

Evaluer la sensibilité à l'oxydation des vins par un test de résistance à l'air suivi par voltamétrie: la capacité des composés phénoliques à former des complexes avec les ions Fe (II) et Fe (III) pourrait expliquer la longévité des vins

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

¹ Vinventions, équipe œnologie, France

² Consultant indépendant, Montpellier, France

Un des défis majeurs du vinificateur est d'évaluer la capacité d'un vin à résister à l'apparition de signes d'oxydation pour adapter l'itinéraire technique à son objectif de profil et de durée de vie.

Les signes d'oxydation dans les vins sont en pratique décrits comme une évolution de la couleur avec des apparitions de teintes orangées, une évolution aromatique décrite comme une perte de notes variétales (buis, fruits de la passion) et / ou une apparition de notes dites oxydatives (miel, cire, chocolat, noyau, fruit sec, herbe sèche, noix...), parfois une évolution de l'équilibre gustatif avec augmentation de l'astringence et/ou perte de gras. Ces différents signes d'oxydation peuvent apparaître successivement ou simultanément sans que l'apparition de l'un de ces signes ne renseigne sur l'apparition éventuelle d'un autre.

Le moment à partir duquel un vin est considéré comme oxydé est lié à l'acceptabilité de ces caractères par rapport au type de produit et à l'intention du vinificateur. Il est par exemple acceptable voire souhaitable d'avoir des notes de fruit sec sur des vins doux naturels alors que ça ne l'est pas sur des vins secs de Sauvignon Blanc de certaines appellations qui doivent conserver des notes d'agrumes ou de fruits exotiques.

Evaluer la capacité d'un vin à résister à l'oxydation revient à déterminer par un test prédictif sa capacité à vieillir, sa longévité si tant est qu'il soit conservé dans des conditions adéquates.

Dans le vin, un certain nombre de molécules sont connues pour leurs capacités antioxydantes, par exemple les composés phénoliques, ou des antioxydants ajoutés au cours du process tels que les sulfites. Dès lors, l'évaluation de la concentration des antioxydants a été envisagée comme pouvant prédire la longévité d'un vin. Elle peut être



évaluée par différentes méthodes consistant globalement à évaluer la capacité d'un vin à piéger des radicaux, à réagir avec différents types d'oxydants (test DPPH, ABTS, FRAP, analyse de Folin Ciocalteu), ou à s'oxyder sur des électrodes de nature donnée (voltamétrie). Il a finalement été montré que la teneur en antioxydants d'un vin est fortement corrélée à la concentration en composés phénoliques (Büyüktuncel *et al.* 2014 ; Romanet *et al.* 2019 ; de Beer *et al.* 2004, 2006 ; Kilmartin 2001).

Plusieurs études ont montré que la concentration en antioxydants diminue au cours de l'oxydation des vins (Rodrigues *et al.* 2007, Ugliano 2013 et 2019). Globalement, les vins plus âgés comportent moins d'antioxydants que des vins jeunes (Rodrigues *et al.* 2007) mais la variabilité des millésimes et des procédés de vinification (notamment les étapes d'extraction des composés phénoliques) ne permettent pas de déterminer l'âge d'un vin à partir de sa concentration en antioxydants (Romanet *et al.* 2019). Enfin, la faible teneur en antioxydants d'un vin a été corrélée à la présence dans les profils sensoriels de notes associées à une évolution oxydative des vins (Romanet *et al.* 2019). En revanche, ces études ne montrent pas que la teneur en antioxydant est prédictive d'une capacité à résister à l'oxydation.

Pour faire un lien avec les pratiques de vinification, si la teneur intrinsèque en composés phénoliques (contributeurs majoritaires à la teneur en antioxydants) était une image de la capacité d'un vin à résister à l'apparition de notes oxydatives, les vinificateurs utiliseraient l'indice de Folin ou même l'Indice de Polyphénols Totaux dans ce but. En revanche, cette capacité est à ce jour évaluée par les vinificateurs de façon empirique par dégustation avant et après une mise en contact avec l'air (test de résistance à l'air). L'évolution du profil sensoriel du vin est évaluée, notamment l'apparition de notes jugées oxydatives.

Le présent article présente la mise au point d'une méthode de détermination de la sensibilité des vins à l'oxydation. Pour cela, des échantillons de vins ont été sélectionnés par des vinificateurs par empirisme et soumis au test de résistance à l'air avec suivi par voltamétrie linéaire de balayage. Une évolution de signal voltamétrique différente a été observée pour les vins catégorisés empiriquement comme résistants à l'oxydation et sensibles à l'oxydation. Enfin, le signal voltamétrique de la catéchine en solution hydroalcoolique en présence et absence d'ions Fe(II) et Fe(III) sous atmosphère inerte a été enregistré permettant d'émettre des hypothèses sur l'implication de complexes composés phénoliques – ions Fe(II) ou Fe(III) dans les enregistrements obtenus et les mécanismes sous-tendant ce test.

Matériel et méthode

134 échantillons de vins (87 rouges, 32 blancs et 15 rosés de différentes régions françaises et espagnoles) ont été sélectionnés en fin de fermentation alcoolique ou malolactique par des vinificateurs expérimentés (maîtres de chai ou œnologues consultants jouissant de plusieurs années d'expériences dans la zone de production considérée et en général intégrant la micro-oxygénation dans certains de leurs itinéraires techniques). Pour chaque échantillon, le vinificateur a empiriquement évalué le risque d'oxydation rapide du vin par dégustation en le catégorisant en tant que résistant ou sensible à l'oxydation. Les échantillons de vins ont été prélevés en bouteilles de 750 mL préalablement inertées, remplies au débordement et bouchées par une capsule à vis. Ces vins ont été soumis au test de résistance à l'air en prélevant 50 mL d'échantillon à l'aide d'une pipette jaugée et les disposant dans un flacon de 125 mL. Des mesures par voltamétrie linéaire de balayage (0-600 mV, 100 mV/s, pas de 10 mV) ont été effectuées lors de l'ouverture de la bouteille échantillon puis après 2 heures, à l'aide d'un potentiostat (WQS

Polyscan, Vinventions), sur des électrodes imprimées (électrode de travail en carbone, Vinventions). Les potentiels sont exprimés par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl.

Des solutions de catéchine (1150.0 mg/L et 1165.0 mg/L), de sulfate de fer (10.3 mg/L) et de chlorure de fer (10.7 mg/L) ont été préparées dans 13% d'éthanol, comportant 4.0 g/L d'acide tartrique et ajustée à pH 3.3 par HCl 1N puis 0.1N. Ces solutions mères ont été désaérées par bullage à l'azote et disposées dans une sorbonne inertée par balayage à l'azote. Le % d'O₂ dans la sorbonne a été suivi par un Nomasense O2 P300 (Vinventions) et a été maintenu à moins de 2% pendant tout l'essai. Les courbes intensité-potential des solutions mères fraîchement préparées et de mélange 50/50 v/v catéchine / ions Fe ont été enregistrées en triplicat comme décrit précédemment par voltamétrie linéaire de balayage.

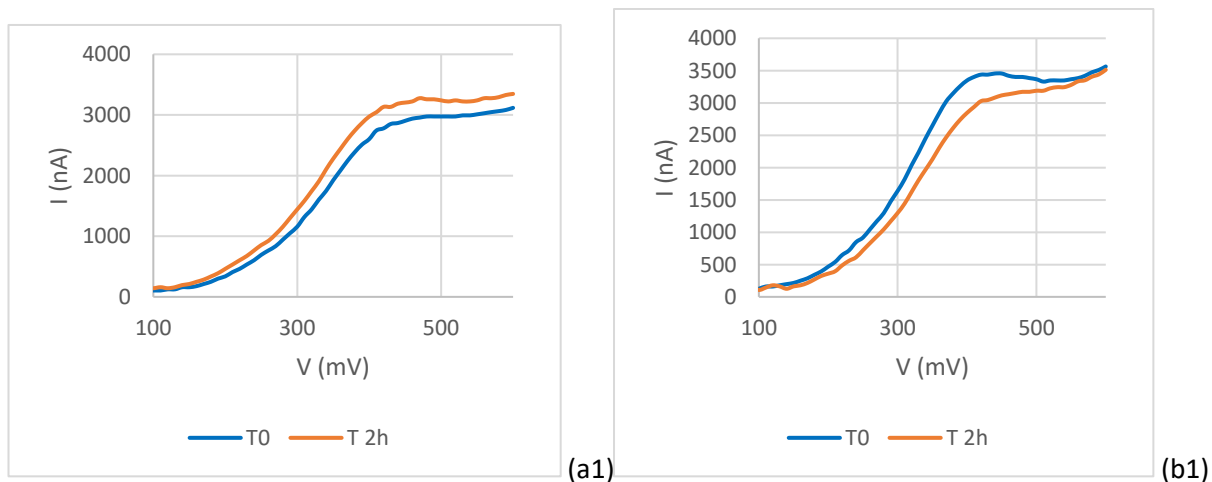
Résultats

Observation des évolutions de signaux voltamétriques au cours des tests de résistance à l'air :

Empiriquement, le test de résistance à l'air n'est réalisé par les vinificateurs que sur des échantillons qui n'ont pas été soumis à un contact avec l'oxygène dans les jours précédents. Pour se rapprocher de ces conditions, les tests de résistance à l'air n'ont été réalisés ici que sur échantillons conservés 3 semaines avant la mesure en absence d'O₂. 58% échantillons sélectionnés par les vinificateurs étaient catégorisés empiriquement comme résistants à l'oxydation.

La comparaison des courbes intensité/potential obtenues sur un vin immédiatement après ouverture de la bouteille échantillon et celles obtenues après 2h de contact avec l'air a permis de mettre en évidence plusieurs évolutions de signaux.

Pour 47 des 134 vins, une augmentation significative d'intensité (supérieure à 5%, incertitude de mesure de la méthode) sur la plage 100-600 mV est observée sur la mesure effectuée après 2h de contact avec l'air (figure 1 (a)). Les 47 échantillons de ce groupe avaient tous été caractérisés comme résistants à l'oxydation par les vinificateurs. Aucun échantillon dit « sensible à l'oxydation » n'a présenté ce comportement.



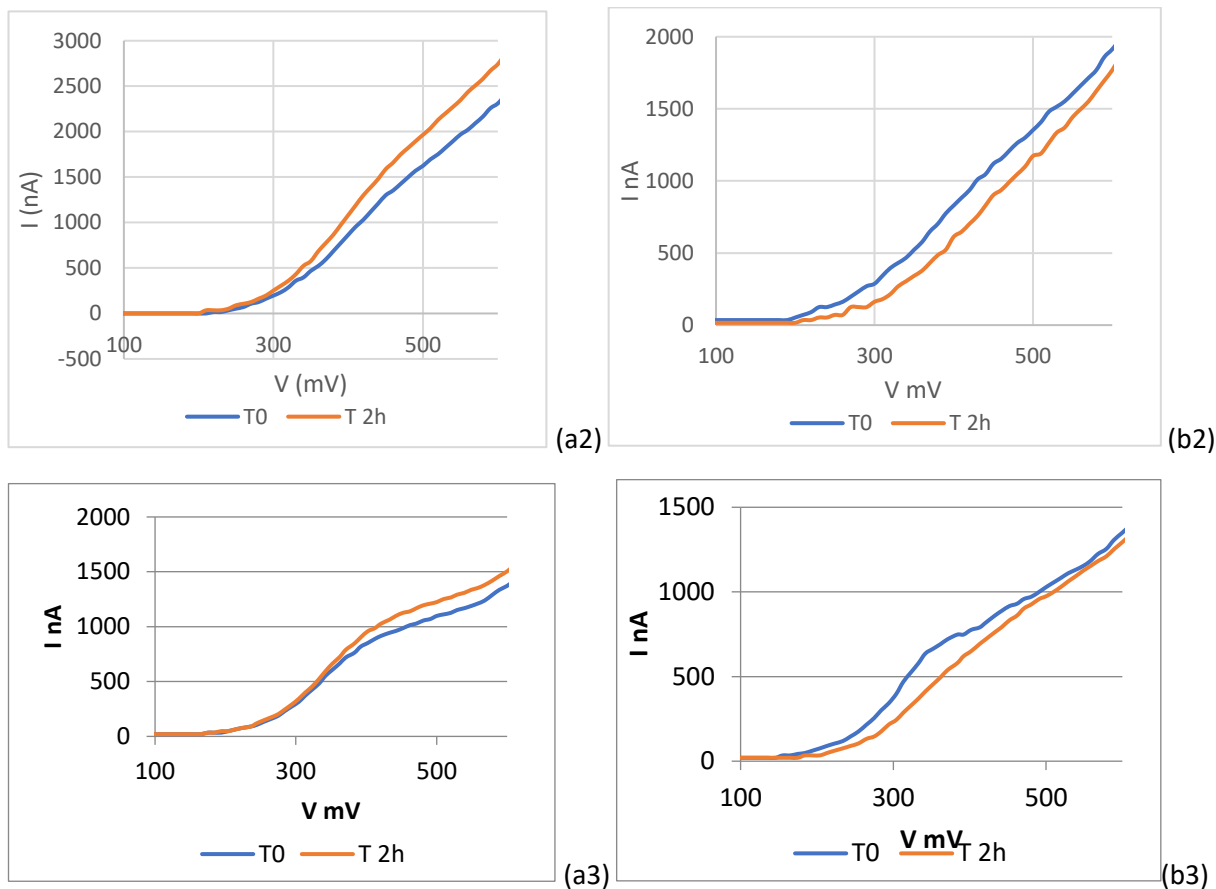


Figure 1 : Courbes intensité/potentiel d'un vin mesuré lorsque l'échantillon est mis en contact avec l'air (T0) puis après 2h de contact. (a) échantillons décrits comme résistants à l'oxydation par des vinificateurs (b) échantillons décrits comme sensibles à l'oxydation par des vinificateurs. (a1) et (b1) : vins rouges. (a2) et (b2) : vins rosés. (a3) et (b3) : vins blancs.

Pour 38 des 147 échantillons, au contraire, une diminution significative d'intensité (supérieure à 5%, incertitude de mesure de la méthode) sur la plage 100-600 mV est observée sur la mesure effectuée après 2h de contact avec l'air (figure 1 (b)). Ces 38 vins avaient tous été caractérisés comme sensibles à l'oxydation par les vinificateurs. Aucun des échantillons caractérisés comme « résistants à l'oxydation » n'a présenté ce comportement.

Pour les 49 vins restants, la variation d'intensité entre la mesure initiale et celle enregistrée après 2h de contact avec l'air n'est pas significative. Ces vins pourraient potentiellement avoir des comportements vis-à-vis de l'oxydation moins marqués que ceux des 2 catégories précédemment décrites rendant le test non sensible à leur discrimination. Par ailleurs, dans la catégorisation des vinificateurs, aucune échelle d'intensité de la résistance ou la sensibilité à l'oxydation n'a été demandée, signifiant que cette catégorie de vin qualifiée par la suite « d'intermédiaire » ne pouvait être distinguée.

Le test semble tout de même permettre de catégoriser des vins :

- ceux présentant une augmentation de signal entre la mesure initiale et celle faite après 2h de contact avec l'air semblent systématiquement résistants à l'oxydation,

- ceux présentant une baisse de signal entre ces deux mesures semblent systématiquement sensibles à l'oxydation.

Impact de la complexation des ions Fe(II) et Fe(III) par les composés phénoliques sur le signal voltamétrique

Afin de tenter d'expliquer le mécanisme chimique sous tendant le test, des travaux complémentaires ont été réalisés en solution modèle, en milieu inerte. Pour mémoire, il a été montré (Kilmartin *et al.* 2002, Ugliano *et al.* 2019) que la voltamétrie sur électrode en carbone permet d'analyser les composés phénoliques.

Il a par ailleurs été envisagé que le mécanisme d'oxydation dans les vins (figure 2) soit sous tendu par le cycle redox du couple Fe(II)/Fe(III) (Ribereau Gayon 1931, Danilewicz 2018, du Toit *et al.* 2006, Waterhouse and Laurie 2006).

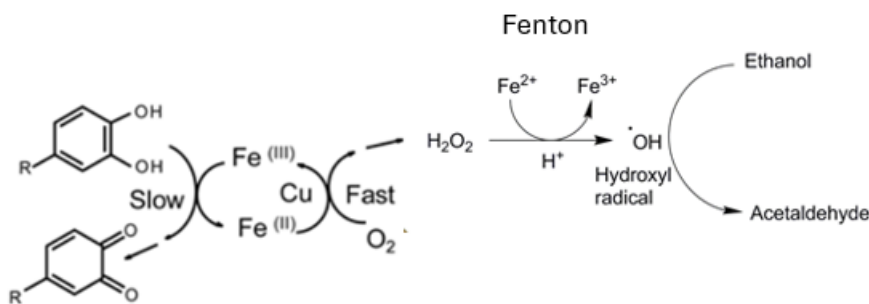


Figure 2 : mécanisme d'oxydation des vins, adapté de Danilewicz (2007)

De plus, ces mêmes ions Fe(II) et Fe(III) sont connus pour former des complexes avec les composés phénoliques, notamment les structures dont le noyau B est di ou tri hydroxylé (Amorim Porfírio *et al.* 2014). Récemment, plusieurs études (Le Nest *et al.* 2004, Amorim Porfírio *et al.* 2014) ont mis en évidence que les complexes entre composés phénoliques et certains ions métalliques (Zn^{2+} , Fe^{2+}) peuvent présenter des courbes intensité / potentiel différentes de celle du composé phénolique en l'absence d'ions métalliques. Le signal du complexe est assez fréquemment plus élevé. Plusieurs composés phénoliques modèles ont été étudiés dans ces études (morine, quercétine, fisétine, catéchine, chrysrine, taxifoline...) montrant des impacts différents de la complexation sur leur signal voltamétrique respectif. Cependant, ces études ont été menées à des pH neutres visant à reproduire des conditions physiologiques, et elles ne présentent pas le signal du complexe composé phénolique – Fe(III). Le vin présentant un pH acide et des acides organiques notamment de l'acide tartrique connu pour également complexer les ions Fe(II) et Fe(III), le signal voltamétrique de la catéchine, choisi comme composé phénolique modèle pour cette étude, a été enregistré en solution modèle vin (solution hydroalcoolique 13%, acide tartrique 4 g/L, pH 3.5) avant et après ajout indépendant d'ions Fe(II) et Fe(III), sous atmosphère inerte pour éviter la mise en place du mécanisme d'oxydation (manipulation réalisée dans une sorbonne inertée par balayage continu d'azote, solutions désaérées au préalable). L'ajout indépendant des ions Fe(II) et Fe(III) à la solution de catéchine a engendré des



modifications de la courbe intensité potentiel enregistrée pour la catéchine seule (figure 3), semblant indiquer que la complexation catéchine – ion Fe(II) et Fe(III) a bien eu lieu dans les conditions de vin modèle et a un impact sur le signal voltamétrique. Il a été observé que le signal voltamétrique du complexe catéchine – Fe(II) était proche de celui de la catéchine (figure 3 (b)), comme observé par Porfirio et al (2014), voire légèrement inférieur entre 450 et 500 mV. Au contraire, le signal du complexe catéchine – Fe(III) était significativement plus élevé que celui de la catéchine seule entre 450 et 600 mV (figure 3 (a)).

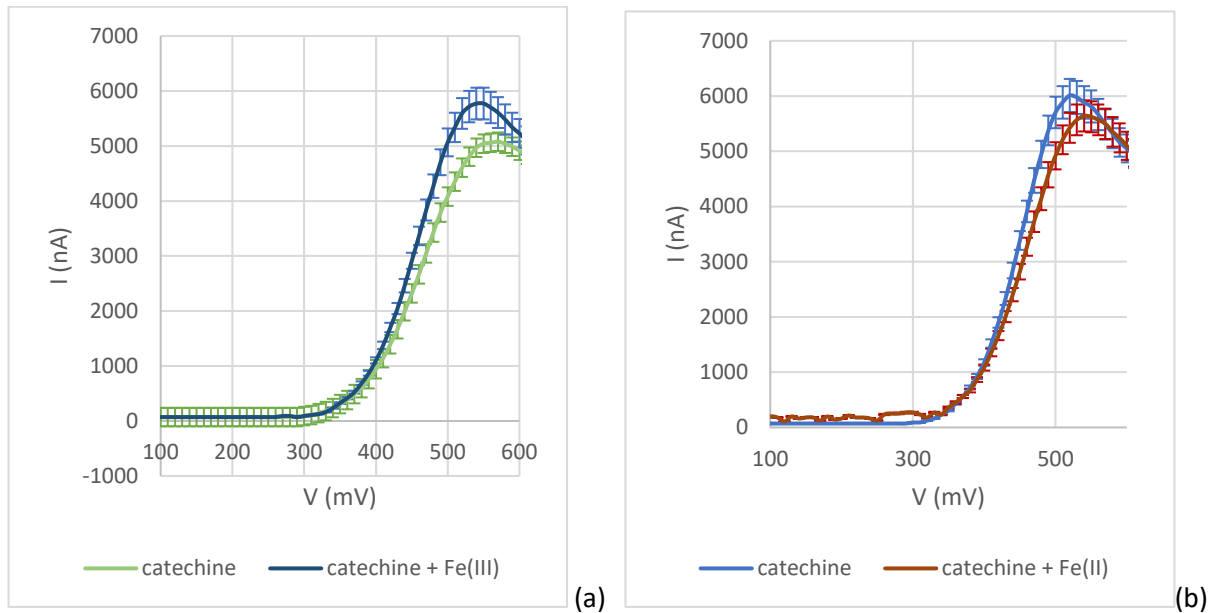


Figure 3: courbes intensité potentiel de : (a) la catéchine (1150mg/L, solution hydroalcoolique 13%, pH 3.3, 4g/L acide tartrique) en absence ou présence d'ions Fe(III) (5 mg/L) (b) la catéchine (1165mg/L, solution hydroalcoolique 13%, pH 3.3, 4g/L acide tartrique) en absence ou présence d'ions Fe(II) (5 mg/L)

La complexation des ions Fe(II) pourrait les rendre moins disponibles pour participer à la réaction de Fenton.

En conséquence, les hypothèses suivantes ont été émises pour expliquer l'évolution des courbes intensité – potentiel d'un vin donné après 2h de contact avec l'air.

La première mesure est effectuée immédiatement après ouverture de l'échantillon qui a été conservé 3 semaines minimum en condition d'anoxie après son prélèvement lui-même réalisé en condition inerte. Dans ces conditions, les ions fer sont a priori majoritairement sous la forme Fe(II) (Danilewicz, 2016 et 2018, Nguyen & Waterhouse 2019). Le signal voltamétrique correspond donc a priori à celui des composés phénoliques ou des complexes composés phénoliques – Fe(II) selon la capacité des composés phénoliques en présence à complexer les ions Fe.

Après 2h de contact avec l'air, le mécanisme d'oxydation (figure 3) a débuté, se matérialisant par une oxydation du Fe(II) en Fe(III) couplé à une réduction de l'oxygène en peroxyde d'hydrogène (Ribereau Gayon 1931, Danilewicz 2018, du Toit *et al.* 2006, Waterhouse and Laurie 2006). Lorsqu'une augmentation du signal est observée, cette dernière pourrait être attribuée à la contribution de complexes composés phénoliques – Fe(III) dont le signal



apparaît plus élevé que celui des complexes composé phénolique – Fe(II) d'après les enregistrements effectués sur les solutions de catéchine. Ceci signifierait que les vins classés comme résistants à l'oxydation par ce test ont un pool de composés phénoliques capable de complexer les ions Fe dans les conditions de milieu de ces vins. L'effet de chélateurs de métaux exogènes pour stabiliser les vins contre l'oxydation a été envisagée par Kreitman *et al.* (2013) à l'issue d'une étude en solution modèle. Par ailleurs, dans un contexte physiologique, Lopes *et al.* (1999) ont envisagé que l'acide tannique limite l'oxydation du 2-desoxyribose, composant de l'ADN, par sa capacité à chélater les ions Fe rendant les ions Fe(II) indisponibles pour participer à la réaction de Fenton et donc limitant la formation de radicaux hydroxyle HO°. Il se pourrait dans le cas des vins résistants que les ions Fe(II) (figure 4) demeurent complexés à la semiquinone (Perron *et al.* 2009 et 2010), forme oxydée du composé phénolique ayant réduit un ion Fe(III) en ion Fe(II). Il n'y aurait pas poursuite du mécanisme vers une forme quinone ayant réduit 2 ions Fe(III), et les ions Fe(II) resteraient complexés aux composés phénoliques. Perron *et al.* (2010) ont également envisagé que la stabilité du complexe composé phénolique – Fe(III) favoriserait l'autoxydation du Fe(II) complexé. Les ions Fe(II) pourraient ainsi être moins disponibles pour réagir avec le peroxyde d'hydrogène et donner lieu à la réaction de Fenton, ce qui expliquerait la moindre apparition de notes décrites comme oxydatives lorsque ces vins sont en contact avec l'oxygène.

Au contraire, lorsque le signal du vin diminue après 2h de contact avec l'air, il est probable que le mécanisme d'oxydation ait engendré la formation de quinones, formes oxydées des composés phénoliques ne pouvant donc pas contribuer au signal voltamétrique dans la zone de potentiel considérée. Le pool de composés phénoliques dans les conditions de milieu de ces vins ne serait ici pas en capacité de maintenir les ions Fe complexés (figure 4). Les ions Fe(II) pourraient donc réagir avec le peroxyde d'hydrogène pour initier la réaction de Fenton (Singleton 1987) et donner naissance à des radicaux de très haute énergie, les radicaux hydroxyle HO° qui oxydent par exemple l'éthanol en éthanal. Sans être exhaustif, il a également été envisagé que les radicaux hydroxyles engendrent l'apparition de pigments bruns / jaunes / orangés liée à des réactions de condensation de flavan-3-ols (tanins) en présence d'éthanal ou d'acide pyruvique (Oszmianski 1996, Fulcrand 1996, Guyot 1996) ou attaquent des composés à fonctions alcools conduisant à la formation d'aldéhydes dits d'oxydation (méthional, phénylacétaldehyde) (Nikolantonaki et Waterhouse 2012).

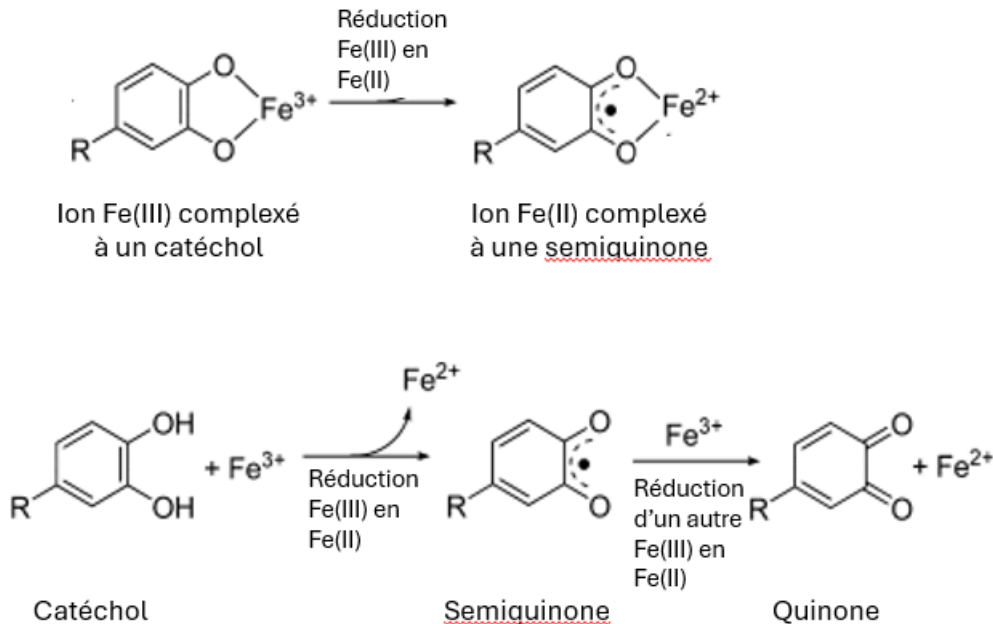


Figure 4 : Mécanisme d'oxydation d'un catéchol sur le noyau B d'un flavonoïde et réduction du Fe(III) en Fe(II). En haut : les ions Fe demeurent complexés, les Fe(II) sont moins disponibles pour engendrer la réaction de Fenton. Mécanisme proposé dans le cas des vins résistants à l'oxydation. En bas : les ions Fe ne sont pas complexés et les Fe(II) sont susceptibles de générer la réaction de Fenton. Mécanisme proposé pour les vins sensibles à l'oxydation. R : noyau A et C d'un flavonoïde.

En conclusion, la détermination de la sensibilité à l'oxydation d'un vin revêt un intérêt majeur pour les vinificateurs afin d'adapter au mieux la méthode de vinification et les conditions de conservation à chaque produit selon le profil recherché. La réalisation de test de résistance à l'air est une méthode empirique permettant d'évaluer simplement cette résistance. Lorsque ce test est suivie par voltamétrie linéaire de balayage, l'évolution du signal entre le moment de la mise en contact avec l'air et 2h de contact permet de repérer des vins résistants à l'oxydation, présentant une augmentation du signal voltamétrique et ceux sensibles à l'oxydation, présentant une diminution de ce dernier. Ces évolutions de signaux pourraient être liées à la capacité plus ou moins importante des composés phénoliques du vin à complexer les ions Fe, la complexation conduisant à un signal voltamétrique plus élevé pour le complexe composé phénolique -Fe(III) et rendant les ions Fe(II) moins disponibles pour engendrer la réaction de Fenton. Au-delà du lien entre le résultat des mesures voltamétriques et du classement empirique des vins par des vinificateurs, des vins blancs et rouges ont été soumis à ce test puis mis en bouteille de manière contrôlée et conservés afin de tester le caractère prédictif du test. Ces études, confirmant la possibilité d'évaluer la sensibilité à l'oxydation des vins, seront publiées dans un prochain article.



BIBLIOGRAPHIE

- Amorim Porfírioa 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.
- Büyüktuncel 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