

Evaluación de la sensibilidad de los vinos a la oxidación mediante una prueba de resistencia al aire por voltametría: la capacidad de los compuestos fenólicos para formar complejos con iones Fe(II) y Fe(III) podría explicar la longevidad de los vinos.

C Pascal¹, N Champeau¹, E Charpentier¹, E Brenon¹, JB Diéval¹, S Vidal¹, M Moutounet²

¹ Vinventions, equipo de enología, Francia

² Consultor autónomo, Montpellier, Francia

Uno de los grandes retos del enólogo es evaluar la capacidad de resistencia de un vino a la aparición de signos de oxidación, con el fin de adaptar el trayecto del perfil final del vino y la duración de vida.

En la práctica, los signos de oxidación del vino se describen como un cambio de color con aparición de matices anaranjados, un cambio aromático descrito como una pérdida de notas varietales (boj, fruta de la pasión) y/o la aparición de, las llamadas notas oxidativas, (miel, cera, chocolate, hueso, frutos secos, hierba seca, frutos secos, etc.), y a veces un cambio en el equilibrio gustativo con un aumento de la astringencia y/o pérdida de grasa. Estos diferentes signos de oxidación pueden aparecer sucesiva o simultáneamente, sin que la aparición de uno de ellos sea indicativa de la posible aparición de otro.

El momento en que un vino se considera oxidado, depende de la aceptación de estas características en relación con el tipo de producto y la intención del enólogo. Por ejemplo, es aceptable, incluso deseable, que haya notas de frutos secos en los vinos dulces naturales, pero no en los vinos secos de Sauvignon Blanc de determinadas denominaciones, que deben conservar notas de cítricos o frutas exóticas.

Evaluar la capacidad de un vino para resistir la oxidación es como realizar una prueba predictiva para determinar su capacidad de envejecimiento y longevidad, siempre que se almacene en las buenas condiciones.

En el vino, un cierto número de moléculas son conocidas por sus capacidades antioxidantes, por ejemplo los compuestos fenólicos, o los antioxidantes añadidos durante el proceso, como los sulfitos. Por ello, la evaluación de la concentración de antioxidantes se ha considerado una forma de predecir la longevidad de un vino. Esto puede evaluarse mediante diversos métodos, que generalmente consisten en evaluar la capacidad de un vino para atraer radicales, para reaccionar con diferentes tipos de oxidantes (ensayo DPPH, ABTS, FRAP, análisis Folin Ciocalteu), o para oxidarse en electrodos de un tipo determinado (voltametría). Se ha demostrado que el contenido antioxidante

de un vino está altamente correlacionado con la concentración de compuestos fenólicos (Büyüktuncel *et al.* 2014; Romanet *et al.* 2019; de Beer *et al.* 2004, 2006; Kilmartin 2001).

Varios estudios han demostrado que la concentración de antioxidantes disminuye a medida que los vinos se oxidan (Rodrigues *et al.* 2007, Ugliano 2013 y 2019). En general, los vinos de guarda, contienen menos antioxidantes que los jóvenes (Rodrigues *et al.* 2007), pero la variabilidad de las añadas y de los procesos de vinificación (en particular, la fase de extracción de compuestos fenólicos) hace que la edad de un vino no pueda determinarse a partir de su concentración de antioxidantes (Romanet *et al.* 2019). Por último, el bajo contenido en antioxidantes de un vino se ha correlacionado con la presencia en los perfiles sensoriales de notas asociadas a la evolución oxidativa de los vinos (Romanet *et al.* 2019). Sin embargo, estos estudios no demuestran que el contenido de antioxidantes sea predictivo de la capacidad de un vino para resistir la oxidación.

Para establecer un vínculo con las prácticas enológicas, si el contenido intrínseco de compuestos fenólicos (los principales contribuyentes al contenido antioxidante) fuera un indicador de la capacidad de un vino para resistir la aparición de notas oxidativas, los enólogos utilizarían para ello el índice de Folin o incluso el índice de polifenoles totales. Sin embargo, actualmente los enólogos evalúan esta capacidad empíricamente mediante la cata, antes y después del contacto con el aire (prueba de resistencia al aire). Se evalúan los cambios en el perfil sensorial del vino, en particular la aparición de notas oxidativas.

Este artículo presenta el desarrollo de un método para determinar la sensibilidad de los vinos a la oxidación. Las muestras de vino fueron seleccionadas empíricamente por los enólogos y sometidas a una prueba de resistencia al aire, controlada por voltametría de barrido lineal. Se observó una evolución diferente de la señal voltamétrica para los vinos clasificados empíricamente como resistentes a la oxidación y sensibles a la oxidación. Por último, se registró la señal voltamétrica de la catequina en solución hidroalcohólica en presencia y ausencia de iones Fe(II) y Fe(III) en atmósfera inerte, lo que nos permitió plantear hipótesis sobre la implicación de complejos compuestos fenólicos-ión Fe(II) o Fe(III) en los registros obtenidos y los mecanismos subyacentes a este ensayo.

Materiales y métodos

134 muestras de vino (87 tintos, 32 blancos y 15 rosados de diferentes regiones francesas y españolas) fueron seleccionadas al final de la fermentación alcohólica o maloláctica por enólogos experimentados (maestros de bodega o asesores con varios años de experiencia en la zona de producción en cuestión y que suelen incluir la micro-oxigenación en algunos de sus métodos). Para cada muestra, el enólogo evaluó empíricamente mediante cata, el riesgo de oxidación precoz del vino, clasificándolo como resistente o sensible a la oxidación. Las muestras de vino se tomaron de botellas inertizadas de 750 ml, llenas hasta rebosar y tapadas con rosca. Estos vinos se sometieron a una prueba de resistencia al aire tomando 50 mL de muestra con una pipeta volumétrica y colocándola en una botella de 125 mL. Se realizaron mediciones por voltametría de barrido lineal (0-600 mV, 100 mV/s, pasos de 10 mV) al abrir la botella de muestra y después de 2 horas, utilizando un potenciometro (WQS Polyscan, Vinventions), en electrodos (electrodo de trabajo de carbono, Vinventions). Los potenciales se expresan en relación con un electrodo de referencia Ag/AgCl.



Se prepararon soluciones de catequina (1150,0 mg/L y 1165,0 mg/L), sulfato de hierro (10,3 mg/L) y cloruro de hierro (10,7 mg/L) en etanol al 13%, que contenían 4,0 g/L de ácido tartárico y se ajustaron a pH 3,3 con HCl 1N y 0,1N. Estas soluciones madre se desoxigenaron por burbujeo de nitrógeno y se colocaron en una vitrina inertizada por lavado de nitrógeno. El % de O₂ en la vitrina del laboratorio, se controló con un Nomasense O₂ P300 (Vinventions) y se mantuvo por debajo del 2% durante toda la prueba. Las curvas corriente-potencial de las soluciones de control recién preparadas y de la mezcla 50/50 v/v de catequina/ión Fe se registraron por triplicado como se ha descrito previamente utilizando voltametría de barrido lineal.

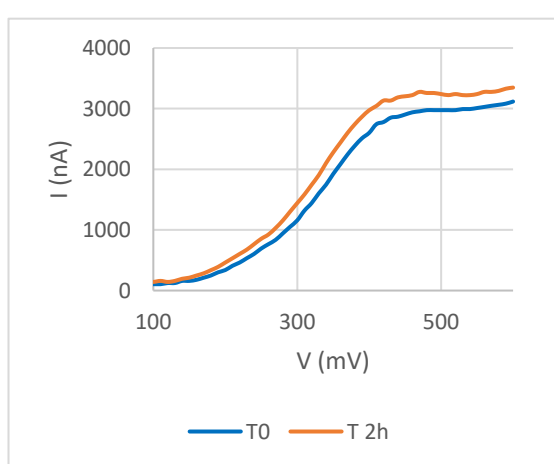
Resultados

Observación de los cambios en las señales voltamétricas durante las pruebas de resistencia al aire:

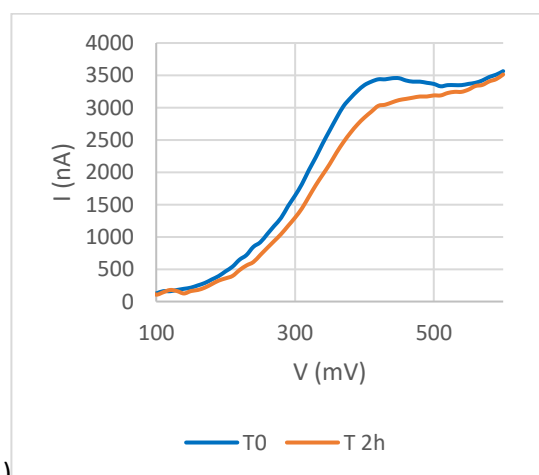
Empíricamente, los enólogos sólo realizan la prueba de resistencia al aire en muestras que no hayan estado en contacto con el oxígeno en los días anteriores. Para acercarnos más a estas condiciones, las pruebas de resistencia al aire sólo se realizaron aquí en muestras que se habían conservado durante 3 semanas antes de la medición en ausencia de O₂. El 58% de las muestras seleccionadas por los enólogos se clasificaron empíricamente como resistentes a la oxidación.

La comparación de las curvas intensidad/potencial obtenidas en un vino inmediatamente después de abrir la botella de muestra y las obtenidas tras 2 horas de contacto con el aire reveló varios cambios en las señales.

En 47 de los 134 vinos se observó un aumento significativo de la intensidad (superior al 5%, la incertidumbre de medición del método) en el intervalo 100-600 mV cuando se midió tras 2 horas de contacto con el aire (Figura 1 (a)). Las 47 muestras de este grupo habían sido caracterizadas como resistentes a la oxidación por los enólogos. Ninguna de las muestras "sensibles a la oxidación" mostró este comportamiento.



(a1)



(b1)

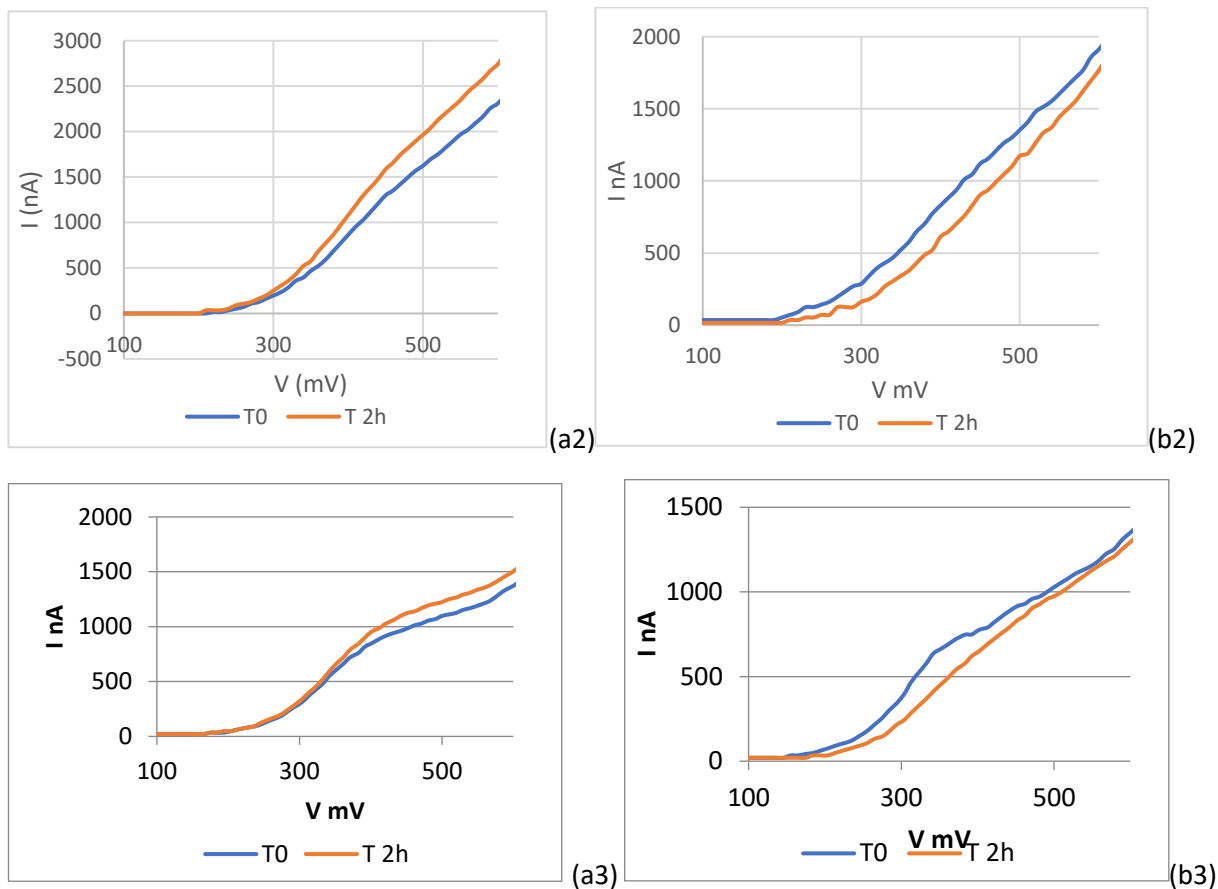


Figura 1: Curvas de intensidad/potencial de un vino, medidas cuando la muestra se pone en contacto con el aire (T0) y después de 2 horas de contacto. (a) muestras descritas como resistentes a la oxidación por los enólogos (b) muestras descritas como sensibles a la oxidación por los enólogos. (a1) y (b1): vinos tintos. (a2) y (b2): vinos rosados. (a3) y (b3): vinos blancos.

Por el contrario, en 38 de las 147 muestras se observó una disminución significativa de la intensidad (superior al 5%, la incertidumbre de medida del método) en el intervalo 100-600 mV cuando se midió tras 2 horas de contacto con el aire (Figura 1 (b)). Estos 38 vinos habían sido caracterizados como sensibles a la oxidación por los enólogos. Ninguna de las muestras caracterizadas como "resistentes a la oxidación" mostró este comportamiento.

Para los 49 vinos restantes, la variación de intensidad entre la medición inicial y la registrada tras 2 horas de contacto con el aire, no fue significativa. Estos vinos podrían tener potencialmente un comportamiento de oxidación menos marcado que las 2 categorías descritas anteriormente, haciendo que la prueba fuera insensible a su discriminación. Además, en la categorización de los enólogos, no se solicitó ninguna escala de intensidad de resistencia o sensibilidad a la oxidación, por lo que no se pudo distinguir esta categoría de vino, calificada posteriormente de "intermedia".

La prueba parece ser capaz de clasificar los vinos:



- Las que muestran un aumento de la señal entre la medición inicial y la realizada tras 2 horas de contacto con el aire, parecen ser sistemáticamente resistentes a la oxidación,
- Los que muestran una caída de la señal entre estas dos mediciones, parecen ser sistemáticamente sensibles a la oxidación.

Impacto de la complejación de iones Fe(II) y Fe(III) por compuestos fenólicos en la señal voltamétrica

En un intento de explicar el mecanismo químico subyacente a la prueba, se llevaron a cabo trabajos adicionales en una solución modelo, en un medio inerte. A título informativo, se ha demostrado (Kilmartin *et al.* 2002, Ugliano *et al.* 2019) que la voltametría de electrodos de carbono puede utilizarse para analizar compuestos fenólicos.

También se ha sugerido que el mecanismo de oxidación en los vinos (Figura 2) está sustentado por el ciclo redox del par Fe(II)/Fe(III) (Ribereau Gayon 1931, Danilewicz 2018, du Toit *et al.* 2006, Waterhouse y Laurie 2006).

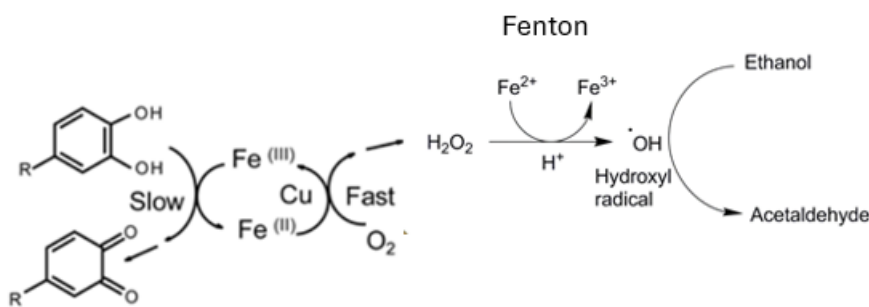


Figura 2: Mecanismo de oxidación del vino, adaptado de Danilewicz (2007)

Además, se sabe que estos mismos iones Fe(II) y Fe(III) forman complejos con compuestos fenólicos, en particular estructuras con un anillo B di- o tri-hidroxilado (Amorim Porfirio *et al.* 2014).²⁺²⁺ Recientemente, varios estudios (Le Nest *et al.* 2004, Amorim Porfirio *et al.* 2014) han puesto de relieve que los complejos entre compuestos fenólicos y ciertos iones metálicos (Zn, Fe) pueden presentar curvas de intensidad/potencial diferentes de la del compuesto fenólico en ausencia de iones metálicos. La señal del complejo es frecuentemente más alta. En estos estudios se examinaron varios compuestos fenólicos modelo (morina, quercetina, fisetina, catequina, crisina, taxifolina, etc.) mostrando diferentes impactos de la complejación en sus respectivas señales voltamétricas. Sin embargo, estos estudios se realizaron a pH neutro para reproducir las condiciones fisiológicas, y no muestran la señal del complejo compuesto fenólico-Fe(III). Dado que el vino tiene un pH ácido y que se sabe que los ácidos orgánicos, en particular el ácido tartárico, forman complejos de iones Fe(II) y Fe(III), la señal voltamétrica de la catequina, elegida como compuesto fenólico modelo para este estudio, se registró en una solución modelo de vino (solución hidroalcohólica al 13%, 4 g/L de ácido tartárico, pH 3.5) antes y después de la adición independiente de iones Fe(II) y Fe(III), en



atmósfera inerte para evitar la puesta en marcha del mecanismo de oxidación (realizado en una vitrina inertizada por barrido continuo de nitrógeno, soluciones desoxigenadas previamente). La adición independiente de iones Fe(II) y Fe(III) a la solución de catequina produjo cambios en la curva de intensidad de potencial registrada para la catequina sola (Figura 3), sugiriendo que la complejación catequina - iones Fe(II) y Fe(III) había tenido lugar efectivamente en las condiciones del vino modelo y tenía un impacto en la señal voltamétrica. Se observó que la señal voltamétrica del complejo catequina - Fe(II) era próxima a la de la catequina (Figura 3 (b)), como observaron Porfirio et al (2014), o incluso ligeramente inferior entre 450 y 500 mV. Por el contrario, la señal del complejo catequina - Fe(III) fue significativamente mayor que la de la catequina sola entre 450 y 600 mV (Figura 3 (a)).

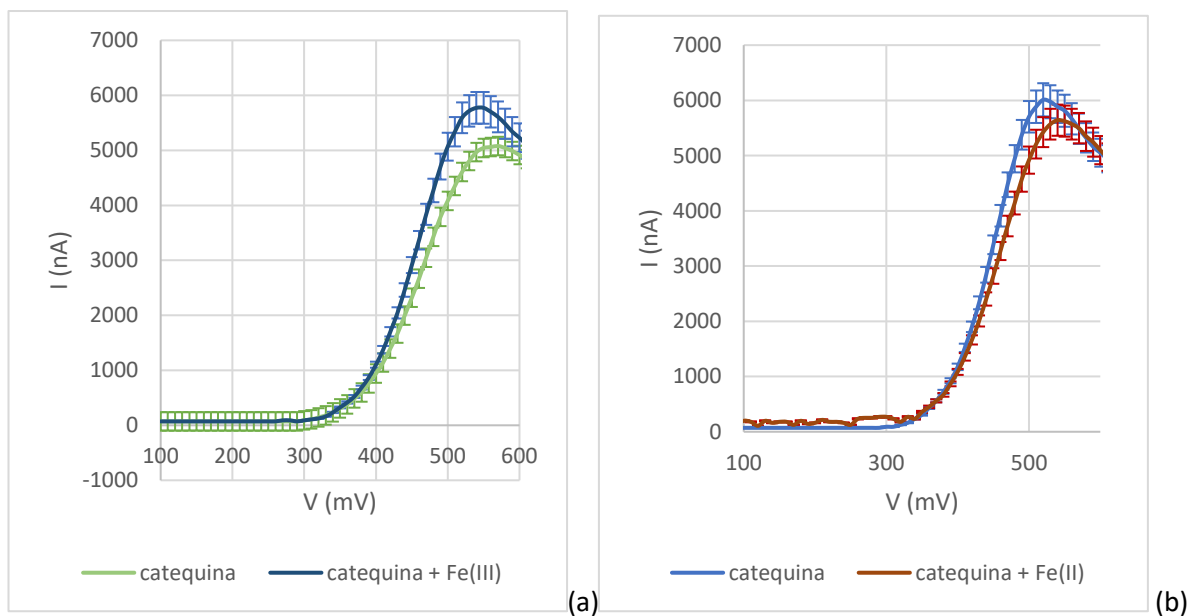


Figura 3: Curvas de intensidad de potencial para : (a) catequina (1150mg/L, solución hidroalcohólica al 13%, pH 3.3, 4g/L de ácido tartárico) en ausencia o presencia de iones Fe(III) (5 mg/L) (b) catequina (1165mg/L, solución hidroalcohólica al 13%, pH 3.3, 4g/L de ácido tartárico) en ausencia o presencia de iones Fe(II) (5 mg/L)

La complejación de los iones Fe(II) los hace menos disponibles para participar en la reacción de Fenton.

En consecuencia, se propusieron las siguientes hipótesis para explicar la evolución de las curvas intensidad-potencial de un vino determinado tras 2 horas de contacto con el aire.

La primera medición, se realiza inmediatamente después de abrir la muestra, que se ha mantenido durante un mínimo de 3 semanas en condiciones anóxicas tras ser recogida en condiciones inertes. En estas condiciones, los iones de hierro se encuentran a priori principalmente en la forma Fe(II) (Danilewicz, 2016 y 2018, Nguyen & Waterhouse 2019). Por lo tanto, la señal voltamétrica corresponde, a priori, a la de compuestos fenólicos o complejos compuestos fenólicos-Fe(II), en función de la capacidad de los compuestos fenólicos presentes para complejar iones Fe.



Tras 2 h de contacto con el aire, se inició el mecanismo de oxidación (Figura 3), que dio lugar a la oxidación de Fe(II) a Fe(III) y a la reducción de oxígeno a peróxido de hidrógeno (Ribereau Gayon 1931, Danilewicz 2018, du Toit *et al.* 2006, Waterhouse y Laurie 2006). Cuando se observa un aumento de la señal, esto podría atribuirse a la contribución de los complejos de compuestos fenólicos-Fe(III), cuya señal aparece más alta que la de los complejos de compuestos fenólicos-Fe(II), según los registros realizados en soluciones de catequina. Esto significaría que los vinos clasificados como resistentes a la oxidación por esta prueba poseen un grupo de compuestos fenólicos capaces de formar complejos con iones Fe en las condiciones ambientales de estos vinos. El efecto de quelantes metálicos exógenos para estabilizar los vinos frente a la oxidación fue considerado por Kreitman *et al.* (2013) tras un estudio en solución modelo. Además, en un contexto fisiológico, Lopes *et al.* (1999) sugirieron que el ácido tánico limita la oxidación de la 2-desoxirribosa, un componente del ADN, a través de su capacidad para quelar iones Fe, haciendo que los iones Fe(II) no estén disponibles para participar en la reacción de Fenton y, por lo tanto, limitando la formación de radicales HO° hidroxilo. En el caso de los vinos resistentes, podría ser que los iones Fe(II) (Figura 4) permanezcan complejos a la semi-quinona (Perron *et al.* 2009 y 2010), la forma oxidada del compuesto fenólico que ha reducido un ion Fe(III) a un ion Fe(II). El mecanismo no continúa hacia una forma quinona que ha reducido 2 iones Fe(III), y los iones Fe(II) permanecen complejos a los compuestos fenólicos. Perron *et al.* (2010) también sugirieron que la estabilidad del complejo compuesto fenólico-Fe(III) favorecería la auto oxidación del Fe(II) complejo. Los iones Fe(II) podrían así estar menos disponibles para reaccionar con el peróxido de hidrógeno y dar lugar a la reacción de Fenton, lo que explicaría la menor aparición de notas descritas como oxidativas cuando estos vinos están en contacto con el oxígeno.

Por otro lado, cuando la señal del vino disminuyó tras 2 h de contacto con el aire, es probable que el mecanismo de oxidación diera lugar a la formación de quinonas, formas oxidadas de compuestos fenólicos que no pueden contribuir a la señal voltamétrica en la zona de potencial considerada. El conjunto de compuestos fenólicos en las condiciones ambientales de estos vinos no sería capaz de mantener los iones Fe complejos (Figura 4). Los iones Fe(II) podrían, por tanto, reaccionar con el peróxido de hidrógeno para iniciar la reacción de Fenton (Singleton 1987) y dar lugar a radicales de muy alta energía, los radicales HO° hidroxilo que oxidan el etanol a etanal, por ejemplo. Sin ánimo de ser exhaustivos, también se ha previsto que los radicales hidroxilo den lugar a la aparición de pigmentos marrones/amarillos/naranjas ligados a reacciones de condensación de flavan-3-oles (taninos) en presencia de etanal o de ácido pirúvico (Oszmianski 1996, Fulcrand 1996, Guyot 1996) o al ataque de compuestos con funciones alcohólicas que conducen a la formación de los llamados aldehídos de oxidación (metional, fenilacetaldehído) (Nikolantonaki y Waterhouse 2012).

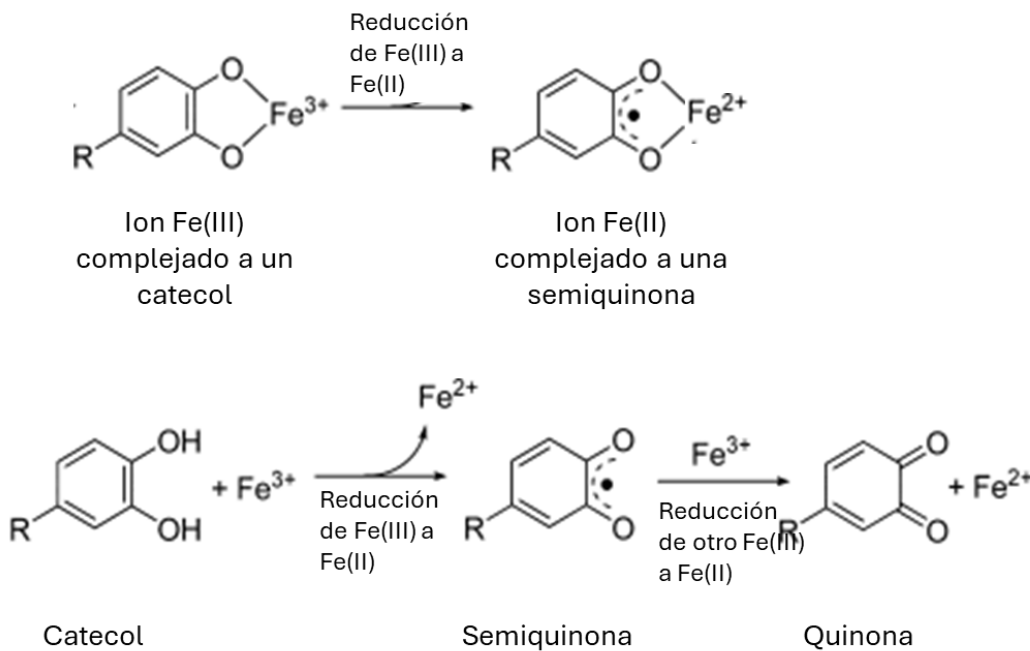


Figura 4: Mecanismo de oxidación de un catecol en el anillo B de un flavonoide y reducción de Fe(III) a Fe(II). Arriba: Los iones Fe permanecen complejos, con el Fe(II) menos disponible para generar la reacción de Fenton. Mecanismo propuesto para los vinos resistentes a la oxidación. Abajo: los iones Fe no están en forma complejo y es probable que el Fe(II) genere la reacción de Fenton. Mecanismo propuesto para vinos sensibles a la oxidación. R: Núcleos A y C de un flavonoide.

En conclusión, determinar la susceptibilidad de un vino a la oxidación es de gran interés para los enólogos, con el fin de adaptar mejor el método de vinificación y las condiciones de almacenamiento al perfil deseado de cada producto. La prueba de resistencia al aire es un método empírico para evaluar de forma sencilla esta resistencia. Cuando esta prueba se monitoriza utilizando voltametría de barrido lineal, el cambio en la señal entre el momento de contacto con el aire y las 2 horas de contacto puede utilizarse para identificar los vinos que son resistentes a la oxidación, mostrando un aumento en la señal voltamétrica, y los que son sensibles a la oxidación, mostrando una disminución. Estos cambios en las señales podrían estar relacionados con la mayor o menor capacidad de los compuestos fenólicos del vino para formar complejos con iones Fe, con la complejación, dando lugar a una mayor señal voltamétrica para el complejo compuesto fenólico -Fe(III) y haciendo que los iones Fe(II) estén menos disponibles para generar la reacción de Fenton. Además de la relación entre los resultados de las mediciones voltamétricas y la clasificación empírica de los vinos por los enólogos, se sometieron a esta prueba vinos blancos y tintos, embotellados después de forma controlada y conservados con el fin de comprobar el carácter predictivo de la prueba. Estos estudios, que confirman la posibilidad de evaluar la sensibilidad de los vinos a la oxidación, se publicarán en un próximo artículo.



BIBLIOGRAFIA

- Amorim Porfírio D., de Queiroz Ferreira R., Renata Malagutti A., Maíra Agostini Valle E., (2014) Electrochemical study of the increased antioxidant capacity of flavonoids through complexation with iron(II) ions, *Electrochimica Acta*, 141, 33–38.
- Büyüktünel E., E Porgalı, C Çolak, Comparison of Total Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Local Red Wines Determined by Spectrophotometric Methods *Food and Nutrition Sciences*, 5 (17), 1660-1667
- Danilewicz J.C. (2007) Interaction of Sulfur Dioxide, Polyphenols, and Oxygen in a Wine-Model System: Central Role of Iron and Copper. *Am. J. Enol. Vitic.* 58:1, 53-60.
- Danilewicz J.C. (2018) [Fe(III)]:[Fe(II)] Ratio and Redox Status of Red Wines: Relation to So-Called “Reduction Potential” *Am. J. Enol. Vitic.* 69:2, 141-147.
- Danilewicz J.C. (2016) [Fe(III)]:[Fe(II)] Ratio and Redox Status of White Wines *Am. J. Enol. Vitic.* 67:2, 146-152.
- De Beer D., J F. Harbertson, P A. Kilmartin, V Roginsky, T Barsukova, D O. Adams, A L. Waterhouse Phenolics: A Comparison of Diverse Analytical Methods *Am J Enol Vitic.* 2004, 55, 389-400
- du Toit W.J., Marais J., Pretorius I.S. and du Toit M. (2006) Oxygen in must and wine: A review. *S Afr J Enol Vitic* 27, 76-94.
- Kilmartin, P.A.; Zou, H.; Waterhouse, A.L. A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 1957–1965.
- Kilmartin P.A., Zou H, Waterhouse A.L. (2002) Correlation of wine phenolic composition versus cyclic voltammetry response, *Am. J. Enol. Vitic.* 53, 294-302.
- Kreitman G.Y., Cantu A., Waterhouse A.L., Elias R.J. (2013) The effect of metal chelators on the oxidative stability of model wine *J. Agric. Food Chem.* 61(39), 9480-7.
- Lopes G.K., Schulman H.M., Hermes-Lima M. (1999) Polyphenol tannic acid inhibits hydroxyl radical formation from Fenton reaction by complexing ferrous ions. *Biochim Biophys Acta.* 1472(1-2),142-52.
- Nguyen T.H., Waterhouse A.L. (2019) A Production-Accessible Method: Spectrophotometric Iron Speciation in Wine Using Ferrozine and Ethylenediaminetetraacetic Acid. *J. Agric. Food Chem.* 67, 2, 680–687.
- Le Nest G., Caille O., Woudstra M., Roche S., Guerlesquin F., Lexa D. (2004) Zn–polyphenol chelation: complexes with quercetin, (+)-catechin, and derivatives: I optical and NMR studies. *Inorganica Chimica Acta* 357 (3), 775-784
- Perron N.R., Brumaghim J.L. (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys.* 53(2),75-100.



Perron N.R., Wang, H.C., DeGuire S.N., Jenkins M., Lawson M., Brumaghim J.L. (2010) Kinetics of iron oxidation upon polyphenol binding. *Dalton Trans.* 39, 9982-9987.

Ribéreau-Gayon J. (1931) Contribution à l'étude des oxydations et réductions dans les vins. Thèse Doctorat ès Sciences Physiques, Bordeaux.

Romanet R., C Coelho, Y Liu, F Bahut, J Ballester, M Nikolantonaki, R D. Gougeon The Antioxidant Potential of White Wines Relies on the Chemistry of Sulfur-Containing Compounds: An Optimized DPPH Assay *Molecules* 2019, 24(7), 1353

Rodrigues A., Silva Ferreira A.C., Guedes de Pinho P., Bento F., Geraldo D. Resistance to Oxidation of White Wines Assessed by Voltammetric Means *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 10557–10562

Ugliano M., Dieval J-B, Tacchini P., Vidal S. Oxidation fingerprints of white wines by linear sweep voltammetry using screen printed carbon electrochemical sensors. 2013, In *Vino Analytica Scientia*, poster

Ugliano M., Pascal C., Diéval J-B., Vidal S., Wirt J., Bégrand, S. Une nouvelle approche voltamétrique pour l'analyse des polyphénols des raisins blancs et le suivi des opérations pré-fermentaires. *Infowine* 2019

Waterhouse A.L. and Laurie V.F. (2006) Oxidation of wine phenolics: A critical evaluation and hypotheses. *Am J Enol Vitic* 57, 306-313