISOLUCIONES MADRE

Solución madre de 1000 ppm de Fe (II) a partir de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 35.58 mg en agua miliQ (10 mL).

Solución madre de 100 ppm de Cu (II) a partir de CuCl_2 : 21.16 mg en agua miliQ (100 mL).

Solución madre de 200 ppm de Cu (I) a partir de CuCl : 30.93 mg en HCl al 7% (100 mL).

Solución madre de 100 ppm de Mn (II) a partir de MnCl_2 : 22.90 mg en agua miliQ (100 mL).

Solución madre de 5000 ppm de GSH y Cys: 50 mg en agua miliQ (10 mL).

Solución madre de 5000 ppm de SO_2 a partir de $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$: 868 mg en agua miliQ (100 mL).

Solución madre de 5000 ppm de CH_3CHO en etanol absoluto grado HPLC

Solución madre de 4ppm de EMS en etanol absoluto grado HPLC

Solución madre de 100 ppm de H_2S a partir de Na_2S : 22.95 mg en medio básico (Sol. NaOH concentrada) (100 mL).

5.3. INSTRUMENTACIÓN

Rotavapor Buchi R 2-15

Centrífuga Allegra X-22R Beckman Coulter TM

Cámara de anoxia Jacomex Gpcampus.

pHmetro Crison micro pH 2002

Sistema Rankine para la determinación de SO_2 libre y combinado

Cromatógrafo de gases Agilent 7890B con detector SCD Agilent 8355

Cromatógrafo líquido de alta eficiencia (HPLC) Agilent 1220 Infinity con detector UV-Vis

Ultrasonido ULTRASONNS P Selecta 55644

Vortex Heidolph REAX top

Medidor de pH/ORP/ISE portátil e impermeable HANNA Instruments HI98191

Espectrofotómetro Shimadzu modelo UV-1700.

5.4. OBTENCIÓN DE MISTELAS Y FFAs

5.4.1. OBTENCIÓN DE MISTELAS

Para elaborar las mistelas, las uvas fueron seleccionadas de distintas parcelas en función de las características de suelo y zona, partiendo de 4250 gramos de pasta de uva despalillada y estrujada manualmente con presión leve en garrafas de 5 litros. A dicha pasta se añadieron 5 gramos de metabisulfito potásico por cada 100 kilogramos de uva, con el fin de prevenir procesos oxidativos y fermentativos. Posteriormente se añadieron 750 gramos de etanol grado HPLC para alcanzar un grado alcohólico del 15 % (p/p). Todas las mistelas se dejaron macerando una semana con hollejos con el fin de extraer los compuestos de la piel de la uva. Posteriormente se separó la mistela de los sólidos y el líquido obtenido desfangó de forma natural durante 15 días. Por último se hizo un trasiego y embotellado de las mistelas (Concejero, 2015).

5.4.2. OBTENCIÓN DE FFAs

Como se mencionó anteriormente, la calidad y longevidad del vino están estrechamente relacionadas con el contenido fenólico y aromático de la uva de partida y, debido a la dificultad que existe en encontrar estándares de compuestos fenólicos de vino actualmente en el mercado, el Laboratorio de Análisis de Aroma y Enología (LAAE) ha desarrollado un sistema mediante el cual se puede obtener la Fracción Fenólica y Aromática (FFA) de las uvas de vinificación a partir de sus correspondientes mistelas, para lo cual dichas mistelas pasan por un proceso de desalcoholización y posterior extracción.

Durante la desalcoholización se extrae el 45% del volumen de la mistela, para lo cual se toman 750 mL y se centrifuga durante 20 minutos a 4500 rpm a 10 °C, luego se trasvasa la mistela centrifugada a un matraz esférico de 1L, y este se fija al rotavapor con una nuez, el agua del baño a 23 °C debe llegar hasta la mistela y la velocidad de giro debe estar entre 100 y 120 rpm. El grado alcohólico de las mistelas se reduce de 15 a 2-3 % v/v.

La extracción en fase sólida de la FFA contenida en una mistela desalcoholizada, se inicia con el acondicionamiento de los cartuchos de extracción que contienen 10 g de resina C18, para lo cual se emplean 44 mL de metanol. Seguidamente se procede a percolar la mistela desalcoholizada, para continuar con un lavado con 88 mL de agua a pH 3.5.

Después de esto, la resina debe secarse a máximo vacío y finalmente se eluye con etanol hasta recoger 100 mL de eluato (sin vacío). Estos 100 mL corresponden a la fracción fenólica y aromática (FFA), la cual será utilizada para elaborar los vinos sintéticos para el presente estudio.

5.5. ELABORACIÓN DE VINO SINTÉTICO

La composición de los 12 vinos utilizados para el presente trabajo fue 13,3 % v/v de FFA, 5 g/L de ácido tartárico, 5 g/L de glicerina, 5 mg/L de Fe II, 0.2 mg/L de Cu II y 0.2 mg/L de Mn II, para lo cual se prepararon disoluciones madre de diferentes concentraciones de los metales a partir de cloruro ferroso tetra hidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), cloruro cuproso anhidro (CuCl_2) y cloruro manganoso anhidro (MnCl_2). A partir de dichas disoluciones madre se calcularon las cantidades a añadir de cada una al vino sintético hasta obtener las concentraciones mencionadas. Todos los vinos fueron ajustados a un pH de 3.5 después de tener la composición deseada.

Las mistelas utilizadas para la elaboración de los vinos en mención fueron las siguientes:

PRE-BRB-TL: Prevendimia, Bodegas Ramón Bilbao, variedad Tempranillo

PRE-BVV-GF: Prevendimia, Bodegas Viñas del Vero, variedad Garnacha

PRE-BRB-GM: Prevendimia, Bodegas Ramón Bilbao, variedad Garnacha

POS-BRB-TD: Posvendimia, Bodegas Ramón Bilbao, variedad Tempranillo

VEN-BI-G-F: Vendimia, Bodegas Ilurce, variedad Garnacha

POS-BRB-TL: Posvendimia, Bodegas Ramón Bilbao, variedad Tempranillo

POS-BRB-GB: Posvendimia, Bodegas Ramón Bilbao, variedad Tempranillo

VEN-BVV-GF: Vendimia, Bodegas Viñas del Vero, variedad Garnacha

VEN-BI-TG: Vendimia, Bodegas Ilurce, variedad Tempranillo

VEN-BVS-R1: Vendimia, Bodegas Vega Sicilia, variedad Tempranillo

PRE-BVV-GC: Prevendimia, Bodegas Viñas del Vero, variedad Garnacha

POS-BRB-TA: Posvendimia, Bodegas Ramón Bilbao, variedad Tempranillo

5.6. CONDICIONES DE ANOXIA

Durante el presente estudio los vinos sintéticos preparados fueron almacenados en ausencia de oxígeno durante 24 horas, antes de ser dopados con el compuesto objeto de estudio. Al introducir las muestras en la cámara, estas fueron agitadas en la atmósfera interior de argón, disminuyendo al máximo el contenido de oxígeno en el vino.

Para desarrollar el estudio en una atmósfera libre de oxígeno se hizo el dopado y el trasvase a viales estancos dentro una cámara anóxica marca Jacomex (ver Figura 1) con atmósfera de argón, cuyo nivel promedio de oxígeno es inferior a 2ppm (v/v).



Figura 1. Cámara de anoxia Jacomex GPcampus.

5.7. EXPERIMENTO 1: REACTIVIDAD DE ANHÍDRIDO SULFUROSO

El método oficial para la determinación de SO₂ libre y combinado es el método de Rankine que consiste en desplazar el sulfuroso en medio ácido a la forma SO₂ (gas) por arrastre de aire hasta un matraz con agua oxigenada, donde por oxidación se genera ácido sulfúrico el cual es valorado con hidróxido de sodio. El volumen de base gastado permite conocer la concentración de sulfuroso mediante un cálculo matemático simple (OIV, 2018).

Por otra parte, el SO₂ activo se determinará por cromatografía de gases con un detector específico para azufre (SCD) y se empleará una técnica de criofocalización con la cual se esperan bandas más estrechas y picos más resueltos (Ferreira *et al.*, 2018).

5.7.1. DOPADO

Para el estudio se fortificaron las 12 muestras de vino sintético con 80ppm de SO₂, para lo cual se preparó una solución madre de 5000ppm de SO₂ a partir de metabisulfito de potasio (K₂S₂O₅) siguiendo la siguiente reacción (ecuación 1):



A partir de la solución madre se calcularon los volúmenes a añadir a cada vino sintético en función al volumen total requerido de muestra.

5.7.2. MÉTODO RANKINE

Para la determinación de sulfuroso libre, se colocan 10 mL de vino en el matraz redondo con 5 mL de H_3PO_4 al 25%, dicho matraz se incorpora al montaje (Figura 2) y se asegura con la pinza. Posteriormente se ponen 3 mL de H_2O_2 al 3% y dos gotas de indicador (mezcla azul de metileno-rojo de metilo 1:2 en etanol al 50%) en el matraz corazón, adicionalmente se añaden unas gotas de NaOH 0.01 M de la bureta hasta que el indicador vire de morado a verde (punto 0, pH básico) y se incorpora el matraz al montaje, asegurado con las respectivas pinzas. Luego se abren los grifos del refrigerante y del vacío y se esperan 15 minutos, tiempo en el cual el SO_2 libre llega al matraz corazón y se oxida a ácido sulfúrico, lo cual se evidencia al observar el viraje de verde a morado (pH ácido). Una vez transcurridos los 15 minutos, se apaga el refrigerante y vacío y se procede a valorar el ácido contenido en el matraz corazón con NaOH 0.01 M hasta que se observe nuevamente el viraje de morado a verde. Finalmente se registra el volumen de base gastado, el cual se multiplica por 32 para obtener la concentración de SO_2 libre en mg/L, atendiendo a la estequiometría 1:2 de la reacción de neutralización y a la masa molar de SO_2 .

Para determinar el sulfuroso combinado se utilizan los mismos 10 mL de vino con 5 mL de H_3PO_4 al 25% que quedaron en el matraz redondo, y al matraz corazón se añaden nuevamente el H_2O_2 al 3%, indicador e NaOH 0.01 M en las mismas proporciones, el matraz se incorpora y asegura al sistema como se realizó previamente. Posteriormente se abren las llaves del refrigerante y vacío, y esta vez se coloca una manta calefactora en la base del matraz redondo y se espera de 15 minutos para que todo el SO_2 combinado pase a libre y llegue al matraz corazón para ser oxidado a ácido sulfúrico. Transcurrido este tiempo se apaga el refrigerante, vacío y manta calefactora y se procede a valorar con NaOH 0.01M.

Finalmente se registra el volumen gastado de base y se multiplica dicho volumen por el mismo factor utilizado para obtener la concentración de SO_2 libre. El valor de sulfuroso total será la suma de sus fracciones libre y combinada (Rankine y Pocock, 1970).

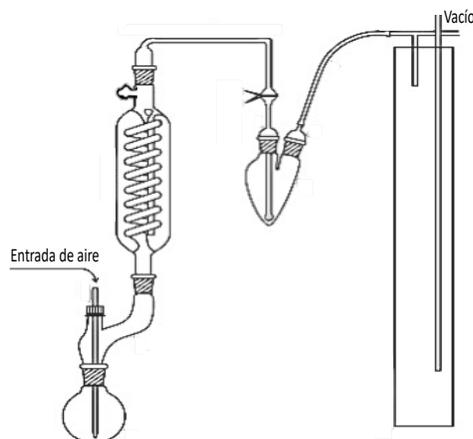


Figura 2. Sistema Rankine para la determinación de SO₂ libre y combinado en vino.

5.7.3. SULFUROSO ACTIVO

El sulfuroso activo corresponde al SO₂ gaseoso disuelto y forma parte de la fracción libre. Su determinación en el presente trabajo se llevará a cabo mediante cromatografía de gases (GC) con detector de quimioluminiscencia de azufre (SCD), para lo cual se utilizará un cromatógrafo de gases Agilent 7890B con autosampler Gerstel MPS, detector SCD Agilent 8355 y una columna SPB-1 Sulfur (30 m × 0.32 mm × 4.00 μm). La preparación de muestra consiste en tomar 12 mL de vino y añadir 40 μL del estándar interno (SI) que es una solución de 4ppm de etil metil sulfuro (EMS) en etanol (EtOH). Posteriormente se sella herméticamente el vial dentro de la cámara de anoxia.

El programa cromatográfico está configurado de tal manera que exista una incubación a 30°C durante 15 minutos y posteriormente se inyecta en Split 1:2, 1 mL de espacio de cabeza de vial. Durante la inyección y los 0.8 primeros minutos de la cromatografía se aplica criofocalización a -150 °C con nitrógeno líquido para favorecer el estrechamiento de las bandas y mejorar la resolución de los picos. Posteriormente se aplica el siguiente gradiente de temperatura: 35 °C durante 3.8 minutos; 10 °C/min hasta alcanzar 160 °C y 0.5 minutos a esta temperatura. En base al área del SI se calcularon las áreas relativas de SO₂ de cada muestra, estas áreas fueron sustituidas en la ecuación obtenida de la recta de calibrado, construida a partir de vino sintético con diferentes concentraciones de SO₂, obtenido al disolver metabisulfito de sodio en agua (Franco-Luesma y Ferreira *et al.*, 2016).

5.8. EXPERIMENTO 2: REACTIVIDAD DE ACETALDEHÍDO

La determinación de acetaldehído en el presente trabajo se llevará a cabo mediante HPLC con detector UV, para lo cual las muestras requieren una derivatización con el fin de obtener hidrazonas al hacer reaccionar aldehídos con hidrazina. El derivatizante utilizado es Dinitrofenilhidrazina (DNPH) en medio ácido.

Como se observa en la Figura 3, el acetaldehído se protona formando su ácido conjugado, el cual a su vez favorece el ataque de la hidrazina por el carácter polar del carbono carbonilo, permitiendo formar el intermedio que intercambia un protón entre el nitrógeno y el oxígeno, transformando así el hidroxilo en agua (buen grupo saliente) y formando el siguiente intermedio, que pierde una molécula de agua generando una molécula que al desprotonarse da como producto la hidrazona final (Fernández, 2014).

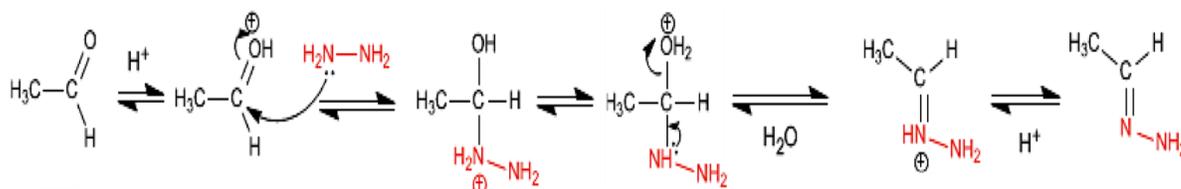


Figura 3. Mecanismo de reacción: Formación de hidrazonas a partir de acetaldehído.

5.8.1. DOPADO

Para el estudio se fortificaron las 12 muestras de vino sintético con 50ppm de acetaldehído, para lo cual se preparó una solución madre de 5000ppm, a partir de la cual se calcularon los volúmenes a añadir a cada vino sintético en función al volumen total requerido de muestra.

5.8.2. DETERMINACIÓN DE ACETALDEHÍDO TOTAL

Para la determinación de acetaldehído en vino es importante preparar todas las disoluciones el día del análisis, estas disoluciones son: SO₂ de 1120 ppm, ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 25% y DNPH de 8g/L. Para preparar el derivatizante se deben pesar 160 mg de DNPH, añadir 1 mL de H₂SO₄ concentrado al 96% y sonicar hasta disolución completa, posteriormente pasar ese mililitro a una mezcla de 15.6 mL de EtOH y 4.4 mL de agua miliQ y finalmente filtrar en un vial y tapar con papel plata. Las fases móviles a utilizar en este método son dos, la fase A corresponde a ácido fórmico al 0.5 % en agua miliQ y la

fase B es acetonitrilo (ACN) puro. El flujo de fase móvil es de 0.75 mL/min, con un volumen de inyección de 5 μ L. La columna a utilizar de marca Green Core Shell (150 \times 3 mm \times 2.6 μ m) estará acoplada a una precolumna de 1 mm (Guard Column C18 Violet Label Supelco 51177-U). La longitud de onda del detector UV será 365 nm.

Para la preparación de la muestra se deben tomar 100 μ L de vino, añadir 20 μ L de SO₂ [1120 ppm], 20 μ L de H₂SO₄ al 25% y 140 μ L de DNPH. Posteriormente se debe agitar, incubar a 65°C durante 15 minutos y enfriar en baño con hielo. Finalmente se añaden 280 μ L de fase móvil al 45% de A y 55% de B y se filtra la mezcla por 0.45 micras antes de inyectar. El desarrollo cromatográfico se llevará a cabo utilizando el siguiente gradiente: 45%A/55%B durante 5 minutos, 5%A/95%B durante 3 minutos y 45%A/55%B durante 4 minutos. La calibración se lleva a cabo mediante el método de patrón externo, para lo cual se construyó una recta de calibrado a partir de vino sintético con diferentes concentraciones de acetaldehído (Krietman *et al.*, 2013).

5.9. EXPERIMENTO 3: REACTIVIDAD DE ÁCIDO SULFHÍDRICO

En el presente estudio la determinación de los compuestos azufrados se realiza mediante dos métodos, debido a los equilibrios que mantiene el H₂S en solución. Uno de estos determina los compuestos azufrados libres y el otro permite determinar los compuestos azufrados acomplejados con el cobre, para lo cual se requiere una dilución en salmuera (solución de cloruro de sodio (NaCl) saturada), con el fin de romper dichos complejos (le llamamos fracción BR).

5.9.1. DOPADO

Para el estudio se fortificaron las 12 muestras de vino sintético con 70ppb de ácido sulfhídrico, para lo cual se preparó una solución madre de 100 ppm, a partir esta se calcularon los volúmenes a añadir a cada vino sintético en función al volumen total requerido de muestra. Adicionalmente y a diferencia de los experimentos anteriores, los vinos sintéticos utilizados para este experimento fueron fortificados con 10 ppm de cisteína y glutatión, para reproducir mejor el potencial redox del vino, al ser ambos compuestos azufrados mayoritarios en el vino.

5.9.2. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN LIBRE

La determinación de la fracción libre de compuestos azufrados volátiles en el presente trabajo se llevará a cabo con el mismo procedimiento que se emplea para determinar el sulfuroso activo. La calibración se realiza por el método de estándar interno (EMS) por interpolación de las áreas relativas en la correspondiente recta de calibrado (Franco-Luesma y Ferreira *et al.*, 2016).

5.9.3. ANÁLISIS DE LA FRACCIÓN BR (LIBRES + ACOMPLEJADOS)

Para la determinación de la fracción BR de ácido sulfhídrico, la preparación de muestra consiste en añadir a 10.8 mL de salmuera (350 g/L NaCl y 0,5g/L ác. ascórbico en agua miliQ) a 1.2 mL de vino más 40 µL del SI (4ppm de EMS en EtOH). Posteriormente se sella herméticamente el vial. Este procedimiento se realiza dentro de la cámara de anoxia y después se procede con el análisis cromatográfico.

El programa del inyector está configurado de tal manera que exista una incubación a 70 °C durante 25 minutos para proceder a la inyección en Split 1:15 de 1 mL de espacio de cabeza. Posteriormente se aplica el siguiente gradiente de temperatura: 35 °C durante 3 minutos; 10 °C/min hasta alcanzar 160 °C y 0.5 minutos a la temperatura final. El cálculo de las concentraciones se hace por interpolación de las áreas relativas al estándar interno sobre una recta de calibrado (Franco-Luesma y Ferreira *et al.*, 2016).

A continuación en la Tabla 2, se indican los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método empleado para la determinación de azufrados libres y BR.

Tabla 2. Límites de detección y cuantificación del método de análisis de azufrados libres y BR.

Compuesto	Azufrados libres		Azufrados BR	
	LD (µg/L)	LC (µg/L)	LD (µg/L)	LC (µg/L)
SO ₂	0.460	0.050*	1.800	0.170*
H ₂ S	0.003	0.010	0.030	0.100
MeSH	0.035	0.120	0.250	0.830
CS ₂	0.010	0.030	0.100	0.500

*mg/L

(Ontañón *et al.*, 2019).

5.10. DETERMINACIONES ESPECTROFOTOMÉTRICAS

La espectroscopía UV-vis detecta las transiciones electrónicas de la molécula y brinda información sobre el tamaño y estructura de las regiones conjugadas de ésta, en base a la absorción de la radiación ultravioleta visible en la región entre 200 y 780 nm del espectro electromagnético (Sirajuddin *et al.*, 2013). Las cubetas utilizadas son de un material transparente a la luz ultravioleta o visible, que permite que el haz de luz pase a través de la muestra y del blanco, de tal manera que, comparando la cantidad de luz transmitida a través de la muestra, con la transmitida a través del blanco, se logre medir la relación de intensidad entre el haz de referencia y el haz de la muestra (Skoog *et al.*, 2008)

5.10.1. ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES

Los vinos tintos absorben considerablemente en la región ultravioleta, por lo tanto, es necesario diluir 100 veces para tener una absorbancia del orden de 0.5. La absorbancia máxima de un vino en el espectro ultravioleta se observa entre 280 y 282 nm, lo cual se atribuye a la absorción de los ciclos bencénicos. Esta medida de absorbancia a 280 nm constituye una estimación válida del conjunto de compuestos fenólicos de los vinos tintos.

Para llevar a cabo la determinación el vino se diluye 100 veces con agua miliQ, dicha disolución se traslada a cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, homogenizando al menos 3 veces antes de medir la absorbancia frente a agua miliQ que será utilizada para hacer el cero del equipo. El valor de la absorbancia multiplicada por 100 corresponderá al índice de polifenoles totales (I280) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

5.10.2. COLOR

Para determinar la intensidad del color del vino se requiere medir la absorbancia de las muestras sin diluir a 3 diferentes longitudes de onda (420, 520 y 620 nm). Para esto se utilizaron cubetas de cuarzo de 1, 2 o 5 mm de paso óptico, buscando obtener absorbancias entre 0.3 y 0.7 como lo recomienda la OIV. El volumen de vino a utilizar será aproximadamente 1.5 mL ya que se requiere homogenizar al menos 3 veces la cubeta. La intensidad de color será expresada como la suma de las absorbancias correspondientes a las 3 longitudes de onda, multiplicada por el factor necesario según la longitud del paso óptico de la cubeta utilizada (OIV, 2018).

5.11. DETERMINACIÓN DE POTENCIAL REDOX

Las determinaciones de potencial redox se realizaron con el medidor de pH/ORP/ISE portátil e impermeable HANNA Instruments HI98191. El instrumento consta de un microprocesador que calcula y compensa automáticamente la temperatura y los parámetros relevantes en relación al pH. Tiene incorporado un electrodo de titanio y un sistema de referencia Ag/AgCl. Las mediciones requieren de un tiempo de estabilización aproximado de 35 minutos y los resultados son expresados en milivoltios (mV).



Figura 4. Medidor de pH/ORP/ISE portátil HANNA Instruments HI98191.

5.12. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Para el tratamiento estadístico de los resultados obtenidos del estudio se trabajó con Microsoft Excel 2016 (Microsoft, WA). Los resultados de las muestras control fueron comparados con el punto inicial de todos los experimentos, para esto, y considerando que no se realizaron réplicas de los análisis de IPT y color de las muestras analizadas, la comparación se lleva a cabo con el test t por parejas con un nivel de significancia (α) de 0.05. Se utilizó el mismo test t para comparar los resultados de IPT y color del punto inicial del estudio con los obtenidos al mes y medio de incubación en anoxia a 35 °C.

Para los análisis en los que se realizaron réplicas, la herramienta estadística utilizada fue un test ANOVA de dos factores con un $\alpha = 0.05$, siendo los factores muestra y tratamiento. Se analizó también la interacción entre ambos factores.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. CONTENIDO FENÓLICO DE MISTELAS

En la Figura 5 se observa una gráfica de correlación entre los valores de absorbancia a 280 y 520 nm de las uvas de las mistelas utilizadas para la extracción de las FFAs, estos valores fueron obtenidos mediante el método “Cromoenos”, el cual permite predecir la intensidad de color del vino (IC), la calidad de los taninos (si son verdes o maduros) y el perfil aromático del vino en función al Índice de Madurez Fenólica (IMF) obtenido del análisis. Dicho índice es la ratio entre D280/D520, que aumenta cuando las fracciones ligadas a los polisacáridos y antocianos se condensan, esto indica que la maduración fenólica está ligada al desarrollo de los procesos de hidrólisis de los enlaces antociano-polisacárido o antociano-tanino. Es así que, existe una relación inversamente proporcional entre IMF e IC, es decir, el color del vino es más estable cuando el IMF es menor, puesto que los polisacáridos de la uva arrastran a los antocianos cuando precipitan en un medio hidroalcohólico y al liberarse pasan al vino. El punto máximo de color se alcanza cuando el IMF se acerca a 1.5, tomando en cuenta que conforme el IMF disminuye los taninos son menos verdes y astringentes pero más dulces pues la uva es más madura.

Las muestras han sido elegidas para tener una variabilidad amplia de la composición polifenólica. La absorbancia a 520 nm oscila entre 0.21 y 0.90; y la absorbancia a 280 nm oscila entre 0.66 y 1.47. El IMF oscila entre 1.34 (POS-BRB-TA) y 3.33 (PRE-BVV-GF).

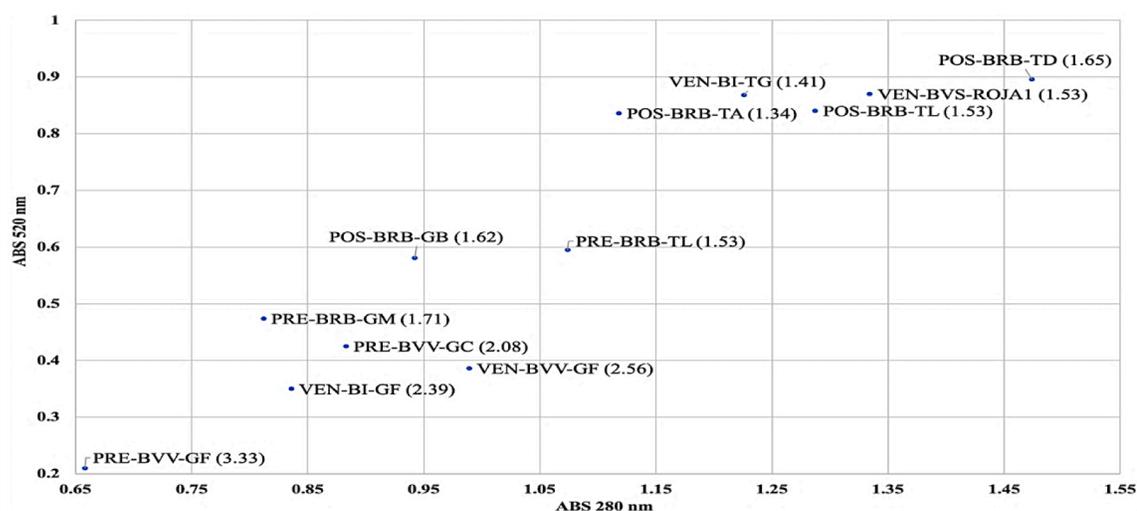


Figura 5. Parámetros espectrofotométricos de las uvas utilizadas en la elaboración de mistelas

6.2. MUESTRAS CONTROL SIN FORTIFICAR

Las doce muestras sin dopar se analizaron antes y después de ser incubadas en anoxia durante 1.5 meses. Los análisis realizados a estas muestras fueron: IPT, color, potencial redox, azufrados libres y BR. Por experimental previo realizado en el laboratorio se conoce que los vinos reconstituidos con FFAs no poseen ni sulfuroso ni acetaldehído, por lo que se optó por no realizar control de esas sustancias en los vinos.

En la Tabla 3 se observa que el CS₂ aparece tanto en la fracción libre como BR, este aumenta en un orden de magnitud, sin embargo, el nivel inicial era insignificante y tras 1.5 meses de incubación en anoxia sigue siéndolo, con un valor medio de 0.37 µg/L, que al compararlo con su umbral (30 µg/L) no llega a ser perceptible. Tres muestras destacan por haber generado cuatro veces más que el resto, siendo todas de garnacha: POS-BRB-GB (0.88 µg/L), VEN-BVV-GF (0.48 µg/L) y PRE-BVV-GC (0.59 µg/L). Si se observa el porcentaje de variación entre muestras (% RSD), se puede ver que existe una mayor diferencia entre los vinos tras haber transcurrido el periodo de incubación en anoxia.

Tabla 3. Azufrados libres en muestras control antes y después de la incubación en anoxia.

FFA	Punto Inicial		Mes y Medio	
	H ₂ S (µg/L)	CS ₂ (µg/L)	H ₂ S (µg/L)	CS ₂ (µg/L)
PRE-BRB-TL	<LD	0.02±0.04	<LD	0.19±0.00
PRE-BVV-GF	<LD	0.03±0.00	<LD	0.14±0.00
PRE-BRB-GM	<LD	0.02±0.00	<LD	0.16±0.01
POS-BRB-TD	<LD	0.02±0.04	<LD	0.12±0.01
VEN-BI-GF	<LD	0.02±0.00	<LD	0.16±0.00
POS-BRB-TL	<LD	0.02±0.00	<LD	0.20±0.01
POS-BRB-GB	<LD	0.02±0.04	<LD	0.88±0.08
VEN-BVV-GF	<LD	0.03±0.00	<LD	0.48±0.04
VEN-BI-TG	<LD	0.02±0.04	<LD	0.06±0.00
VEN-BVS-R1	<LD	0.06±0.00	<LD	0.10±0.01
PRE-BVV-GC	<LD	0.02±0.04	<LD	0.59±0.00
POS-BRB-TA	<LD	0.02±0.04	<LD	0.14±0.00
\bar{x}		0.03		0.27
% RSD		46.52		93.42

En la Tabla 4 se observa que los valores de H₂S aparecen solamente en el análisis de la fracción BR, puesto que se encuentra reversiblemente combinado con los metales del vino. Inicialmente ronda el umbral (1 µg/L) con una media de 0.88 µg/L y tras el periodo de incubación en anoxia sus valores oscilan entre 2.12 y 19.55 µg/L. Se puede ver además, que tras 1.5 meses de incubación en anoxia el H₂S acomplejado con metales aumenta en todos los casos, pues sus valores iniciales se encontraban entre 0.22 y 1.70 µg/L. Los 3 vinos que tienen más sulfhídrico acomplejado coinciden con los que tenían más CS₂: POS-BRB-GB (18.46 µg/L), VEN-BVV-GF (19.55 µg/L) y PRE-BVV-GC (19.41 µg/L).

Al observar los % RSD tanto en el punto inicial como a los 1.5 meses de incubación, se refleja una diferencia evidente entre muestras, siendo más marcada en los resultados de CS₂ (76.54 %) tras haber transcurrido el periodo de incubación en anoxia.

Tabla 4. Azufrados BR en las muestras control antes y después de la incubación en anoxia.

FFA	Punto Inicial			Mes y Medio		
	H ₂ S (µg/L)	CS ₂ (µg/L)	MeSH (µg/L)	H ₂ S (µg/L)	CS ₂ (µg/L)	MeSH (µg/L)
PRE-BRB-TL	1.79±0.04	<LD	0.71±0.09	2.95±0.06	<LD	<LD
PRE-BVV-GF	0.42±0.01	<LD	<LD	8.32±0.14	<LD	<LD
PRE-BRB-GM	0.80±0.03	<LD	0.83±0.10	10.08±0.79	0.27±0.01	<LD
POS-BRB-TD	0.87±0.01	<LD	<LD	4.83±0.32	0.26±0.00	<LD
VEN-BI-GF	0.90±0.02	<LD	0.29±0.31	2.12±0.13	0.17±0.01	<LD
POS-BRB-TL	1.29±0.00	<LD	0.37±0.31	5.79±0.53	0.24±0.01	<LD
POS-BRB-GB	0.84±0.04	<LD	1.00±0.31	18.46±1.16	0.92±0.02	<LD
VEN-BVV-GF	1.61±0.11	<LD	0.34±0.31	19.55±1.09	0.59±0.02	<LD
VEN-BI-TG	0.63±0.04	<LD	0.47±0.31	8.52±0.54	0.12±0.01	<LD
VEN-BVS-R1	0.42±0.01	<LD	0.25±0.31	16.84±0.18	0.16±0.01	<LD
PRE-BVV-GC	0.73±0.17	<LD	<LD	19.41±0.23	0.70±0.01	<LD
POS-BRB-TA	0.22±0.17	<LD	0.51±0.31	16.64±0.70	0.27±0.02	<LD
\bar{x}	0.88		0.42	11.13	0.37	
% RSD	53.89		69.72	59.87	76.54	

El MeSH acompañado con metales por el contrario, disminuye tras el periodo de incubación en anoxia como se ve en la Tabla 4. Su umbral es bajo, por lo cual su presencia es perceptible a bajas concentraciones; aparece frecuentemente en ausencia de oxígeno formando complejos no volátiles con el Cu (II). Estos complejos son reversibles por lo que la dilución simple del vino con salmuera los libera (Clark *et al*, 2015).

Como se observa en la Tabla 5, los potenciales redox de las muestras control se mantuvieron prácticamente iguales tras la incubación, lo cual se explica al no haber sido fortificadas con ninguna sustancia que pudiese disminuir su potencial, sin embargo la ligera disminución de potencial apreciada de una media de 167.92 a 160.42 mV se debe al calor aplicado (35°C) durante el tratamiento. El potencial inicial fue considerablemente mayor que el que un tinto joven suele tener, esto debe posiblemente a la existencia de compuestos oxidados en la FFA, dado que por las condiciones de trabajo (anoxia) se descarta que pueda deberse al efecto del oxígeno. Cabe recalcar que todas las muestras estuvieron durante 24 horas en la cámara de anoxia con una atmósfera de argón.

Tabla 5. Potencial redox, IPT e intensidad de color en las muestras control.

FFA	Potencial Redox (mV)		IPT (I280)		Intensidad de color	
	PI	1.5 M	PI	1.5 M	PI	1.5 M
PRE-BRB-TL	177.20	173.70	41.20	44.30	14.95	12.73
PRE-BVV-GF	-	-	33.20	34.90	10.81	9.10
PRE-BRB-GM	161.50	156.10	33.50	35.10	10.94	10.28
POS-BRB-TD	180.80	165.00	45.50	49.60	22.43	20.26
VEN-BI-GF	163.00	158.60	27.10	28.10	8.70	7.63
POS-BRB-TL	-	-	46.00	44.70	20.13	17.90
POS-BRB-GB	-	-	38.90	34.50	15.25	10.97
VEN-BVV-GF	-	-	37.20	36.20	11.10	8.43
VEN-BI-TG	-	-	45.50	39.60	19.69	14.62
VEN-BVS-R1	164.90	158.00	46.90	42.60	22.71	17.41
PRE-BVV-GC	-	-	43.50	39.40	14.10	10.40
POS-BRB-TA	160.10	151.10	47.30	44.40	19.11	14.63
\bar{x}	167.92	160.42	40.48	39.45	15.83	12.86
% RSD	5.24	4.93	16.19	15.13	30.81	31.84

Los resultados de IPT se mantienen tras la incubación en anoxia a 35 °C, pero existe una ligera degradación en el color, de una media inicial de 15.83 a un valor de 12.86, esto se relaciona con la susceptibilidad del vino al calor. Tras un test t por parejas se puede decir que las muestras control no varían significativamente en IPT, pero si tienen una disminución significativa del color ($p = 1.97 \times 10^{-5}$), entre el punto inicial y después de la incubación en anoxia.

Se realizó un análisis de correlaciones de la variación de potencial redox tras 1.5 meses de anoxia con parámetros iniciales del contenido fenólico y variaciones de otros compuestos químicos. Lo más interesante de lo encontrado fue:

- Correlaciones significativas con:

Intensidad de color de muestras control ($R=0.56$ $p=0.06$).

Intensidad de color de muestras dopadas con SO_2 ($R=0.68$ $p=0.02$).

Intensidad de color de muestras dopadas con acetaldehído ($R=0.63$ $p=0.03$).

Intensidad de color de muestras dopadas con H_2S ($R=0.62$ $p=0.03$).

Absorbancia a 280 nm en extracto de uva ($R=0.56$ $p=0.06$).

6.1. EXPERIMENTO 1: REACTIVIDAD DE ANHÍDRIDO SULFUROSO

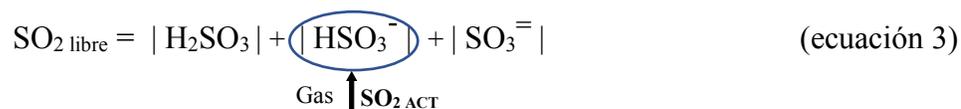
En la Tabla 6 se puede ver que en el punto inicial casi todo el SO_2 está en forma libre, el porcentaje de sulfuroso combinado oscila entre un 2 y 10% para los vinos POS-BRB-TA y POS-BRB-TD, respectivamente. Esto se debe a que en la matriz no hay concentraciones elevadas de compuestos carbonílicos, que son los principales aglutinantes de SO_2 . Teóricamente, el acetaldehído establece una combinación estable con el sulfuroso (ecuación 2), disminuyendo los niveles de SO_2 libre y retardando la reacción con las quinonas (Danilewicz *et al.*, 2008).



El SO_2 combinado corresponde a reacciones de equilibrio con compuestos como la glucosa, el ácido galacturónico, polisacáridos y polifenoles. Estas son combinaciones poco estables, que constituyen una reserva que alimenta la fracción de SO_2 libre a medida que esta desciende progresivamente durante el envejecimiento, ya que en función al pH y la temperatura se van presentando las distintas formas combinadas. El SO_2 combinado se encuentra mayoritariamente como bisulfito (HSO_3^-) y en menor porcentaje como sulfito

(SO_3^-) (Peynaud, 1996). Es así que se explica la disminución drástica del SO_2 libre de una media de 71.47 a 21.73 mg/L y el aumento considerable de la fracción combinada al mes y medio de incubación de 5.00 a 17.73 mg/L. Esto se contrastó mediante un test t por parejas, donde p fue menor a 0.05, corroborando así que las diferencias entre el punto inicial y final del estudio son estadísticamente significativas, tanto de SO_2 libre como de combinado.

El sulfuroso activo también se reporta en la Tabla 6; teóricamente debería ser parecido al libre o menor (ver ecuación 3), pues el sulfuroso activo corresponde a la forma molecular gaseosa del SO_2 con propiedades antioxidantes, antisépticas y antioxidásicas, que junto con los iones sulfito y bisulfito constituyen el SO_2 libre (Peynaud, 1996). Esto se cumple tanto en el punto inicial, como al mes y medio de incubación.



Teóricamente, cuanto menor sea el pH del vino mayor será la concentración de la forma activa del SO_2 . Si comparamos entonces los valores de sulfuroso activo y libre podemos ver que existe una mayor diferencia entre estos valores en el punto inicial, es decir, las combinaciones que se rompen por el pH ácido requerido para las determinaciones por Rankine están en mayor proporción al inicio y disminuyen con el envejecimiento en anoxia (Guerrero *et al.*, 2015).

Las mayores diferencias entre el SO_2 activo y libre están en el vino POS-BRB-GB, en el punto inicial del experimento, pues los 18.97 mg/L de sulfuroso activo corresponden solo al 27.57 % del libre, es decir, la mayoría del sulfuroso libre participa de uniones que se rompen al pH ácido que requiere el método Rankine; sin embargo, vinos como el PRE-BVV-GF no tienen ninguna de estas uniones susceptibles al pH, pues sus valores de sulfuroso libre y activo coinciden. Si se observa además la disminución del SO_2 activo en el vino PRE-BVV-GC tras la incubación en anoxia, se puede ver que coincide con el libre.

Por otro lado si se comparan los valores de SO_2 total del punto inicial y final, se evidencia un consumo entre el 24 y 67%, lo cual se debe a que los polifenoles de la FFA se combinan con el SO_2 . Esta disminución es estadísticamente significativa, pues el valor de p obtenido del test t (4×10^{-8}) es considerablemente menor que α .

Se aprecia también un claro aumento del sulfuroso combinado tras el periodo de incubación en anoxia ($p = 0.01$). En el vino POS-BRB-TA el porcentaje de SO_2 combinado asciende de un 2% a un 77.4%. Sin embargo, hay muestras como la PRE-BRB-GM que tras la anoxia tiene el sulfuroso al 90% en su forma libre y el 10% restante combinado.

Finalmente al analizar los resultados de sulfuroso libre se evidencia una disminución estadísticamente significativa ($p = 1 \times 10^{-9}$) tras la anoxia en valor absoluto y porcentaje, de valores iniciales que oscilan entre 90 y 98% a valores entre el 22.6 y 90 % del total.

Cabe mencionar que al realizar los test t para comparar los resultados de sulfuroso total al inicio con los del final del experimento, p es considerablemente pequeño (4×10^{-8}), se dice entonces que la confiabilidad es superior al 95%. Esto ocurre también al comparar los resultados de sulfuroso libre ($p = 1 \times 10^{-9}$).

Tabla 6. SO_2 libre, combinado y activo en muestras dopadas con 80 mg/L de sulfuroso.

FFA	Libre (mg/L)		Combinado (mg/L)		Total (mg/L)		Activo (mg/L)	
	PI	1.5M	PI	1.5M	PI	1.5M	PI	1.5M
PRE-BRB-TL	68.80	14.40	5.60	16.00	74.40	30.40	53.56±1.68	11.15±0.24
PRE-BVV-GF	72.00	20.80	6.40	4.80	78.40	25.60	80.69±0.03	17.15±0.12
PRE-BRB-GM	70.40	27.20	4.80	3.20	75.20	30.40	54.80±0.70	11.57±0.14
POS-BRB-TD	70.40	30.40	8.00	8.00	78.40	38.40	24.83±0.10	9.15±0.25
VEN-BI-GF	70.40	28.80	4.80	6.40	75.20	35.20	62.59±0.90	14.26±0.22
POS-BRB-TL	68.80	24.00	4.80	32.00	73.60	56.00	22.67±1.68	10.00±0.34
POS-BRB-GB	68.80	33.60	5.60	6.40	74.40	40.00	18.97±1.68	18.01±0.39
VEN-BVV-GF	70.40	25.60	4.80	6.40	75.20	32.00	58.88±1.70	14.96±0.02
VEN-BI-TG	72.00	14.40	3.20	41.60	75.20	56.00	23.24±4.25	10.08±0.22
VEN-BVS-R1	70.40	14.04	7.20	27.20	77.60	41.60	32.28±1.63	11.98±0.35
PRE-BVV-GC	76.80	16.00	3.20	22.40	80.00	38.40	60.03±0.29	17.05±0.15
POS-BRB-TA	78.40	11.20	1.60	38.40	80.00	49.60	27.27±0.69	9.15±0.18
\bar{x}	71.47	21.73	5.00	17.73	76.47	39.47	43.32	12.88
% RSD	4.31	34.60	35.53	79.26	2.97	25.19	47.57	25.39

En la Tabla 7 se incluyen los resultados de IPT y color, donde se evidencia que los valores de IPT disminuyen al adicionar sulfuroso. Para corroborar esto se hizo un test t por

parejas para comparar los IPT iniciales con el control, donde p (0.02) fue menor que α , confirmando que la disminución de IPT fue estadísticamente significativa al adicionar los 80 mg/L de sulfuroso. Tras la incubación en anoxia estos valores aumentan en la mayoría de casos, pero en el vino PRE-BRB-TL disminuye y se mantiene en la muestra VEN-BVS-R1. Estas diferencias entre muestras se comprobaron al realizar un test t por parejas de dos colas, con un p de 0.04, indicando en efecto que existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras.

La intensidad de color de igual manera, aumenta significativamente ($p = 0.01$), esto se debe a que el SO_2 ralentiza los procesos de polimerización de los polifenoles en el vino durante el envejecimiento y por ende evita la degradación de su color. Sin embargo cabe recalcar que los valores de intensidad de color, al compararlos con el control, se reducen a la mitad cuando se añade sulfuroso, lo cual se debe a que los polifenoles de la FFA se combinan con el SO_2 formando antocianos decolorados. Esta evidente reducción es estadísticamente significativa ($p = 3 \times 10^{-8}$).

Tabla 7. IPT, intensidad de color y CS_2 en muestras dopadas con 80 mg/L de SO_2 .

FFA	IPT (I280)		Intensidad de color		CS_2 ($\mu\text{g/L}$)
	PI	1.5M	PI	1.5M	1.5M
PRE-BRB-TL	44.40	41.60	6.63	6.37	0.34±0.01
PRE-BVV-GF	30.40	33.10	4.56	6.19	0.35±0.00
PRE-BRB-GM	30.60	33.90	5.00	5.81	0.39±0.01
POS-BRB-TD	53.50	49.90	17.65	15.88	0.52±0.00
VEN-BI-GF	22.70	29.70	2.73	5.47	0.34±0.01
POS-BRB-TL	33.70	45.80	15.10	15.24	0.61±0.02
POS-BRB-GB	29.80	35.00	5.64	7.22	0.74±0.03
VEN-BVV-GF	32.50	37.20	4.21	6.46	0.65±0.01
VEN-BI-TG	40.90	43.00	10.07	10.36	0.69±0.03
VEN-BVS-R1	44.60	44.60	12.31	12.21	2.17±0.06
PRE-BVV-GC	34.30	38.70	5.29	7.37	1.86±0.06
POS-BRB-TA	43.80	42.60	8.66	11.71	0.69±0.01
\bar{x}	36.8	39.6	8.2	9.2	0.78
% RSD	23.55	15.13	57.80	40.85	76.88

El CS₂ aparece al mes y medio de incubación en forma libre, pero a niveles muy bajos similares al control incubado (ver Tabla 5), sin embargo el test t nos indica que estas diferencias con el respecto al control son estadísticamente significativas ($p = 0.01$). Destacan las mayores concentraciones de 2.17 y 1.86 µg/L en los vinos VEN-BVS-R1 y PRE-BVV-GC respectivamente. La concentración de CS₂ no supera los 2,17 µg/L, por lo tanto no aporta significativamente a la calidad sensorial del vino, ya que como se indica en la Tabla 1, su umbral de percepción es mucho más alto (30 µg/L).

También se realizó un análisis de correlaciones del consumo de SO₂ total tras mes y medio de incubación en anoxia con parámetros iniciales del contenido fenólico y variaciones de otros compuestos químicos. Lo más interesante de lo encontrado fue:

- Ausencia de correlación con taninos en uva.
- Correlaciones significativas con:
 - IPT de muestras control ($R=0.59$ $p=0.04$).
 - IC de muestras control ($R=0.61$ $p=0.03$).
 - IC al dopar con sulfuroso ($R=0.53$ $p=0.07$).
 - Diferencia entre sulfuroso libre y activo al dopar con sulfuroso, punto inicial de la experiencia ($R=0.79$ $p=0.004$)
 - Absorbancia a 280 nm en extracto de uva ($R=0.60$ $p=0.04$)
 - Absorbancia a 520 nm en extracto de uva ($R=0.73$ $p=0.01$)
 - IMF en uva ($R=0.66$ $p=0.02$).
 - Antocianos en uva ($R=0.65$ $p=0.02$).

En el anexo se representa gráficamente dos de las mencionadas correlaciones significativas en este experimento. La gráfica 1 muestra la correlación significativa entre la variación de SO₂ total tras la incubación en anoxia a 35 °C y la diferencia entre sulfuroso libre y activo al dopar con el sulfuroso (en el punto inicial del análisis). La gráfica 2 muestra como esa variación de SO₂ se correlaciona con la absorbancia a 520 nm del extracto de uva. Parte de los complejos oxidados se rompen al pH ácido del método Rankine, esto se corresponde con el contenido polifenólico de la FFA medido a 520 nm, siendo aquellos que se rompen al pH experimental los valorados como libres y el resto se combinan con el sulfuroso de manera reversible.

6.2. EXPERIMENTO 2: REACTIVIDAD DE ACETALDEHÍDO

Después de dopar las 12 muestras con 50 mg/L de acetaldehído, se determinó la concentración del mismo, en el punto inicial y tras 1.5 meses de incubación en anoxia.

En cuanto a las concentraciones iniciales de acetaldehído tras el dopado con 50 mg/L de este, se encontró aproximadamente esa concentración, excepto para el vino PRE-BVV-GF cuya concentración inicial fue de 20.59 mg/L, por lo cual puede deberse a un error puntual en el dopado.

Como se observa en la Tabla 8, la concentración de acetaldehído disminuye entre 0 y 15.82 mg/L al comparar los valores del punto inicial y al mes y medio de incubación. Esto se relaciona con la concentración de polifenoles reactivos con aldehídos (ARPs), que reaccionan irreversiblemente con el acetaldehído, en vino son principalmente antocianos y taninos, mismos que al ser consumidos permiten evidenciar concentraciones mayores de acetaldehído. Entonces, los vinos que consumieron más acetaldehído en anoxia serían los que teóricamente tienen una mayor concentración de ARPs (Bueno *et al.*, 2018).

La cantidad de acetaldehído que ha disminuido en las muestras es variado. En la muestra POS-BRB-TL por ejemplo, la concentración de acetaldehído no ha variado tras la incubación en anoxia, lo cual indica que su contenido de ARPs es bajo o nulo. Por otro lado muestras como la PRE-BRB-GM y PRE-BVV-GF se ha evidenciado un aumento en la concentración de acetaldehído de 1.66 y 6.14 mg/L respectivamente, por lo cual se asume que el contenido de ARPs es nulo. En la muestra VEN-BVS-R1 por el contrario, ha reaccionado el 34.4 % del valor añadido, con un consumo de 14.83 mg/L de acetaldehído.

Tomando en cuenta lo expuesto se explica porque las muestras POS-BRB-TA y VEN-BVS-R1 con un consumo de acetaldehído de 15.82 y 14.83 mg/L respectivamente tienen un mayor contenido fenólico, pues se ubican en la región superior del gráfico que correlaciona las absorbancias a 520 y 280 nm. Se puede observar también que los vinos POS-BRB-GB y PRE-BVV-GC que se ubican en la parte central del gráfico, tuvieron un consumo menor de acetaldehído durante el mes y medio de incubación con una reducción de la concentración de acetaldehído de 10.16 y 7.05 mg/L respectivamente. Finalmente la muestra PRE-BVV-GF que tuvo un aumento de 6.14 mg/L en la concentración de acetaldehído tras el envejecimiento en anoxia, se ubica consecuentemente en la parte inferior del gráfico, es decir, la región que representa un contenido de polifenoles inferior.

Con la adición de acetaldehído, el IPT disminuye con respecto al control (ver Tabla 5) de un valor medio de 40.48 a 33.37, esta disminución es estadísticamente significativa ($p = 1 \times 10^{-4}$). Sin embargo, se mantiene igual tras el periodo de incubación en anoxia. Esto lo corrobora el test t por parejas realizado ($p = 0.37$), además sus valores medios son muy próximos entre ellos: 33.37 y 33.63.

La adición de acetaldehído no modifica significativamente el color de los vinos ($p = 0.17$) con respecto al control. Pero si experimenta una ligera degradación tras la anoxia, pues disminuye de un valor promedio de 16.74 a 14.69, esto se atribuye a la susceptibilidad del vino al calor (35 °C). Estadísticamente esta disminución es significativa ($p = 0.03$).

Tabla 8. Acetaldehído total, IPT e Intensidad de Color en muestras dopadas con 50 mg/L de acetaldehído

FFA	[Acetaldehído] (mg/L)		IPT (I280)		Intensidad de color	
	PI	1.5M	PI	1.5M	PI	1.5M
PRE-BRB-TL	39.24±0.28	31.72±0.54	38.10	35.30	14.49	13.54
PRE-BVV-GF	20.59±0.15	26.73±0.02	29.10	30.60	10.48	11.51
PRE-BRB-GM	41.52±0.52	43.18±0.81	29.80	30.30	12.02	11.34
POS-BRB-TD	39.67±0.52	35.04±0.27	45.70	41.70	29.01	21.94
VEN-BI-GF	39.13±0.34	31.93±0.79	22.60	26.70	8.07	9.37
POS-BRB-TL	34.73±0.03	34.83±0.27	43.60	38.80	27.15	18.92
POS-BRB-GB	41.51±0.21	31.35±0.90	29.00	30.00	12.11	13.05
VEN-BVV-GF	42.10±0.19	36.05±1.34	24.30	26.80	9.65	10.01
VEN-BI-TG	38.87±0.08	29.11±0.57	33.70	33.40	21.12	16.65
VEN-BVS-R1	43.01±0.11	28.18±0.93	37.00	37.90	22.11	18.37
PRE-BVV-GC	43.74±0.04	35.69±1.09	31.50	34.00	12.22	13.16
POS-BRB-TA	46.80±0.16	30.99±0.24	36.00	38.10	22.43	18.46
\bar{x}	39.24	32.90	33.37	33.63	16.74	14.69
% RSD	16.81	13.44	21.21	14.49	43.13	27.53

Como parte del tratamiento estadístico de los datos, se realizó un test ANOVA de dos factores, con el fin de ver si tras el envejecimiento en anoxia existen diferencias significativas con respecto al punto inicial, entre muestras, y lo más importante, si el tratamiento afecta de manera diferente según la muestra. Para ello se analizaron los valores

p obtenidos del test estadístico, ratificando que hay diferencias significativas entre el punto inicial y final del experimento ($p = 3.29 \times 10^{-22}$), entre muestras ($p = 4.43 \times 10^{-23}$) y que además existe una interacción entre el factor incubación y el factor muestra, con evidentes diferencias estadísticamente significativas ($p = 1.27 \times 10^{-18}$). La incubación en anoxia afectó de manera diferente a cada muestra, con respecto al contenido de acetaldehído.

También se realizó un análisis de correlaciones de la disminución de acetaldehído tras 1.5 meses de anoxia con parámetros iniciales del contenido fenólico y variaciones de otros compuestos químicos. Lo más interesante de lo encontrado fue:

- Ausencia de correlación con:

IPT de muestras control.

Concentración de antocianos y taninos en uva.

- Correlaciones positivas y significativas con:

IMF en uva ($R=0.59$ $p=0.04$).

Absorbancia a 520 nm en extracto de uva ($R=0.52$ $p=0.08$).

Diferencia entre sulfuroso libre y activo al dopar con sulfuroso ($R=0.53$ $p=0.07$).

Aumento de H₂S BR tras incubación en anoxia (1ª incubación) ($R=0.60$ $p=0.04$).

En el Anexo (gráfica 3) se representa gráficamente la correlación entre la variación de acetaldehído y el índice de maduración fenólica. Con esto se explica como el IMF puede estar correlacionado con el contenido de ARPs. Estos ARPs reaccionan irreversiblemente con el acetaldehído a lo largo de la incubación en anoxia a 35 °C. En el vino son principalmente antocianos y taninos, por lo cual la ausencia de correlación con antocianos y taninos en uva es curiosa.

6.3. EXPERIMENTO 3: REACTIVIDAD DE ÁCIDO SULFÚRICO

Los resultados de los vinos fortificados con 70 ppb de H₂S exhiben que tanto la fracción libre como BR reflejan concentraciones muy inferiores al valor añadido, si bien aparecieron otros compuestos azufrados (MeSH y CS₂), su concentración fue aún más baja que la de sulfhídrico. Esto se atribuye enteramente al valor de potencial redox de los vinos en el punto inicial del experimento, pues estos valores oscilan entre 123.00 y 139.40 mV (ver Tabla 11), lo que provoca que la mayor parte de H₂S se dimerice o pase a formas

oxidadas. Esto se corrobora al observar los resultados tras mes y medio de incubación en anoxia, donde la concentración de H₂S subió considerablemente con valores entre 35.71 y 100.31 µg/L (ver Tabla 10), lo cual se contrasta al observar la drástica disminución de potencial con valores negativos entre -3.90 y -33.00 mV como se reporta en la Tabla 11, estos valores además se van aproximando al potencial redox promedio de un vino crianza (-65 mV).

En la Tabla 9 se puede ver que los valores de CS₂ aumentan en la fracción libre de una media de 0.04 a 2.30 µg/L, sin embargo, los valores reportados al mes y medio de incubación no llegan a 6 µg/L, sin acercarse al umbral de olfacción y por lo tanto sin interés sensorial. Se puede observar también que la pequeña fracción libre de H₂S que había en el punto inicial, se ha combinado en su totalidad tras la incubación en anoxia.

Tabla 9. Azufrados libres en muestras dopadas con 70 µg/L de H₂S

FFA	Punto Inicial		Mes y Medio	
	H ₂ S (µg/L)	CS ₂ (µg/L)	H ₂ S (µg/L)	CS ₂ (µg/L)
PRE-BRB-TL	0.26±0.00	0.03±0.05	<LD	1.29±0.02
PRE-BVV-GF	0.25±0.01	0.03±0.00	<LD	2.37±0.05
PRE-BRB-GM	0.18±0.02	0.03±0.01	<LD	0.82±0.02
POS-BRB-TD	0.06±0.09	0.15±0.01	<LD	1.38±0.03
VEN-BI-GF	0.26±0.01	0.03±0.04	<LD	0.81±0.02
POS-BRB-TL	0.26±0.01	0.02±0.04	<LD	2.15±0.07
POS-BRB-GB	0.23±0.01	0.02±0.00	<LD	1.39±0.04
VEN-BVV-GF	0.16±0.01	0.03±0.01	<LD	3.31±0.06
VEN-BI-TG	0.28±0.02	0.03±0.00	<LD	1.63±0.05
VEN-BVS-R1	0.22±0.01	0.05±0.01	<LD	2.24±0.06
PRE-BVV-GC	0.22±0.01	0.01±0.04	<LD	4.20±0.09
POS-BRB-TA	0.29±0.00	0.02±0.00	<LD	5.98±0.14
\bar{x}	0.22	0.04		2.30
% RSD	28.90	99.77		69.06

Al observar la Tabla 10 se evidencia que, si bien la concentración de fortificación fue 70 ppb de H₂S, es posible que en los vinos en los que se encontraron valores superiores a este, como lo es el caso del vino VEN-BVS-R1, las moléculas de cisteína y glutatión

hayan sido precursores de H₂S tras 1.5 meses a 35 °C. Por otro lado, la muestra con menor concentración de sulfhídrico acomplejado al inicio y tras 1.5 meses de anoxia ha sido VEN-BI-GF (más formas oxidadas).

En la Tabla 10 se puede ver también que el MeSH aparece en el punto inicial como parte de la fracción BR, lo cual indica que se encontraba formando complejos con el Cu (II), que se rompieron al diluir la muestra con salmuera. Sin embargo, tras el mes y medio de incubación estos complejos se han roto por efecto de la temperatura y la reducción de potencial redox. Pueden llegar a consumirse 0.66 µg/L.

Tabla 10. Azufrados BR en muestras dopadas con 70 µg/L de H₂S

FFA	Punto Inicial			Mes y Medio		
	H ₂ S (µg/L)	CS ₂ (µg/L)	MeSH (µg/L)	H ₂ S (µg/L)	CS ₂ (µg/L)	MeSH (µg/L)
PRE-BRB-TL	10.39±0.69	<LD	0.49±0.16	48.96±4.77	1.00±0.04	<LD
PRE-BVV-GF	6.99±0.69	<LD	0.32±0.16	45.98±4.51	1.20±0.14	<LD
PRE-BRB-GM	5.73±0.49	<LD	0.55±0.04	57.07±2.37	0.27±0.00	<LD
POS-BRB-TD	6.16±0.33	<LD	<LD	44.64±2.28	0.28±0.02	<LD
VEN-BI-GF	4.36±0.43	<LD	0.42±0.16	35.71±1.39	0.83±0.05	<LD
POS-BRB-TL	4.62±0.77	<LD	0.42±0.16	38.71±1.75	1.70±0.01	<LD
POS-BRB-GB	8.38±0.77	<LD	0.66±0.16	78.46±2.05	0.19±0.14	<LD
VEN-BVV-GF	5.70±0.30	<LD	0.29±0.04	73.41±1.54	0.83±0.14	<LD
VEN-BI-TG	11.63±1.07	<LD	0.44±0.16	90.39±2.21	0.39±0.02	<LD
VEN-BVS-R1	13.37±1.24	<LD	0.54±0.16	100.31±0.64	1.03±0.01	<LD
PRE-BVV-GC	4.84±0.04	<LD	<LD	68.34±0.34	0.28±0.01	<LD
POS-BRB-TA	4.54±0.77	<LD	<LD	62.69±5.39	0.48±0.01	<LD
\bar{x}	7.23		0.37	62.06	0.71	
% RSD	42.18		51.66	33.31	66.21	

Por otro lado al igual que en el análisis de la fracción libre, el CS₂ está presente al mes y medio de incubación, sin embargo su concentración es mínima y muy por debajo del umbral de percepción, por tanto no repercute en la calidad sensorial del vino. Es importante mencionar que al comparar los valores de CS₂ libre y combinado se observa una inconsistente diferencia, siendo que los valores más altos aparecen en la fracción libre.

En la Tabla 11 se reportan los valores de IPT que han variado de una media de 40.43 a 42.93 tras la incubación en anoxia, este aumento es significativo ($p = 8 \times 10^{-6}$). Por el contrario al comparar los resultados con el control, no se encontraron diferencias significativas ($p = 0.48$), lo cual nos dice que al agregar sulfhídrico el IPT no se ve afectado.

Por otro lado la intensidad de color experimenta una disminución tras la incubación, lo cual como se ha explicado tiene relación con la susceptibilidad del vino al exceso de calor, y en este caso particular, al ser el ácido sulfhídrico un compuesto altamente reductor, interviene también en la degradación del color de la bebida. Esta disminución es estadísticamente significativa según el valor p (1×10^{-5}) obtenido del test t, de igual manera al comparar los resultados de color con el control se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0.01$).

Tabla 11. Potencial Redox, IPT e Intensidad de color en muestras dopadas con 70 $\mu\text{g/L}$ de H_2S

FFA	Potencial Redox (mV)		IPT (I280)		Intensidad de color	
	PI	1.5M	PI	1.5M	PI	1.5M
PRE-BRB-TL	136.90	-6.10	40.40	46.50	15.25	13.29
PRE-BVV-GF	-	-9.70	35.30	37.80	11.90	9.38
PRE-BRB-GM	139.40	-15.20	37.50	38.30	13.26	10.52
POS-BRB-TD	130.00	-33.00	49.20	54.40	28.10	23.04
VEN-BI-GF	137.00	-27.90	28.20	30.30	10.13	7.96
POS-BRB-TL	-	-33.60	46.60	48.50	25.63	19.26
POS-BRB-GB	-	-8.10	36.40	39.00	14.89	11.73
VEN-BVV-GF	-	-3.90	38.00	40.20	13.02	10.39
VEN-BI-TG	-	-17.50	46.30	46.70	18.92	15.81
VEN-BVS-R1	129.10	-26.90	46.90	45.20	26.55	18.86
PRE-BVV-GC	-	-6.90	39.20	41.40	13.19	10.25
POS-BRB-TA	123.00	-52.30	41.20	46.90	22.18	15.56
\bar{x}	132.57	-20.09	40.43	42.93	17.75	13.84
% RSD	52.32	73.64	14.92	14.78	35.54	33.83

En este experimento se empleó como herramienta estadística un test ANOVA de dos factores, este test permitió conocer si la incubación en anoxia durante 1.5 meses tuvo efecto

diferente según el vino analizado, y si hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores de sulfhídrico obtenidos tras la incubación en anoxia con respecto al punto inicial y entre muestras. Para llevar a cabo todo ello se analizaron los p obtenidos del test, con lo cual se comprobó que existen diferencias significativas entre el punto inicial y final del experimento ($p = 3.87 \times 10^{-18}$), entre muestras ($p = 6.94 \times 10^{-32}$) y que además existe una interacción entre el efecto muestra y tratamiento ($p = 3.99 \times 10^{-16}$). La incubación en anoxia a 35 °C afecta de forma diferente las muestras en cuanto al aumento de H₂S.

También se realizó un análisis de correlaciones del aumento de sulfhídrico tras 1.5 meses de anoxia con parámetros iniciales del contenido fenólico y variaciones de otros compuestos químicos. Lo más interesante de lo encontrado fue:

- Ausencia de correlación con cualquier parámetro espectrofotométrico medido en uva o muestras.
- Correlaciones significativas con:
Consumo de acetaldehído tras incubación en anoxia ($R=0.60$ $p=0.04$).

La gráfica 4 del anexo representa la correlación entre el consumo de acetaldehído y el aumento de H₂S debido a la disminución de potencial. Esta correlación explica cómo las FFAs con pocos ARPs tienen un consumo menor de CH₃CHO, y son aquellas que tras la incubación en anoxia tienen potenciales redox más altos, por lo cual también exhiben un menor incremento de H₂S (mantienen todavía formas oxidadas que no analizamos).

6.4. EXPERIMENTO 3: REACTIVIDAD DE H₂S (2ª INCUBACIÓN)

Este apartado del documento refleja los resultados de la repetición del experimento de la evaluación de reactividad de H₂S, pues como se mencionó, los potenciales redox en el punto inicial del análisis fueron muy altos. Para corregir este problema, 6 de los 12 vinos previamente utilizados fueron preparados para someterlos a una reducción acelerada durante 2 semanas, esto se logró incubando dichos vinos a 50 °C, luego de haber sido empacados herméticamente en bolsas al vacío y dentro de la cámara de anoxia, de tal manera que el oxígeno no entre en contacto con las muestras. Como era de esperarse, tras las 2 semanas bajo estas condiciones los potenciales redox fueron considerablemente inferiores a los que se tuvieron en el punto inicial del experimento anterior, y bajaron aún

más cuando se realizó la fortificación con sulfhídrico; estos valores oscilaron entre -42.50 y -80.70 mV (sin dopar), como se puede observar en la Tabla 14.

En este segundo experimento, dado que el potencial redox es bajo (ver Tabla 14), predominan las formas BR. Además, la concentración de metales es alta, por tanto la mayor parte de H₂S está acomplejado con metales, aunque hay diferencias entre muestras. En algunas como PRE-BRB-GM, solo el 4.2 % está como libre, pero otras como la POS-BRB-TA tiene un 74% del sulfhídrico como libre (ver tablas 12 y 13).

Al observar los resultados de H₂S libre en la Tabla 12 se evidencia una disminución estadísticamente significativa ($p = 0.01$) de una media de 14.24 a 1.32 µg/L al comparar los puntos inicial y final del experimento mediante un test t por parejas. Esto quiere decir que la mayor parte de sulfhídrico libre se combinó con los metales del vino. Por otro lado, se puede ver que el MeSH aparece solamente en los resultados de la fracción libre, esto se debe a que el LD para la determinación de azufrados BR es 0.25 µg/L para este compuesto (ver Tabla 2). Cabe recalcar además que entre el punto inicial y final no existe una diferencia significativa ($p = 0.32$) en la concentración de MeSH libre.

Tabla 12. Azufrados libres en muestras de menor potencial dopadas con 70 µg/L de H₂S

FFA	Punto Inicial			Mes y Medio		
	H ₂ S (µg/L)	MeSH (µg/L)	CS ₂ (µg/L)	H ₂ S (µg/L)	MeSH (µg/L)	CS ₂ (µg/L)
PRE-BRB-TL	7.69±0.69	0.15±0.01	0.11±0.00	1.29±0.12	0.16±0.00	0.34±0.03
PRE-BRB-GM	2.48±0.57	0.10±0.40	0.12±0.08	0.65±0.06	0.15±0.01	0.41±0.00
VEN-BI-GF	11.57±0.02	0.17±0.01	0.10±0.00	0.52±0.03	0.13±0.00	0.41±0.01
VEN-BVS-R1	11.90±0.24	0.14±0.00	0.09±0.01	1.20±0.01	0.15±0.00	0.39±0.00
POS-BRB-TD	19.33±0.24	0.23±0.01	0.15±0.01	2.90±0.24	0.14±0.00	0.42±0.10
POS-BRB-TA	32.53±0.42	0.13±0.01	0.11±0.01	1.34±0.24	0.13±0.00	0.44±0.10
\bar{x}	14.24	0.15	0.11	1.32	0.14	0.40
% RSD	73.90	28.12	19.07	64.45	8.45	8.54

Por el contrario, al observar los resultados de CS₂ reportados en la Tabla 12, se puede ver un aumento estadísticamente significativo ($p = 2.72 \times 10^{-6}$) entre el punto inicial y final del experimento. Es importante mencionar que al comparar los valores de CS₂ libre y

combinado se observa una inconsistente diferencia, siendo que los valores más altos aparecen en la fracción libre.

Al analizar los resultados de la Tabla 13 correspondientes a los azufrados BR, se vieron diferencias muy marcadas entre muestras. Fue la primera vez que se observó esto en el presente estudio. 3 muestras aumentaron su concentración y 3 disminuyeron. Los vinos PRE-BRB-GM, VEN-BI-GF y VEN-BVS-R1 experimentaron una disminución de H₂S tras la incubación en anoxia. Esto se debe a una reacción de oxidación de los polifenoles del vino, catalizada por el Fe³⁺. Los grupos catecol o pirogalol forman quinonas que reaccionan con los grupos tioles (moléculas nucleófilas) a través de la adición de Michael.

En la tabla 13 se puede observar también que las muestras PRE-BRB-TL, POS-BRB-TD y POS-BRB-TA tuvieron un aumento significativo de 20.33, 52.52 y 64.79 µg/L de H₂S BR respectivamente. Este aumento es atribuido a la presencia de cisteína y glutatión, y además a que posiblemente las FFAs tenían menos quinonas que reaccionen.

Tabla 13. Azufrados BR en muestras de menor potencial dopadas con 70 µg/L de H₂S

FFA	Punto Inicial		Mes y Medio	
	H ₂ S (µg/L)	CS ₂ (µg/L)	H ₂ S (µg/L)	CS ₂ (µg/L)
PRE-BRB-TL	56.56±1.94	0.10±0.00	76.89±7.24	<LD
PRE-BRB-GM	59.09±0.21	0.12±0.01	44.62±2.16	<LD
VEN-BI-GF	71.59±3.53	0.10±0.01	42.89±0.75	<LD
VEN-BVS-R1	62.51±0.48	0.15±0.00	44.54±3.52	<LD
POS-BRB-TD	46.58±1.47	0.11±0.01	99.10±6.19	<LD
POS-BRB-TA	43.98±0.23	0.12±0.01	108.77±6.73	<LD
\bar{x}	56.72	0.12	69.47	
% RSD	18.0726	15.9835	42.81	

Por otro lado los valores de CS₂ de la fracción BR reportados en la Tabla 13, no permiten visualizar diferencias, pues en todas las muestras analizadas tras la incubación durante 1.5 meses, la concentración de CS₂ fue inferior al límite de detección. Esto como se mencionó es algo inquietante, pues los valores de este compuesto en la fracción libre son mayores que en la BR, y deberían ser similares. Cabe mencionar que, tanto en la fracción

libre como BR, la concentración de CS₂ se encuentra muy por debajo del umbral de percepción (ver Tabla 1), por lo tanto no tiene importancia sensorial.

En la Tabla 14 se reportan los valores de IPT tras la incubación en anoxia, mismos que al compararlos con el punto inicial del experimento no indican diferencias significativas ($p = 0.29$). También se compararon estos resultados con el control, donde tampoco se evidenció una variación significativa ($p = 0.19$). El color por el contrario, si experimentó una disminución estadísticamente significativa ($p = 0.001$), de una media de 13.21 a 11.42. Esta disminución es atribuida a la susceptibilidad del vino al calor aplicado durante la experimentación (35 °C).

El potencial redox por otro lado, ha disminuido significativamente ($p = 0.007$). Sin embargo, esta disminución es considerablemente menor que la que se observó en el primer experimento con H₂S, lo cual evidentemente se debe a que para la segunda incubación, los valores de potencial redox eran bajos ya, pues habían estado en reducción acelerada (50 °C) durante 2 semanas. Esto explica la diferencia de comportamientos entre un experimento y otro, donde se observa claramente que al partir de potenciales altos, el aumento de sulfhídrico se dispara tras la incubación.

Tabla 14. Potencial Redox, IPT e Intensidad de color en muestras de menor potencial dopadas con 70 µg/L de H₂S

FFA	POTENCIAL REDOX (mV)			IPT (I280)		Intensidad de color	
	PI	PI dop	1.5M	PI	1.5M	PI	1.5M
PRE-BRB-TL	-68.10	-78.80	-89.9	43.00	43.6	14.43	12.44
PRE-BRB-GM	-42.50	-64.20	-70.6	36.00	37.9	9.73	8.41
VEN-BI-GF	-80.70	-92.20	-93.2	30.00	30.5	7.02	6.54
VEN-BVS-R1	-79.90	-89.90	-93.8	44.30	44.9	15.61	13.37
POS-BRB-TD	-79.70	-89.50	-97.4	46.20	43.1	17.10	14.67
POS-BRB-TA	-79.00	-82.60	-97.8	46.10	42.3	15.34	13.06
\bar{x}	-71.65	-82.87	-90.45	40.93	40.38	13.21	11.42
% RSD	20.99	12.61	11.23	15.98	13.37	29.78	27.97

Se realizó también un test ANOVA de dos factores, que permitió conocer si la incubación en anoxia durante 1.5 meses tuvo efecto diferente según el vino analizado. Los valores p permitieron corroborar que existen diferencias significativas entre el punto inicial y final del experimento ($p = 2.24 \times 10^{-6}$), entre muestras ($p = 2.77 \times 10^{-6}$) y que además la incubación afecta de forma diferente a las 6 muestras, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 1.51 \times 10^{-9}$). De hecho 3 muestras sufrieron un aumento y otras 3 un descenso del H₂S BR.

También se realizó un análisis de correlaciones de la variación de H₂S tras 1.5 meses de anoxia con parámetros iniciales del contenido fenólico y variaciones de otros compuestos químicos. Lo más interesante de lo encontrado fue:

- Ausencia de correlación con: IPT de muestras control y concentración de antocianos y taninos en uva.
- Correlaciones significativas con:
 - IPT de muestras dopadas con H₂S y bajo potencial redox ($R=0.76$ $p=0.08$).
 - Disminución de H₂S libre tras 1.5 meses de incubación y dos semanas de reducción acelerada ($R=0.74$ $p=0.09$).
 - Consumo de acetaldehído tras incubación en anoxia ($R=0.86$ $p=0.03$).

En el anexo, las gráficas 5, 6 y 7 representan las tres correlaciones significativas encontradas con respecto a la variación de sulfhídrico tras la incubación en anoxia. De nuevo se observa la correlación del consumo de acetaldehído y la variación del contenido de H₂S BR tras la incubación en anoxia, atribuido a la concentración de ARPs en el vino.

7. CONCLUSIONES

Primera.- Las muestras control presentaron una concentración media de H₂S inicial de 0.88 µg/L, valor por debajo del umbral de percepción de ese compuesto en vino (1 µg/L). El compuesto fue detectado únicamente en la fracción BR, es decir, todo el H₂S se encuentra reversiblemente combinado con los metales del vino. Después de 1.5 meses de incubación en anoxia a 35 °C, este valor experimenta un aumento estadísticamente significativo a una concentración promedio de 11.13 µg/L. Por experimental previo realizado en el laboratorio se conoce que los vinos reconstituidos con FFAs no poseen ni sulfuroso ni acetaldehído, por lo que se optó por no realizar control de esas sustancias en los vinos.

Segunda.- Los compuestos carbonílicos, principales aglutinantes de SO₂, no estaban en los vinos sintéticos preparados. Consecuentemente en el punto inicial del análisis, tras doparlos con 80 mg/L de SO₂, entre el 90 y 98% del sulfuroso total se encontraba en su forma libre. Esta fracción libre disminuyó significativamente a porcentajes entre el 22.6 y 90% (21.73 y 71.47 mg/L) a lo largo de la incubación en anoxia formando combinaciones con los polifenoles de la uva. Esta variación se contrastó con el aumento de la concentración media de SO₂ combinado de 35.53 a 79.26 mg/L. El descenso del sulfuroso total tras el mes y medio de incubación (entre el 24 y 67%) fue estadísticamente significativo y diferente entre muestras, se correlaciona además con parámetros espectrofotométricos iniciales como IPT e IC del control y absorbancia a 280 y 520 nm del extracto de la uva de partida.

Tercera.- El sulfuroso activo presentó una mayor diferencia con respecto al libre en el punto inicial del análisis, tras dopar con 80 mg/L de SO₂. Es decir, las combinaciones que se rompen por efecto del pH ácido del método Rankine estuvieron en mayor proporción al inicio y disminuyeron tras la incubación en anoxia a 35 °C. Las mayores diferencias entre el SO₂ activo y libre estuvieron en el vino POS-BRB-GB en el punto inicial del experimento, correspondiendo solamente el 27.57 % de la fracción libre de esa muestra a sulfuroso activo. El vino PRE-BVV-GF no tuvo uniones susceptibles al pH como parte de la fracción libre, pues su valor coincidió con el sulfuroso activo.

Cuarta.- Tras el dopado de los vinos sintéticos con 50 mg/L de acetaldehído, la concentración de acetaldehído disminuyó entre 0 y 15.82 mg/L tras la incubación en anoxia, atribuyendo este descenso a la presencia de ARPs. Las muestras de la variedad garnacha fueron las que menos acetaldehído consumieron en anoxia. La muestra VEN-BVS-R1 destacó por un consumo de 14.83 mg/L de acetaldehído. La variación de acetaldehído mostró una correlación con el IMF de las uvas de partida y con la variación de H₂S tras la primera incubación.

Quinta.- Los potenciales redox iniciales de los vinos reconstituidos oscilaron entre 123 y 139.40 mV, esto provocó que la mayor parte de H₂S adicionado en la primera incubación se dimerizase u oxidase, de tal manera que los valores iniciales tras el dopado fueron significativamente menores de 70 µg/L, tanto en el análisis de libres como BR. Estos valores aumentaron consecuentemente tras el mes y medio de incubación en anoxia a concentraciones entre 35.71 y 100.31 µg/L como formas BR, debido al descenso del potencial y en algún caso por el rol de la cisteína y glutatión adicionado como especies precursoras.

Sexta.- Se consideró conveniente repetir el experimento con sulfhídrico partiendo de potenciales más bajos, conseguidos al someter las muestras a una reducción acelerada durante dos semanas. Los resultados iniciales obtenidos tras dopar con 70 µg/L de H₂S confirmaron que el potencial redox es determinante para evaluar la reactividad de este compuesto en el vino. Estos resultados oscilaron entre 43.78 y 71.59 µg/L de H₂S BR. Fue la primera vez que se observaron comportamientos con diferencias tan marcadas en el presente estudio tras anoxia: 3 muestras aumentaron su concentración y 3 disminuyeron. Los vinos PRE-BRB-GM, VEN-BI-GM y VEN-BVS-R1 experimentaron una disminución de 14.47, 28.70 y 17.97 µg/L respectivamente. Las muestras PRE-BRB-TL, POS-BRB-TD y POS-BRB-TA tuvieron un aumento significativo de 20.33, 52.52 y 64.79 µg/L respectivamente, atribuido a la presencia de cisteína y glutatión.

Séptima.- El IPT experimentó una disminución estadísticamente significativa al añadir sulfuroso y acetaldehído, pero no al fortificar con sulfhídrico. Al analizar este parámetro tras haber transcurrido el periodo de incubación en anoxia a 35 °C, el IPT no se modifica de manera general, sin embargo, aumenta de forma significativa en las muestras dopadas con SO₂ y H₂S (1ª incubación).

Octava.- El color experimenta disminuciones estadísticamente significativas al compararlo con el control en todos los experimentos a excepción de las muestras fortificadas con acetaldehído. Tras la incubación se presentaron comportamientos distintos en cada experimento. El sulfuroso ralentizó los procesos de polimerización de los polifenoles en el vino durante el envejecimiento, por lo que se evidenció un aumento significativo en el color tras la incubación. El acetaldehído provocó una disminución estadísticamente significativa en el color tras la anoxia. Finalmente el dopado con H₂S, provocó una disminución estadísticamente significativa tras la anoxia, la cual fue mayor en las muestras que se fortificaron partiendo de potenciales redox menores (2^a incubación).

Novena.- Durante el análisis de azufrados libres y BR se detectaron otros compuestos diferentes al sulfhídrico, estos fueron CS₂ y MeSH, sin embargo sus concentraciones fueron muy bajas. En el caso del MeSH, la mayoría se encontraron por debajo del límite de cuantificación, mientras que las concentraciones de CS₂ encontradas en los vinos fueron muy inferiores al umbral de percepción de este compuesto en el vino, sin representar un importancia sensorial.

Décima.- Las variaciones de potencial que tienen lugar en la incubación en anoxia, tanto en las muestras control como en las dopadas con H₂S están correlacionadas con el IPT y la intensidad de color, que experimentó cambios significativos en todos los experimentos, ya sea al añadir las sustancias empleadas para fortificar las muestras, o tras haber transcurrido el proceso de incubación en anoxia a 35 °C.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arapitsas, P., Ugliano, M., Perenzoni, D., Angeli, A., Pangrazzi, P. y Mattivi, F. Wine metabolomics reveals new sulfonated products in bottled White wines, promoted by small amounts of oxygen. *Journal of Chromatography Analysis*. 1429 (9): 155-165, 2016.
- Bakker, J. y Timberlake, C.F. The mechanism of color changes in ageing port wine. *American Journal of Enology*. 37 (1): 288- 292, 2006.
- Belajova, E. Determination of selected wine phenolic constituents as possible markers for differentiation of wines. *Journal of Food and Nutrition Research*. 51(2): 117-122, 2012.
- Boggia, R., Casolino, M.C., Hysenaj, V., Oliveri, P., y Zunin, P. A screening method based on UV–Visible Spectroscopy and multivariate analysis to assess addition of filler juices and water to pomegranate juices. *Food Chemistry*. 140 (4): 735-741, 2013.
- Bridle, P. y Timberlake, C. Anthocyanins as natural food colors-selected aspects. *Food Chemistry*. 58 (2): 103-109, 2006.
- Bueno, M., Marrufo, A., Carrascón, V., Fernández, P., Escudero, A. y Ferreira, V. Formation and accumulation of acetaldehyde and Strecker acetaldehydes during red wine oxidation. *Frontiers in Chemistry*. 6 (20): 1-19, 2018.
- Cáceres, J. y Lizárraga, J. Elaboración de mistela a partir de zumo y mosto de manzana variedades fuji (*malus domestica*), royal (*malus domestica royal gala*) y delicia (*malus domestica red delicius*)". Tesis de grado. Universidad Católica de Santa María. Arequipa, Perú. 2016.
- Cacho, J. Vitivinicultura en el Cono Sur: Un universo de particularidades. *ACE, Revista de Enología*. 66 (2): 69-73, 2012.
- Carrascón, V., Vallverdú, A., Meudec, E., Sommerer, N., Fernández, P. y Ferreira V. The kinetics of oxygen and SO₂ consumption by red wines. What do they tell about oxidation mechanisms and changes in wine composition. *Food Chemistry*. 241 (1): 206-214, 2018.
- Clark, A., Grant, P., Cleghorn, N. y Scollary, G. Copper(II) addition to white wines containing hydrogen sulfide: Residual copper concentration and activity. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 21 (1): 30–39, 2015.
- Concejero, B. (2015). Análisis de precursores glicosídicos, cisténicos y glutatiónicos para determinar la potencialidad aromática de la uva (Tesis Doctoral). Universidad de Zaragoza. Zaragoza, España.
- Cotea, V.V., Luchian, C.E., Bilba, N. y Niculaua, M. Mesoporous silica SBA-15, a new adsorbent for bioactive polyphenols from red wine. *Analytical Chemistry Acta*. 732 (2): 180-185, 2012.

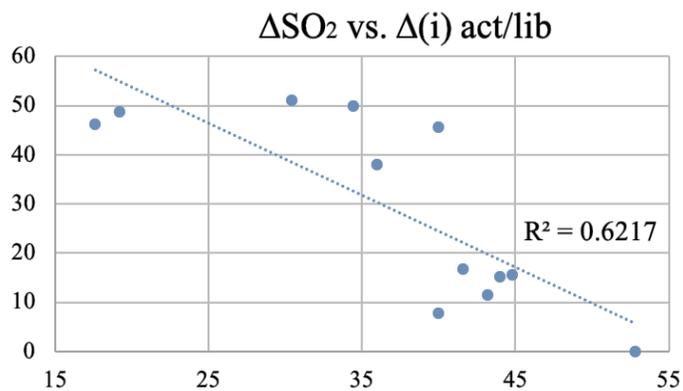
- Culleré, L., López, R. y Ferreira, V. The Instrumental Analysis of Aroma-Active Compounds for Explaining the Flavor of Red Wines. *Red Wine Technology*. 1 (20): 283-307, 2019.
- Danilewicz, J., Seccombe, J. y Whelan, J. Mechanism of interaction of polyphenols, oxygen and sulfur dioxide in model wine and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 59 (2): 128-136, 2008.
- Danilewicz, J. Reaction of Oxygen and Sulfite in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*. 67 (1): 13-17, 2016.
- Del Álamo, M., Nevares, I., Cárcel, L., Gallego, L. y Crespo R. Evolución del potencial redox durante el envejecimiento de vinos en sistemas alternativos y en barricas. *Acenología: Revista de Enología Científica y Profesional*. 10 (4): 12-18, 2013.
- Díaz-García, M., Obón, J., Castellar, M., Collado, J. y Alacid, M. Quantification of total individual polyphenols in fruit juices by UHPLC. *Food Chemistry*. 138 (3): 938-949, 2013.
- Fernández, G. *Química Orgánica: Formación de hidrazonas*. 1ª ed. Oviedo: CFGS Producción editorial, 2014. 174 p.
- Ferreira, V., Franco, E., Vela, E., López, R. y Fernández, P. Elusive Chemistry of Hydrogen Sulfide and Mercaptans in Wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 66 (1): 2237-2246, 2018.
- Floch, M., Shinkaruk, S., Darriet, P. y Pons, A. Identification and organoleptic contribution of vanillylthiol in wines. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 64 (6): 1318-1325, 2016.
- Flanzy, C. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*. 1ª ed. Madrid: AMV ediciones, 2003. 396-399 p.
- Franco-Luesma, E. y Ferreira, V. Reductive off-odors in wines: Formation and release of H₂S and methanethiol during the accelerated anoxic storage of wines. *Food Chemistry*. 199 (1): 42-50, 2016.
- García, E. Itinerario para la elaboración de vino sin sulfuroso. *Comunidad de innovación y nuevas tecnologías en viticultura y elaboración de vino*. Castilla - La Mancha, España. 2015.
- Gómez, A. Efecto de la Microoxigenación, la crianza sobre lías y la adición de preparados de levadura seca inactiva, en la composición polifenólica de los vinos tintos de Bobal. Valencia, España. 2015.
- Gómez E. Fundamentos de la microoxigenación de vinos tintos: factores influyentes y aplicaciones. *Acenología: Revista de Enología Científica y Profesional*. 25 (2): 17-25, 2016.
- Guerrero, R., Cantos, E., Puertas, B. y Ortiz, V. Sulfuroso en la Elaboración de Vinos. Alternativas. *Tecnología Postcosecha e Industria Agroalimentaria*. 16 (1): 1-23, 2015

- Guillamón, J. y Beltrán, G. Compuestos Azufrados Volátiles en vino. *Agrovin: Fundación para la cultura del vino*. 3 (2): 31-35, 2009.
- Guomin, H., Wang, H., Webb, R. y Waterhouse. A rapid, one step preparation for measuring selected free plus SO₂-bound wine carbonyls by HPLC-DAD/MS. *Talanta*. 134 (1): 596-602, 2015.
- Gürbüz, O., Göçmen, D., Dagdelen, F., Gürsoy, M., Aydın, S., Şahin, I., Buyukuysal, L. y Usta, M. Determination of flavan-3-ols and transresveratrol in wine using HPLC with fluorescence detection. *Food Chemistry*. 100 (2): 518-525, 2007.
- Halliwell, B. How to characterize an antioxidant: an update. *Biochemical Society Symposia*. 61 (1): 73-101, 1995.
- Jimeno, M., Ordoñez, A. y Suberviola, J. Inoculación y coinoculación de Levaduras No Saccharomyces en la elaboración de vinos blancos, rosados y dulces de Navarra. *Estación de Viticultura y Enología de Navarra*. 1 (1): 1-15, 2010.
- Jinarek, V., Langridge, P. y Henschke, P. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine producing *Saccharomyces-cerevisiae* strains by asimilable nitrogen. *Environmental microbiology*. 61 (2): 461-467, 2009.
- Krietman, G., Danilewicz, J., Jeffery, D. y Elías, R. Reaction mechanisms of metals with hydrogen sulfide and thiols in model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64 (1): 4095-4104, 2016.
- Krietman, G., Danilewicz, J., Jeffery, D. y Elías, R. Reaction mechanisms of metals with hydrogen sulfide and thiols in model wine. Part 2: Iron- and Copper- catalizaed-oxidation *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 64 (1): 4105-4113, 2016.
- Krietman, G., Laurie, V. y Elias, R. Investigation of Ethyl Radical Quenching by Phenolics and Thiols in Model Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 61 (1): 685-692, 2013.
- López, E. Compuestos azufrados volátiles y riesgos de reducción en vinos. *Revista Alimentaria: Artículos técnicos*. 425 (1): 115-120, 2011.
- Lutz, M., Cajas, Y. y Enríquez, C. Phenolics content and antioxidant capacity of Chilean grapes and Cabernet Sauvignon. *CyTA Journal of Food*. 10 (4): 251-257, 2012.
- Marquéz, A., Serratosa, M. y Mérida J. Pyranoanthocyanin derived pigments in wine: structure and formation during winemaking. *Journal of Chemistry*. 28 (1): 155-163, 2013.
- Monforte, A., Martins, S. y Silva, A. Strecker aldehyde formation in wine: new insights into the role of gallic acid, glucose, and metals in phenylacetaldehyde formation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 102 (1): 264-274, 2017.

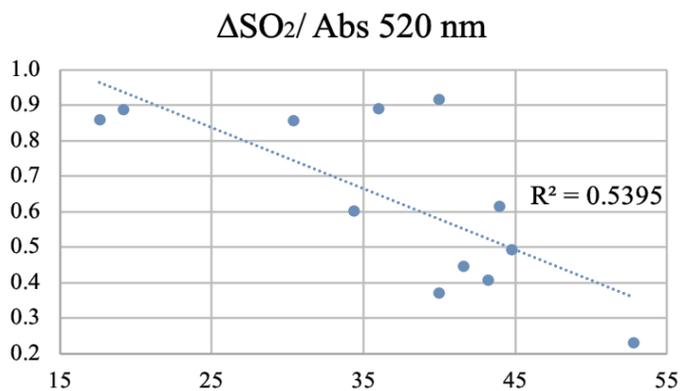
- Mulero, J., Pardo, F. y Zafrilla, P. Antioxidant activity and phenolic compounds in conventional and organic red grapes (var. Monastrell). *CyTA Journal of Food*. 8 (3): 185-191, 2013.
- Ontañón, I., Vela, E., Hernández, P. y Ferreira, V. Gas chromatographic-sulfur chemiluminescent detector procedures for the simultaneous determination of free forms of volatile sulfur compounds including sulfur dioxide and for the determination of their metal-complexed forms. *Journal of Chromatography Analysis*. 1596 (1): 152-160, 2019.
- Organización Internacional del Vino. *Compendio de los métodos internacionales de análisis de vinos y mostos*. 13 (2). Paris, Francia. 2018.
- Peynaud, E. *Enología Práctica: conocimiento y elaboración del vino*. 3ª ed. Madrid: Ed. Mundi-Prensa S.A., 1996. 31, 269,270 p.
- Rankine, B.C.; Pocock, K.F. Alkalimetric determination of sulfur dioxide in wine. *Wine Brewery Spirit Review*. 88 (8): 40-44, 1970.
- Real Academia Española. *Diccionario de la Real Academia Española (23ª edición)*. Madrid, España, 2018.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. y Dubourdieu, D. *Handbook of Enology: The Chemistry of wine stabilization and treatments*. 2ª ed. New York: John Wiley & Sons. 2006. 505-516 p.
- San Juan, F., Cacho, J., Ferreira y Escudero, A. Aroma Chemical composition of red wines from different price categories and its relationship to quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 60 (1): 5045-5056.
- Sirajuddin, M., Ali, S. y Badshah, A. Drug–DNA interactions and their study by UV–Visible, Fluorescence Spectroscopies and Cyclic Voltammetry. *Journal of Photochemistry and Photobiology*. 124 (1): 1-19, 2013.
- Skoog, D., Crouch, S. y Holler, F. *Principios de análisis instrumental*. 5ª ed. Madrid: McGraw Hill, 2008. 536-553 p.
- Stalikas, C. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*. 30 (18): 3268-3295, 2007.
- Vilanova, M., Campo, E., Escudero, A., Grana, M., Masa, A. y Cacho, J. Volatile composition of *Vitis vinifera* from North West Spain: Correlation between sensory and instrumental analysis. *Analytical Chemistry Acta*. 720 (2): 104-111, 2011.
- Zironi, R., Comuzzo, P., Tat, L. y Scobioala, S. Oxígeno y vino. *Internet Journal of Viticulture and Enology*. 10 (2): 1-5, 2009.

9. ANEXO

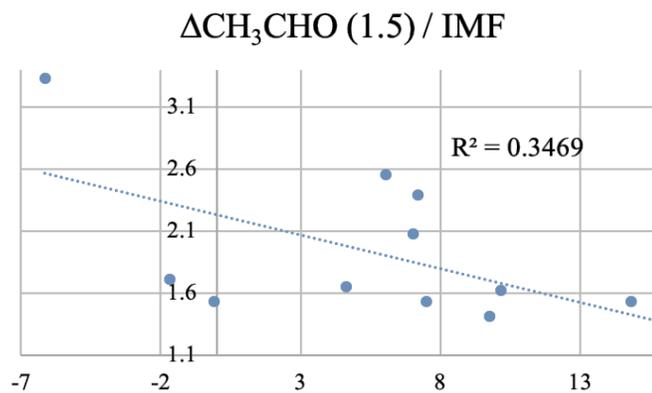
Gráfica 1. Correlación entre el consumo sulfuroso tras la incubación y la diferencia entre el SO₂ activo y libre en el punto inicial



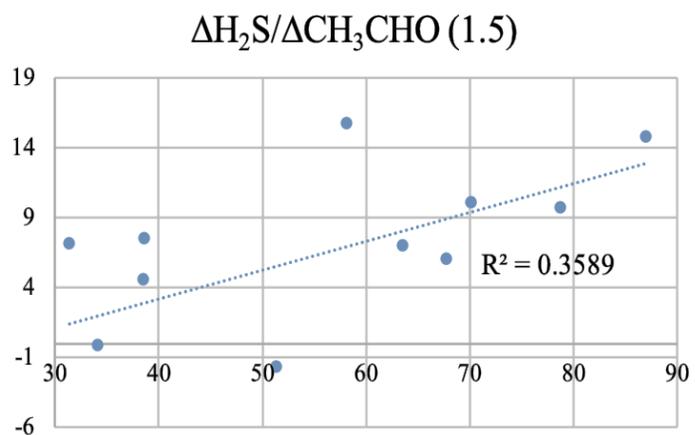
Gráfica 2. Correlación entre el consumo SO₂ total en anoxia y la absorbancia a 520 nm del extracto de las uvas de partida.



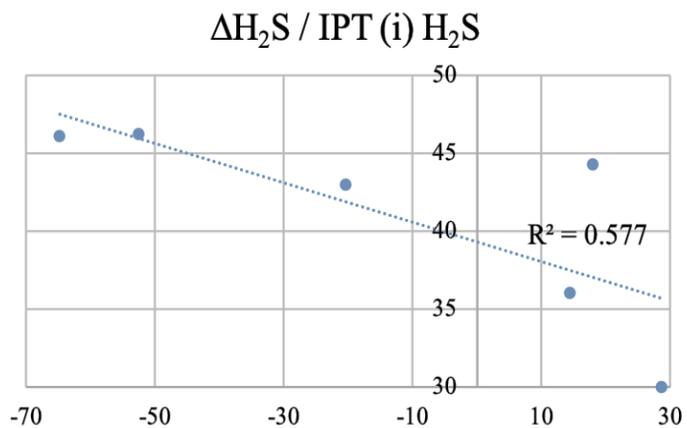
Gráfica 3. Correlación entre el consumo de acetaldehído tras la incubación e IMF de las uvas de partida.



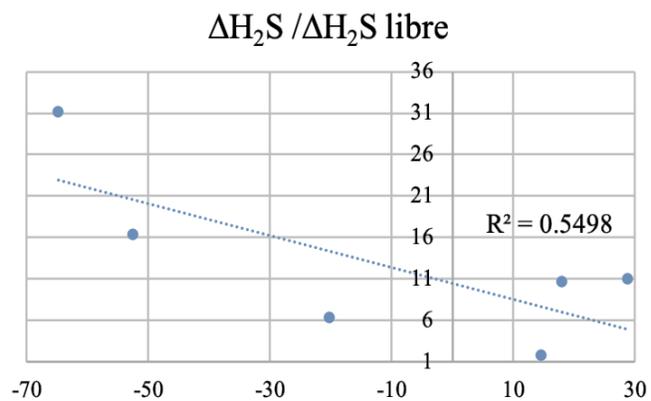
Gráfica 4. Correlación entre el consumo de CH₃CHO en anoxia y el aumento de H₂S tras la incubación en anoxia (1ª incubación).



Gráfica 5. Correlación entre la variación de H₂S e IPT en el punto inicial (2ª incubación).



Gráfica 6. Correlación entre la variación de H₂S y disminución de la fracción libre (2^a incubación).



Gráfica 7. Correlación entre la variación de H₂S BR (2^a incubación) y el consumo de °CH₃CHO.

