

DISMINUCIÓN DE 4-ETILFENOL Y 4-ETILGUAYACOL EN VINOS TINTOS



Tesina para obtener el título de grado de LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

ALUMNA: CECILIA AILÉN CHIMENO

AÑO: 2022

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS- UNIVERSIDAD NACIONAL DE CUYO

Tema:

“Disminución de 4-etilfenol y 4-etilguayacol en vinos tintos”

Tesista:

Cecilia Ailén Chimeno

cecichimeno@gmail.com

Directora de Tesis:

Mgter. Lic. María Laura Sánchez

msanchez@fca.uncu.edu.ar

Co-Directora de Tesis:

Lic. Brom. Andrea Cosentino

acosentino@chandon.com.ar

Miembros del comité evaluador:

Lic. Brom. Sandra Rodriguez

Lic. Brom. Marcela Bernardi

Presidente:

Dra. Lic. Brom. Andrea Antonioli

Suplente:

Lic. Brom. Daniela Ramirez

RESUMEN

La vitivinicultura comprende una de las principales actividades de Mendoza. Gracias al clima y el terroir de la provincia se logran productos de elevada calidad y únicos en el mundo. En el mercado, el consumidor busca vinos de calidad y con adecuadas características organolépticas. Durante las distintas etapas de elaboración tanto la materia prima como el producto terminado, están expuestos a posibles contaminaciones no sólo provenientes del viñedo sino también derivado de tanques, mangueras e insumos utilizados en bodega. Uno de los desafíos más grandes para los enólogos se centra en vinos añejados en vasijas de madera, allí se dan condiciones particulares, como microoxigenación, presencia de azúcares residuales, nutrientes y tiempo prolongado de estancia del vino, que favorecen el crecimiento de *Brettanomyces*, una levadura contaminante. Este microorganismo produce fenoles volátiles como 4-etilfenol y 4-etilguayacol, que confieren aromas desagradables descriptos como cuero mojado, sudor de caballo, establo, etc.

Mediante una revisión bibliográfica se darán a conocer dos insumos prácticos y económicos para recuperar vinos contaminados con *Brettanomyces*. Uno de ellos se basa en el uso de lías de levaduras provenientes de fermentaciones y el otro en el uso de polivinilpirrolidona (PVPP). La aplicación de alguno de estos procedimientos, lograría disminuir el 4-etilfenol y 4-etilguayacol, producidos por la levadura, por debajo del umbral de percepción con la consecuencia de reducir los aromas desagradables.

PALABRAS CLAVES: *Brettanomyces*, 4-etilfenol, 4-etilguayacol, vino, lías de levaduras, polivinilpirrolidona (PVPP).

ABSTRACT

Winemaking is one of Mendoza's main activities. Thanks to the province's climate and terroir, wines of high quality and unique in the world are produced. In the market, consumers are looking for quality wines with adequate organoleptic characteristics. During the different stages of production, both the raw material and the finished product are exposed to possible contamination not only from the vineyard but also from tanks, hoses and supplies used in the winery. One of the greatest challenges for winemakers focuses on wines aged in wooden vats, where particular conditions such as micro-oxygenation, the presence of residual sugars, nutrients and prolonged storage time favor the growth of *Brettanomyces*, a wine-contaminating yeast. This microorganism produces volatile phenols such as 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol, which give the wine unpleasant aromas described as wet leather, horse sweat, stable, etc.

In the bibliographic review, two practical and economic inputs for the recovery of wines contaminated with *Brettanomyces* will be presented. One of them is based on the use of yeast lees from fermentations and the other on the use of polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). The application of either of these procedures would reduce 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol, produced by the yeast, below the perception threshold with the consequence of reducing unpleasant aromas.

KEYWORDS: *Brettanomyces*, 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol, wine, yeast lees, polyvinylpolypyrrolidone (PVPP).

DEDICATORIA

A mi familia, por el apoyo incondicional y acompañamiento para concretar mis estudios.

A mis amigos de toda la vida, por estar en todo momento.

A mis amigos de la facultad, por hacer este camino más divertido y placentero.

A mí misma, por confiar en el proceso y ser paciente.

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de Tesis María Laura Sánchez, por guiarme y ayudarme en cada paso.

A mi co-directora Andrea Cosentino, por siempre confiar en mí, brindarme sus conocimientos y apoyarme en todo momento.

A la Facultad de Ciencias Agrarias, por brindarme el espacio para poder desarrollarme como estudiante y futura profesional.

INDICE

<i>RESUMEN</i>	<i>iii</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>iv</i>
<i>DEDICATORIA</i>	<i>v</i>
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>vi</i>
1. <i>Introducción</i>	1
1.1 Panorama Vitivinícola	1
1.1.1 Mundial	1
1.1.2 Nacional	2
1.2 Proceso de elaboración del vino	3
1.3 Microorganismos asociados a la uva y a la vinificación	5
1.3.1 Principales levaduras vínicas	6
1.3.2 Deterioro microbiano	11
1.4 Levadura <i>Brettanomyces</i>	12
1.4.1 Taxonomía	12
1.4.2 Procedencia de las poblaciones de <i>Brettanomyces</i>	12
1.4.3 Condiciones óptimas de crecimiento	13
1.4.4 Alteraciones en el vino	15
1.5 Tratamientos desodorizantes	18
1.5.1 Tratamiento para 4-etilfenol y 4-etilguayacol	19
1.5.1.1 Lías de levaduras	20
1.5.1.2 Polivinilpolipirrolidona (PVPP)	22
2. <i>Hipótesis y objetivos</i>	24
2.1 Hipótesis	24
2.2 Objetivos generales y particulares	24
3. <i>Antecedentes, descripción de materiales, fuentes y resultados bibliográficos</i>	25
3.1 Lías de levaduras	26
3.2 Polivinilpolipirrolidona	34
4. <i>Resultados y Discusión</i>	39
5. <i>Conclusiones</i>	42
<i>Bibliografía</i>	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Panorama mundial de producción de vino 2021.....	2
Figura 2: Esquema de vinificación de vinos tintos.....	3
Figura 3: Microfotografía de <i>Candida vini</i>	7
Figura 4: Microfotografía de <i>Hanseniaspora uvarum</i>	7
Figura 5: Microfotografía de <i>Hansenula anomala</i>	8
Figura 6: Microfotografía de <i>Kluyveromyces thermotolerans</i>	9
Figura 7: <i>Saccharomyces cerevisie</i> visto con microscopía de contraste de fase a un aumento de 1000x.....	9
Figura 8: Microfotografía de <i>Saccharomycodes exiguous</i>	10
Figura 9: Microfotografía de <i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	10
Figura 10: Fotografías al microscopio de diferentes morfologías de <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	11
Figura 11: Condiciones enológicas evitan el crecimiento (verde). En rojo condiciones que favorecen el desarrollo de <i>Brettanomyces</i> en barrica.....	14
Figura 12: Fenoles volátiles producidos por <i>Brettanomyces</i>	16
Figura 13: Defectos sensoriales producidos por <i>Brettanomyces</i>	17
Figura 14: Síntesis de fenoles.....	18
Figura 15: Polifenoles presentes en el vino.....	20
Figura 16: Principales ácidos hidroxicinámicos.....	20
Figura 17: Organización de la pared celular de <i>Saccharomyces cerevisie</i>	21
Figura 18: Estructura de la polivinilpolipirrolidona (PVPP). Fuente: Togores, 2010.	22
Figura 19: Mecanismo de fijación de los polifenoles por el PVPP.....	23
Figura 20: Experimentos de sorción para a) 4-etilfenol y b) 4-etilguayacol individualmente sin agitación y con agitación.....	29
Figura 21: Experimentos de sorción con 4-etilfenol y 4-etilguayacol conjuntamente a) sin agitación y b) con agitación.....	30
Figura 22: Perfiles de olor del vino naturalmente contaminado (vino NC) antes y después de los tratamientos con carbón activado y PVPP.....	36
Figura 23: Efecto estimado de los factores cuando utilizaron PVPP como adsorbente a) 20 mg/L y b) 2,5 mg/L de ácido p-cumárico.....	38
Figura 24: PolyLact (PVPP) Marca Laffort y su protocolo de utilización.....	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Coeficiente de partición de 4-etilfenol y 4-etilguayacol para concentraciones volátiles de 1000 µg/L y 500 µg/L , respectivamente, en vino sintético modelo (Chassagne et. al, 2005).....	27
Tabla 2: Concentración de 4-etilfenol y 4-etilguayacol (µg/L) en el control y en los vinos tratados del ensayo 2 (Barbosa, Hogg & Couto, 2012).	32
Tabla 3: Características de los diferentes derivados de levadura comercial (YD) (Barrio-Galán et. al, 2012).....	32
Tabla 4: Concentración (mg/L) de ácido trans-p-cumárico en solución de vino modelo a 15, 30 y 60 días de tratamiento (Barrio-Galán et. al, 2012).....	33
Tabla 5: Concentración (mg/L) de 4-etilfenol en solución de vino modelo a 15, 30 y 60 días de tratamiento (Barrio-Galán et. al, 2012)	33
Tabla 6: Efecto de carbón vegetal, PVPP y zeolita sobre la concentración de 4-etilguayacol y 4-etilfenol en los vinos, expresado en µg/L (Lisanti et. al, 2017).....	36
Tabla 7: Resumen de los porcentajes de disminución obtenidos por cada uno de los autores investigados en el uso de lías de levaduras.	39
Tabla 8: Resumen de los porcentajes de disminución obtenidos por cada uno de los autores investigados en el uso de lías de levaduras.	40

1. Introducción

1.1 Panorama Vitivinícola

1.1.1 Mundial

Según las estadísticas realizadas por la Organización Mundial de la Viña y el Vino referidas al año 2021, se informó lo siguiente:

Sobre la base de la información recopilada de 28 países, que representa el 85 % de la producción mundial en 2020, se estima que la producción mundial de vino en 2021 (excluidos zumos y mostos) es de entre 247,1 y 253,5 Mill. hL, con un punto medio del intervalo de 250,3 Mill. hL.

La producción de vino en 2021 se puede considerar como sumamente baja, apenas ligeramente por encima de la producción históricamente baja de 2017. El volumen previsto para este año parece haber disminuido en un 4 % respecto a 2020 (que ya se situaba por debajo de la media) y es un 7 % más bajo que su media de los últimos veinte años.

Es el resultado de condiciones climáticas desfavorables que afectaron de manera considerable a los principales países productores de vino en Europa este año. El hemisferio sur y Estos Unidos (EE. UU.) parecen ser excepciones en este panorama general negativo y tienden a equilibrar la disminución de volumen registrada en la Unión Europea (UE).

Este es el tercer año consecutivo que la producción vinícola mundial se sitúa por debajo de la media. Sin embargo, el impacto de esta reducción todavía debe ser evaluada, debido al contexto actual donde la pandemia de covid-19 aún está generando un grado relativamente alto de volatilidad e incertidumbre.

Los países sudamericanos registraron pronunciados aumentos en los niveles de producción con respecto a 2020. La ausencia de condiciones meteorológicas adversas este año, generalmente causadas por el efecto climático llamado El Niño, parece haber contribuido a cosechas exitosas y altos niveles de producción de vino en 2021.

Chile se confirma como el mayor productor de la región en 2021, con un pico de producción vinícola de 13,4 Mill. hL, el volumen más alto registrado en 20 años, con un incremento del 30 % en comparación con su nivel de 2020.

En 2021, la producción vinícola de Argentina ha aumentado significativamente a 12,5 Mill. hL (+16 %/2020) después de una producción muy baja registrada en el año 2020. (OIV: Organización Mundial de la Viña y el Vino, 2021)

En la **Figura 1** se puede observar que la mayor producción de vino en el mundo en el año 2021, se centra en la Unión Europea principalmente en Italia, España y Francia, los cuales concentran el 46% de la producción total mundial. Mientras que el 54%

restante se reparte entre EE.UU (10%), Australia (6%), Argentina (5%), Chile (5%), Sudafrica (4%) y otros (24%).

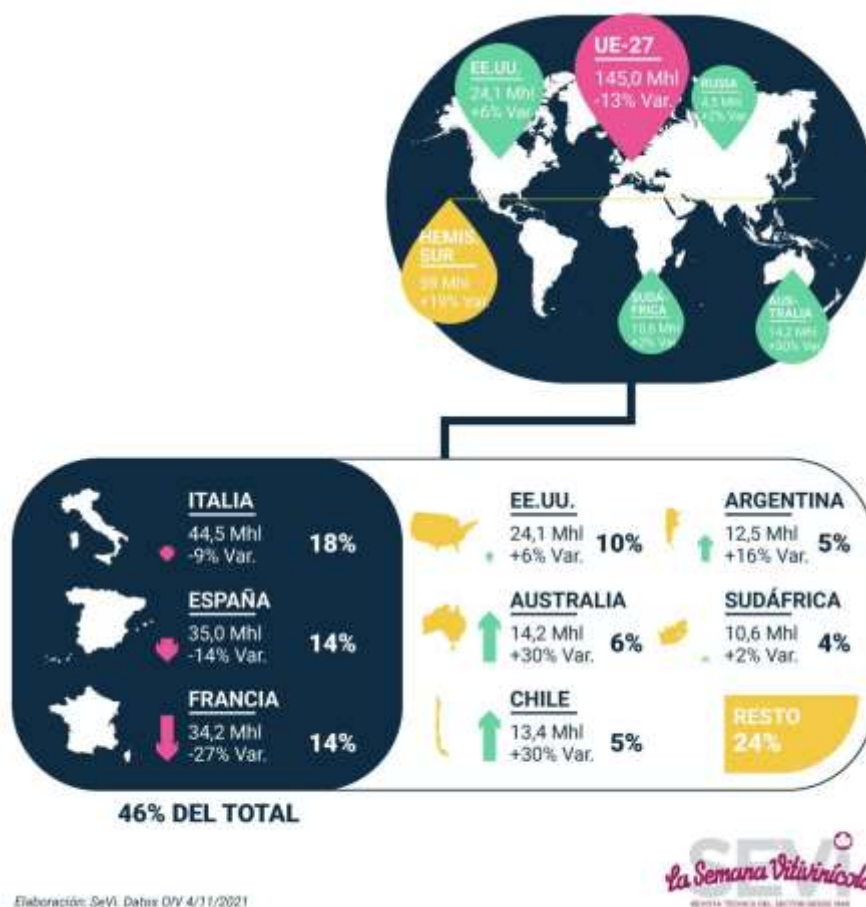


Figura 1: Panorama mundial de producción de vino 2021. Fuente: www.sevi.net/es.

1.1.2 Nacional

Según la Ley de Vinos N°14.878, el Instituto Nacional de Vitivinicultura (INV) establece que: se considerará vinos a los productos obtenidos por la fermentación alcohólica total o parcial de los azúcares naturales de la uva fresca o del mosto virgen, previamente limpio y mantenido en frío, de uvas provenientes de la especie *Vitis vinifera L.* con o sin partes sólidas, que tengan un tenor alcohólico real superior a CINCO GRADOS (5°) Gay Lussac. Ningún otro líquido cualquiera sea su origen o composición podrá designarse con el nombre de vino (INV, 1992).

La superficie destinada al cultivo de la vid en Mendoza registrada al 31 de diciembre de 2021 alcanza las 148.996 ha distribuidas en 15.171 viñedos. El departamento con mayor superficie cultivada es San Martín, que concentra el 18,3% del total. Le siguen en importancia, Luján de Cuyo (10,4%), Rivadavia (9,8%), Lavalle (8,7%), San Rafael (8,5%), Junín (7,6%) y Maipú (7,4%) (INV, 2022).

Las variedades de vides más cultivadas en el país son: Malbec (22%), Cereza (12%), Bonarda (8%), Cabernet Sauvignon (7%) y Criolla Grande (6%). La variedad que más ha aumentado su superficie de cultivo desde el año 2000 es Malbec (+30.019 ha),

pasando de 16.347 ha a las actuales 46.366 ha. Le siguen en importancia por su crecimiento en superficie, aunque con bastante diferencia cuantitativa: Flame Seedless (+4.598 ha), Aspirant Bousquet (+4.323 ha) y Syrah (+3.582 ha).

Las variedades que más disminuyeron desde el año 2000 son: Criolla Grande (-11.793 ha), Cereza (-6.215 ha), Pedro Giménez (-5.790 ha) y Moscatel Rosado (-5.577 ha). (INV, 2022).

1.2 Proceso de elaboración del vino

La elaboración de vino consiste en varias etapas (**Figura 2**), donde cada una de ellas requiere especial cuidado para obtener finalmente un vino de calidad:

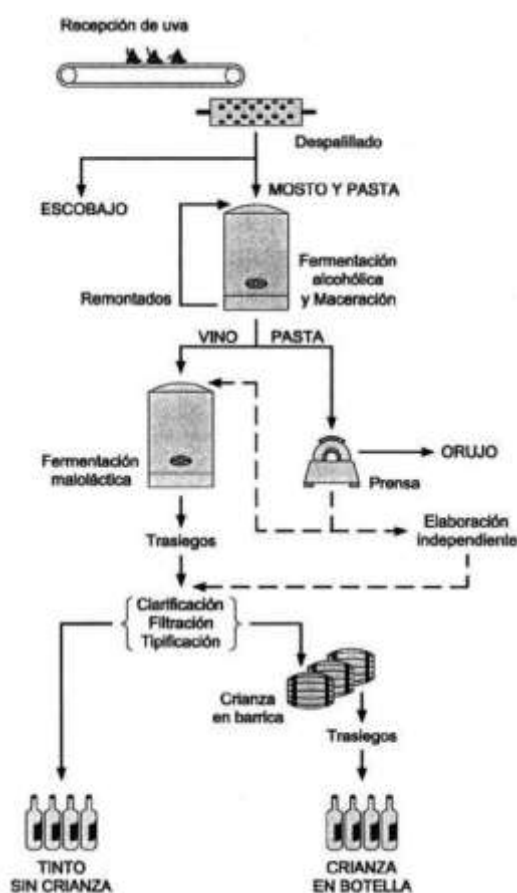


Figura 2: Esquema de vinificación de vinos tintos. Fuente: Alejandre, 2007.

La cosecha de la uva se produce cuando la baya ha llegado a su punto ideal de madurez industrial, la cual no siempre coincide con la fisiológica (Alejandre, 2007).

El estado fitosanitario del fruto es crucial para obtener vinos de óptima calidad. La uva debe estar sana y entera. En las heridas provocadas por fenómenos meteorológicos y ataques de insectos, aparecen y se desarrollan todo tipo de microorganismos, entre ellos *Botrytis cinerea* o podredumbre gris (Alejandre, 2007).

La baya debe permanecer entera, transportándose con delicadeza desde la cepa hasta la tolva, procurando que el hollejo no se rompa y que, en general, no se produzcan pérdidas de mosto que serán luego focos de microfermentaciones indeseadas y difíciles de controlar (Alejandre, 2007).

Una vez completada la cosecha, se procede a volcar la uva en una tolva. Allí pasarán por unos rodillos que se ocupan de romper la baya sin dañar el hollejo ni el raspón, y sin romper las semillas. A continuación, la despalladora separa los hollejos y la pulpa del resto del racimo, del escobajo, para evitar que transmita al jugo sabores astringentes y olores herbáceos. En esta parte se obtiene una mezcla pastosa llamada mosto (Togores, 2010).

El mosto obtenido se deja reposar por un período de tiempo que va de una a dos semanas. Durante este tiempo, la piel de la uva (hollejo) se encarga de darle al vino su tonalidad característica. También suelen hacerse procesos de remontado, que consisten en remover constantemente el mosto para que toda la parte líquida se impregne con el sabor y el color del hollejo (Alejandre, 2007).

Aquí es donde se inoculan las levaduras seleccionadas o se deja fermentar con levaduras nativas. El proceso de fermentación consiste en la transformación del azúcar de la fruta a alcohol y dióxido de carbono, gracias a la actividad de las levaduras (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

El paso siguiente es el descube, el cual consiste en trasladar el líquido con principio de fermentación, a otro depósito en el que continúa con la fermentación alcohólica. A la parte sólida restante se le puede aplicar un proceso de prensado para extraer el líquido que sigue presente, obteniendo así el llamado vino prensa (Alejandre, 2007).

Luego se procede a una fermentación maloláctica, esta es una segunda fermentación a la que se somete el vino para transformar el ácido málico en ácido láctico. Tiene lugar de forma espontánea producida por las mismas bacterias presentes en la uva, pero se deben controlar las condiciones de temperatura y duración de la fermentación (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Este paso es muy importante porque el ácido málico tiene un mayor nivel de acidez que el ácido láctico. Por esta razón, cuando termina esta fermentación el vino tinto adquiere un sabor más equilibrado y menos astringente en el paladar (Carrascosa et al., 2011).

Los vinos después de la fermentación alcohólica y maloláctica son turbios e inestables por lo que necesitan ser clarificados y estabilizados para preservar su calidad hasta su consumo. Además de solutos y macromoléculas, incluyen una gran diversidad de partículas, responsables de brumas y depósitos. Estas partículas son principalmente microorganismos (levaduras y bacterias), cristales de tartrato, restos de células de la piel y la pulpa de la uva, y agregados de moléculas/macromoléculas que se han formado durante la fermentación y la maceración. Dentro de estas partículas, es importante distinguir entre las partículas coloidales, que forman dispersiones coloidales, y las más grandes, que forman suspensiones y depósitos (Vernhet 2019).

Las operaciones de clarificación permiten lograr la limpidez y el brillo, que son importantes ya que la primera impresión visual tiene un fuerte impacto en la

percepción de la calidad del vino. La clarificación también contribuye a disminuir las poblaciones de microorganismos (Alejandre, 2007).

Los tratamientos de estabilización tienen diferentes objetivos: evitar la formación de brumas o depósitos en los vinos embotellados, y así preservar la limpidez, y prevenir las alteraciones cualitativas del gusto, el sabor o el color relacionadas con el deterioro por microorganismos o con cambios químicos negativos (Vernhet 2019).

El paso siguiente es la filtración, la cual es una técnica de separación utilizada para eliminar un sólido en suspensión de un líquido haciéndolo pasar a través de un medio filtrante que consiste en una capa porosa que atrapa las partículas sólidas. Existen varios tipos de filtración, que utilizan diferentes medios filtrantes montados en equipos adecuados. En la vinificación se utilizan los siguientes: 1. filtración a través de una precapa de tierra de diatomeas, 2. filtración a través de láminas de celulosa o módulos lenticulares (tierra de diatomeas, perlita, resinas catiónicas, fibras de polietileno, etc.), 3. filtración a través de membranas de polímeros sintéticos con poros calibrados, 4. filtración tangencial a través de membranas inorgánicas u orgánicas (Ribéreau-Gayon et al., 2006).

Posteriormente, según el tipo de vino se procede a la crianza y/o envejecimiento, en esta etapa la bebida se deja reposar en barricas de madera que han sido previamente tostadas. El tipo de madera, el nivel de tostado que tenga y el tiempo de crianza modificaran las notas del vino (Alejandre, 2007).

Durante la crianza se pueden realizar trasiegos, que consisten en trasladar el vino de una barrica a otra para orearlo y eliminar residuos.

Por último, una vez terminado el vino se procede al embotellado, donde se pueden realizar ajustes de acidez y adición de estabilizadores, obteniéndose el vino terminado (Alejandre, 2007).

1.3 Microorganismos asociados a la uva y a la vinificación

Sobre la superficie de las uvas, en el viñedo, se presenta una ecología microbiana compleja compuesta por hongos filamentosos, levaduras y bacterias con diferentes características fisiológicas que impactan de diversas formas en la producción de vino (Carrascosa et al., 2011).

Algunas especies sólo se encuentran en la superficie de las uvas, como los hongos, mientras que otras tienen la capacidad de sobrevivir durante el proceso de vinificación y crecer en los vinos, constituyendo la microbiota típica compuesta por especies de levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas (Carrascosa et al., 2011).

Las uvas dañadas presentan un aumento de las poblaciones de bacterias lácticas y acéticas que afectan a las levaduras durante la fermentación alcohólica. Dicha fermentación se caracteriza por el crecimiento sucesivo de varias especies y cepas de levaduras. A través de las interacciones levadura-bacteria a lo largo del proceso fermentativo se puede determinar la progresión de la fermentación maloláctica y el

potencial crecimiento de bacterias de deterioro en el producto final (Bordet et. al, 2020). Los mecanismos por los que una especie o cepa influye en otra en los ecosistemas de la uva y el vino incluyen: la producción de enzimas líticas, etanol, dióxido de azufre y péptidos similares a las toxinas/bacteriocinas asesinas; el agotamiento de nutrientes, incluida la eliminación de oxígeno, la producción de dióxido de carbono; y la liberación de componentes autolíticos celulares (Fleet, 2003).

La cutícula de las bayas puede sufrir microfisuras, donde la piel se irá ablandando con la maduración y aumentando de este modo, la disponibilidad de nutrientes y la disponibilidad de altas concentraciones de azúcar para que poblaciones ascomicetas oxidativas o débilmente fermentativas colonicen la baya; entre ellas podemos encontrar a: *Candida spp.*, *Hanseniaspora spp.*, *Pichia spp.*, *Zygosaccharomyces spp.* y *Torulaspota spp.*, entre otros. En este momento también pueden aparecer bacterias acéticas como *Gluconobacter spp.* y *Acetobacter spp.* (Barata et. al, 2012).

Otros microorganismos que se asocian a la uva y/o al proceso de vinificación son los hongos superiores. Entre ellos pueden estar presentes *Botrytis cinerea*, agente causal de la podredumbre gris y *Aspergillus spp.*, productor de ocratoxina. Estos hongos sólo son activos en el viñedo, aunque sus metabolitos pueden afectar la calidad del vino durante el procesamiento de la uva (De Simone et. al, 2020).

1.3.1 Principales levaduras vínicas

Durante el proceso de elaboración del vino, varios microorganismos coexisten e interactúan influyendo en la dominancia, la persistencia de las levaduras de fermentación y los perfiles aromáticos y analíticos. También existe un creciente interés en el uso de diferentes especies en fermentaciones mixtas inoculadas donde las interacciones de levaduras juegan un papel fundamental (Ciani et. al, 2016).

Dentro de estas interacciones, se encuentran las especies oxidativas, *Pichia* y *Candida*, que no fermentan o son muy poco fermentativas. Aunque son capaces de crecer en mostos y zumos son miembros importantes de la comunidad de levaduras formadoras de film en el vino almacenado (Fugelsang, 1997)

Las especies de levaduras de fermentación débil *Hansenula anomala* y *Kloeckera apiculata/Hanseniaspora uvarum* se observan al principio de la fermentación y son capaces de producir 2-4% de etanol y altos niveles de ácido acético, acetato de etilo y acetato de isoamilo. Las especies fermentadoras, incluyendo *Brettanomyces/Dekkera*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces* y *Zygosaccharomyces*, son capaces de realizar una fermentación completa, aunque en algunos casos, lenta. Entre las levaduras asociadas a la fermentación cabe destacar *Saccharomyces cerevisiae* (Fugelsang, 2007).

El tamaño de las levaduras es variable, pero se sitúan entre 1 a 5 µm de ancho, por 1 a 28 µm de largo. En cuanto a su forma, varían dependiendo del tipo de reproducción: subesférico o elíptico (*Saccharomyces cerevisiae*), alargado (*Saccharomyces*

pastorianus), limoniforme (*Kloeckera apiculata*), bacilar (*Schizosaccharomyces*), cilíndrico (*Candida mycoderma*) y redondeado (*Torulopsis*) (Togores, 2010).

Togores 2010, describió los principales géneros de levaduras que se encuentran presentes en el mosto:

Género *Candida*

Las células tienen varias estructuras, principalmente presentan formas cilíndricas ovoidales o alargadas (**Figura 3**).

Las levaduras de este género son las responsables de la enfermedad conocida como «flor de los vinos», éstas desarrollan un velo en la superficie en contacto con el aire, produciéndose una degradación de los ácidos fijos del vino, formándose ácido acético y acetaldehído de característico olor almendrado. Un factor limitante para su crecimiento es el contenido en alcohol etílico, siendo 15% v/v el valor máximo tolerable y también necesitan la presencia de aire.

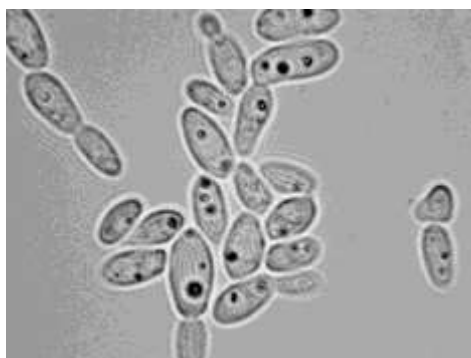


Figura 3: Microfotografía de *Candida vini*. Fuente: <https://wineserver.ucdavis.edu>.

Género *Hanseniaspora*

Son células de forma alimonada o apiculada que se multiplican por gemación bipolar (**Figura 4**).

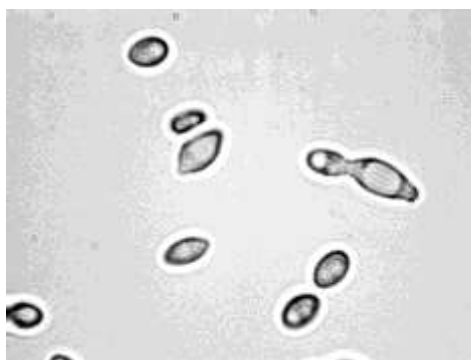


Figura 4: Microfotografía de *Hanseniaspora uvarum*. Fuente: <https://wineserver.ucdavis.edu>.

Son las primeras que aparecen en la uva cuando envera. Al madurar, esta levadura coloniza la baya, es por esto que es conocida como «salvaje». Poseen un débil poder fermentativo, iniciando por lo tanto el proceso de la fermentación alcohólica.

Son levaduras capaces de desdoblar azúcares hasta 4 a 6% vol. de alcohol, y con un rendimiento azúcar/alcohol bastante bajo. Producen grandes cantidades de acidez volátil y acetato de etilo, razón por la cual su presencia en las fermentaciones no es deseada. Puede ser fácilmente eliminada del medio fermentativo, mediante sulfitados moderados ya que tienen poca resistencia al mismo.

En algunas bodegas no se busca eliminarla porque consideran que su presencia aumenta la complejidad aromática de los vinos, por la formación de ésteres de carácter aromático y afrutado.

Género *Hansenula*

La especie más conocida es *Hansenula anomala*, presenta forma oval o globosa (**Figura 5**). Poseen un débil poder fermentativo hasta 4-5 % v/v. Suele desarrollarse sobre la capa superior del sombrero durante la fermentación de tintos, en la superficie del vino o en las paredes de los recipientes que lo contienen, produciendo cantidades importantes de acetato de etilo y algo de ácido acético.

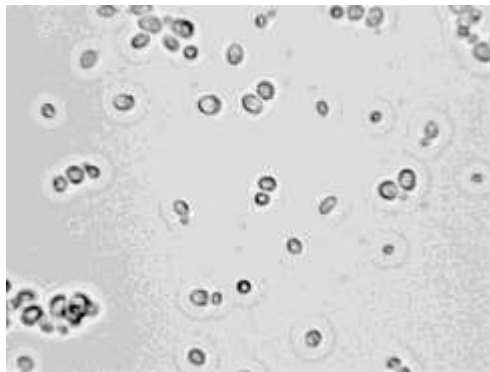


Figura 5: Microfotografía de *Hansenula anomala*. Fuente: <https://wineserver.ucdavis.edu>.

Género *Kluyveromyces*

Esta levadura presenta formas variadas y se multiplican por gemación (**Figura 6**). La especie más común es *Kluyveromyces thermotolerans*, que son células redondeadas aisladas o agrupadas por pares.

Son de lenta multiplicación y bajo poder fermentativo, por lo que no suelen encontrarse en fermentaciones espontáneas. Como ventaja forma grandes cantidades de ácido láctico, alrededor de 1,5 a 1,8 g/L y pequeñas cantidades de ácido acético.

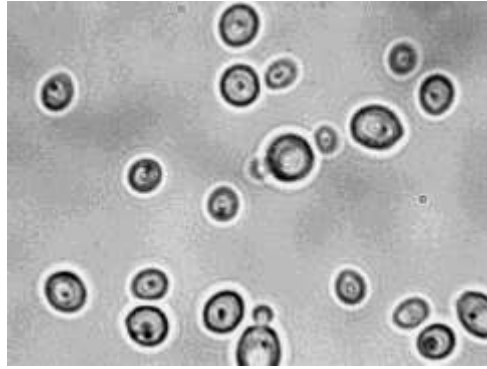


Figura 6: Microfotografía de *Kluyveromyces thermotolerans*.

Fuente: <https://wineserver.ucdavis.edu>.

Género *Saccharomyces*

Estas levaduras son las principales responsables de la fermentación alcohólica de los mostos, incluyendo especies como *Saccharomyces cerevisiae* con elevado poder fermentativo, vigorosas y resistentes al etanol y dióxido de azufre. Las células tienen formas variadas: ovaladas, redondas y alargadas, tal como se observan en la **Figura 7**. Se multiplican por gemación múltiple.

Son capaces de fermentar casi todos los azúcares, excepto los de cinco átomos de carbono. Estas producen una enzima de tipo invertasa la cual es capaz de desdoblarse la sacarosa en glucosa y fructosa aproximadamente en partes iguales.

Dentro de este grupo existen otras especies como: *S. bailii*, *S. bayanus*, *S. oviformis*, *S. uvarum*.

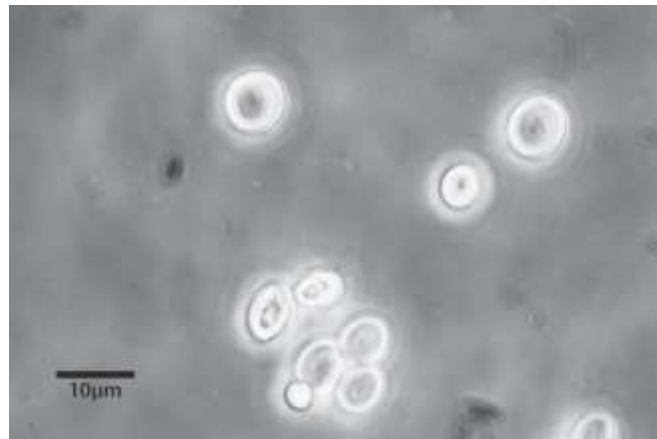


Figura 7: *Saccharomyces cerevisiae* visto con microscopía de contraste de fase a un aumento de 1000x. Fuente: Fugelsang, 2007.

Género *Saccharomycodes*

La única especie de este género es *Saccharomycodes ludwigii*, presenta células apiculadas de gran tamaño (**Figura 8**), algunas alargadas por los extremos. Se suelen encontrar en mostos o vinos fuertemente sulfitados, debido a que poseen una gran resistencia a este antiséptico, y producen en algunas ocasiones refermentaciones sobre los azúcares residuales. Cuando el

nivel de anhídrido sulfuroso desciende, entonces la refermentación se produce con las levaduras dispersas en el medio. También son levaduras «acetógenas» capaces de producir cantidades notables de acetato de etilo. Como producto de su acción se obtienen vinos agrios y de olor desagradable, estando por lo tanto consideradas como levaduras patógenas indeseables.



Figura 8: Microfotografía de *Saccharomyces exiguus*. Fuente: <https://wineserver.ucdavis.edu>.

Género *Zygosaccharomyces*

Células esféricas, elipsoidales o alargadas (**Figura 9**). Se reproducen por gemación multilateral. Son levaduras osmotolerantes, con una buena actividad fermentativa, degradan preferentemente fructosa antes que glucosa. Las especies más extendidas son *Z. bailii*, antes denominada *Saccharomyces bailii*, y *Z. fermentati*.

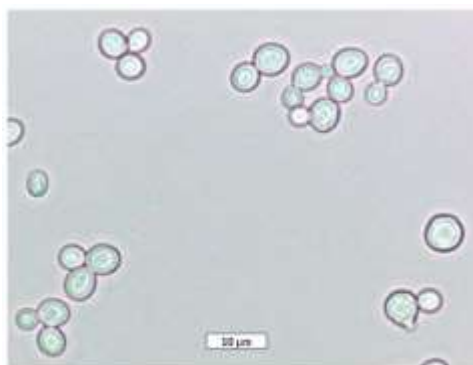


Figura 9: Microfotografía de *Zygosaccharomyces rouxii*. Fuente: Escott et al., 2018.

Género *Brettanomyces*

Son levaduras de multiplicación muy lenta en el mosto. Células de forma esferoidal ligeramente alargada, frecuentemente ojival, presentándose aisladas o por parejas e incluso en cadenas de hasta cuatro o cinco unidades (**Figura 10**). Pueden formar velos en la superficie de los vinos añejados en barricas de madera.

Enológica mente estas levaduras son indeseables, por lo que son consideradas como causantes de alteraciones. Por una parte, se percibe un aroma ligeramente afrutado a manzana, con marcados matices a acetato de etilo, y por otra parte aparece un característico olor defectuoso a «sudor de

caballo» o de tipo animal. Este olor se debe a una transformación de los ácidos cinámicos del vino, de carácter inodoro, en otras sustancias conocidas como etilfenoles. Esta alteración puede producirse en el seno del vino, pero generalmente se produce en vinos mal conservados, donde se desarrolla en su superficie un velo de *Brettanomyces*, y especialmente en la crianza de vinos en barrica. La forma esporógena de las *Brettanomyces* recibe el nombre de *Dekkera*. (Togores, 2010).



Figura 10: Fotografías al microscopio de diferentes morfologías de *Brettanomyces bruxellensis*. Fuente: ACE Revista de Enología www.acenologia.com.

1.3.2 Deterioro microbiano

A lo largo de todo el proceso de elaboración del vino pueden encontrarse varios géneros y especies de microorganismos. Por ejemplo: *Candida*, *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Pediococcus* entre otros (Fugelsang, 2007).

Las levaduras contaminantes más comunes en las uvas y los jugos de uva antes de la fermentación incluyen los géneros *Candida*, *Cryptococcus*, *Hansenula*, *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Pichia* y *Rhodotorula* (Fleet et al., 2002). Estas levaduras no provocan problemas en los vinos embotellados, pero pueden ser motivo de preocupación en las primeras etapas de la producción de vino. Las principales medidas a adoptar en la vinificación para superar los problemas implican la selección de la uva, el aumento del uso de dióxido de azufre y la pronta inoculación de iniciadores activos (Barata et al., 2012).

En la maceración prefermentativa, las levaduras formadoras de película (por ejemplo: *Pichia anomala*) o las levaduras apiculadas pueden crecer muy rápido. Estas especies son fácilmente controladas por medidas de vinificación adecuadas (baja temperatura, anhídrido sulfuroso, higiene). En principio, estas especies se inhiben durante la fermentación, pero incluso durante un breve período, debido a su rápido crecimiento, pueden producir cantidades no deseadas de metabolitos como acetato de etilo (olor a vinagre) o acetaldehído (olor oxidado) (Romano, 2005), que pueden estropear irremediablemente el vino.

Luego, la vinificación implica un desarrollo secuencial de microorganismos, comenzando con las levaduras no-*Saccharomyces*, seguidas de *Saccharomyces*, que normalmente completan la fermentación (Fugelsang, 2007). Completada la fermentación primaria, continúa la fermentación maloláctica inducida por *Oenococcus* y otras bacterias lácticas.

Uno de los últimos pasos de elaboración de vino es la crianza; la distribución de especies de levaduras incluye *Dekkera/Brettanomyces*, levaduras formadoras de film, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, las cuales pueden resultar en un serio deterioro del vino (Fugelsang, 2007).

La fase donde se produzca el deterioro depende de varios factores, tales como: microorganismos presentes, condiciones de la materia prima, daños físicos causados por pájaros o cosechadoras, uso de fungicidas, grado de madurez. También influye el entorno químico y físico de la bodega, por ejemplo: programas de limpieza, saneamiento del establecimiento, mantenimiento y limpieza de la maquinaria y mangueras, etc (Saavedra et al., 2005).

1.4 Levadura *Brettanomyces*

1.4.1 Taxonomía

El origen de la levadura *Brettanomyces* se remota a Gran Bretaña, donde fue aislada por primera vez por Claussen en 1904. Aunque Claussen llamó a su aislado "*Brettanomyces*" (basado en Brettano, cervecero británico y *Myces* que significa, hongo), lo clasificó inicialmente como una especie de *Torula* (Steensels et. al, 2015). Sin embargo, en 1921, Kufferath y Van Laer aislaron una cepa de levadura de las cervezas lambic belgas con las mismas características descritas por Claussen y la clasificaron como *Brettanomyces bruxellensis*. La primera investigación sistemática de las levaduras *Brettanomyces* fue realizada y comunicada por Mathieu Custers en 1940, quien caracterizó 17 cepas diferentes, aisladas de cervezas inglesas y belgas (Steensels et. al, 2015).

Desde su primera descripción, la taxonomía de *Brettanomyces* ha sufrido varias reclasificaciones a lo largo de los años. Al comienzo, sólo se basaba en pocos organismos que se reproducían asexualmente (anamórficos). Pero en 1960, se observó la formación de ascosporas en algunas cepas y se introdujo el género *Dekkera* haciendo referencia a su ciclo teleomorfo (sexual) (Custers, 1940).

En las clasificaciones actuales, las levaduras pertenecientes al género *Brettanomyces* no forman esporas (anamorfos), mientras que el nombre del género *Dekkera* describe las variantes formadoras de esporas (teleomorfo) de la levadura. Sin embargo, actualmente se utilizan a menudo como sinónimos (Oelofse et al., 2008).

En la actualidad, se describen cinco especies, basadas en el análisis molecular de los géneros: los anamorfos *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus* *B. naardenensis*, y *Brettanomyces nanus*, con teleomorfos existentes para las dos primeras especies, *D. bruxellensis* y *Dekkera anomala* (Portugal, 2012).

1.4.2 Procedencia de las poblaciones de *Brettanomyces*

Brettanomyces es un microorganismo que se encuentra en varios sustratos como suelo, cortezas de árboles y sustratos azucarados (frutos, miel). Su detección en uvas

y mostos es poco frecuente debido sobre todo a la gran competencia existente con otros microorganismos mucho más activos (López-Cordón, 2009). No obstante, se han detectado contaminaciones severas en viñedos y bodegas. Principalmente se suele aislar de materiales de bodega, mangueras, depósitos, suelos, lugares donde la higiene es deficiente. Pero donde es más habitual su presencia es en las barricas de madera (Malfeito-Ferreira, 2018).

Esta levadura comienza a desarrollarse después de la fermentación alcohólica. Aproximadamente entre 0-3% del total de levaduras presentes en la uva, pertenecen a *Brettanomyces* que proceden del viñedo (Chatonnet *et.al*, 2013). Estas durante la fermentación alcohólica no tienen la oportunidad de multiplicarse debido a su escasa competitividad respecto a *Saccharomyces cerevisiae* por lo que inician su desarrollo en un vino poco o nada protegido (ausencia de sulfuroso) (López-Cordón, 2009).

Durante la crianza de los vinos en barricas de madera las poblaciones aumentan de manera lenta, pero sin competencia. Aquí se originan los principales riesgos. Es destacable señalar que no hace falta un gran número de células para desarrollar la alteración, y que por encima de **1000 células/mL** la calidad organoléptica del vino está seriamente comprometida (González y Navascués, 2006).

1.4.3 Condiciones óptimas de crecimiento

López-Cordón (2009), describió las condiciones necesarias para que *Brettanomyces* crezca y se desarrolle:

A) Nutrientes: Como fuente de carbono *Brettanomyces* utiliza azúcares residuales presentes en el vino luego de la fermentación alcohólica. Para el desarrollo de una población alterante, 300 mg/L son suficientes.

Es frecuente el desarrollo de *Brettanomyces* en vinos de elevada graduación alcohólica ya que estos proceden de uvas muy maduras, las cuales presentan mayor cantidad de azúcares residuales (en menor medida glucosa y fructosa, y en mayor cantidad pentosas residuales). La trehalosa, azúcar procedente de la autólisis de levaduras, constituye una fuente de carbono importante en los vinos con crianza sobre lías.

La cantidad de azúcares asimilables liberados por la madera de barricas nuevas para *Brettanomyces* es pequeña comparada con la que existe ya de forma natural en los vinos. Las barricas viejas siguen siendo una fuente mucho más importante de contaminación que las nuevas, ya que contienen potencialmente el inóculo y, además, pueden contener ya etilfenoles en su masa porosa.

Brettanomyces presenta una fuerte actividad glicosidasa, capaz de liberar la glucosa ligada a los antocianos. Mediante varias actividades celulolíticas, degradan la celobiosa de la madera de las barricas y la propia reducción de los vinilfenoles en etilfenoles supone un mecanismo de obtención de energía.

En cuanto a compuestos nitrogenados, *Brettanomyces* presenta requerimientos escasos, aunque la presencia de aminoácidos y sales amoniacaes estimula la proliferación celular. De aquí que se aconseje la nutrición adecuada en fermentación alcohólica pero nunca en exceso, sobre todo de sales de amonio.

B) Tiempo: *Brettanomyces* se caracteriza por poseer un metabolismo lento, por lo que el factor tiempo es requisito fundamental para el desarrollo de poblaciones alterantes. Es por esto, que el lugar propicio de crecimiento son las barricas donde el vino es añejado por un período prolongado. Efectivamente, la reutilización de las mismas contribuye en gran medida a acentuar el problema, ya que buena parte de las células de *Brettanomyces* permanecen en la madera después del trasiego, resisten al proceso de limpieza, y el vino nuevo con el que se rellena la barrica supone una renovación del sustrato, sobre el que se desarrollará una población más importante.

C) Temperatura: El crecimiento de *Brettanomyces* se ve favorecido con la temperatura, como la mayoría de los microorganismos. Por otro lado, presenta actividad a bajas temperaturas y tan solo por debajo de 8°C se inhibe su crecimiento.

D) Presencia/ausencia de oxígeno: Dicha levadura puede desarrollarse en anaerobiosis estricta pero además la presencia de oxígeno favorece su crecimiento y la síntesis de acidez volátil.

Todas estas condiciones de crecimiento se resumen en la **Figura 11**.

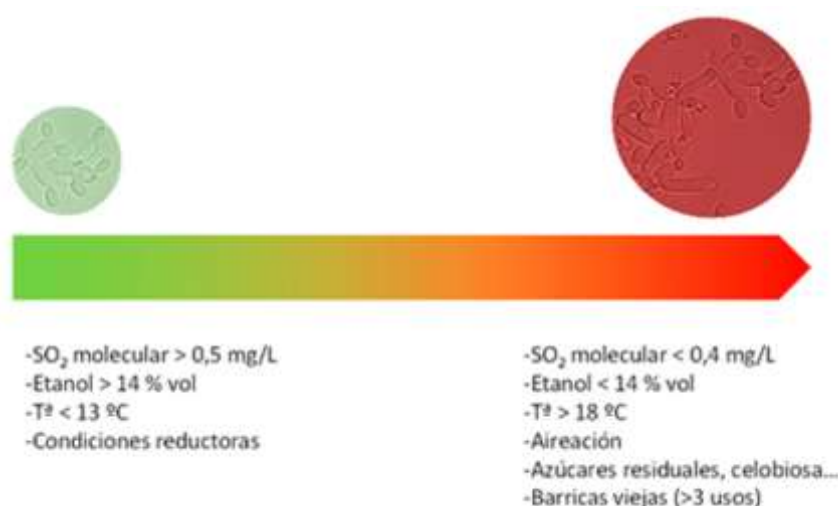


Figura 11: Condiciones enológicas evitan el crecimiento (verde). En rojo condiciones que favorecen el desarrollo de *Brettanomyces* en barrica. Fuente: ACE Revista de Enología www.acenologia.com.

Luego de describir las condiciones necesarias para el desarrollo de *Brettanomyces*, López-Cordón (2009) concluyó que:

- Los vinos procedentes de uvas en el punto correcto de maduración fenólica, con elevado grado alcohólico y por lo tanto mayor proporción de azúcares residuales, suponen un aumento del sustrato disponible para la levadura *Brettanomyces*.
- Las maceraciones prefermentativas en frío, proporcionan tiempo y sustrato para el desarrollo de las poblaciones procedentes de la uva.
- La crianza sobre lías enriquece el medio en factores nutritivos (trehalosa y sustancias nitrogenadas) y la autólisis de las levaduras.
- El empleo, cada vez más habitual, de la microoxigenación favorece el desarrollo del microorganismo, tanto de manera directa, al implicar una mayor presencia de oxígeno, como indirecta, favoreciendo la combinación del sulfuroso libre o implicando un retraso en el inicio de la fermentación maloláctica (Arvik y Henick-Kling, 2002).
- La crianza en madera, además de sustrato, supone la permanencia del vino en su contacto, aportando el tiempo imprescindible para su desarrollo.
- La tendencia hacia la reducción de las dosis de sulfuroso en la elaboración, es uno de los factores que más ha contribuido a la extensión del problema. Precisamente, el sulfuroso es un instrumento eficaz y permitido para el control de *Brettanomyces*.
- Por último, la salida al mercado de vinos sin clarificar, sin estabilizar y por supuesto sin filtrar, hace que posible la presencia del microorganismo al final del proceso y la formación de etilfenoles en la propia botella. (López-Cordón, 2009)

Otra condición importante descrita por Loureiro & Malfeito-Ferreira 2006, es que *Brettanomyces* tiene mayor incidencia en los vinos tintos que en los vinos blancos. La pérdida de viabilidad en los vinos blancos se debe en gran medida a la eficacia del dióxido de azufre a bajo pH. Los vinos blancos no presentan el carácter aromático de *Brettanomyces* debido a la ausencia de compuestos precursores (Chatonnet et al., 1992).

1.4.4 Alteraciones en el vino

La fermentación tanto alcohólica como maloláctica en la elaboración del vino es el resultado de una compleja interacción biológica y bioquímica entre levaduras, bacterias (lácticas y acéticas) y hongos filamentosos presentes en las bayas, los mostos de uva y el vino en distintas fases (Barata et. al, 2012).

La composición organoléptica del vino está directamente determinada por la variedad de la uva y de los microorganismos que pueden afectarlo mediante la producción y excreción de metabolitos durante el crecimiento y a través de la autólisis de los

mismos (Fleet y Heard,1993). La participación de los microorganismos en el vino debe ser controlada para evitar cualquier impacto negativo en la calidad organoléptica del producto final.

En algunos casos, el crecimiento de ciertas levaduras como especies de *Brettanomyces* puede provocar defectos en el vino y el consiguiente deterioro del mismo. Dependiendo de las condiciones y de los precursores disponibles (ácidos hidroxicinámicos, también llamados ácidos fenólicos), este género de levadura puede producir “fenoles volátiles” cuando crece y/o envejece en el vino (Godoy et. al, 2008). Estos compuestos son 4-etilfenol, 4-etilguayacol (**Figura 12**). Dependiendo de su concentración, pueden considerarse componentes normales o como causantes del deterioro de la calidad del vino (Caboni et al., 2007).

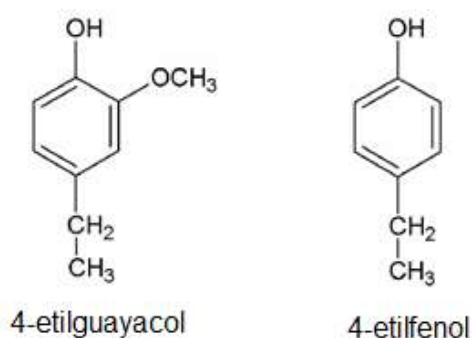


Figura 12: Fenoles volátiles producidos por *Brettanomyces*. Fuente: Chatonnet et. al, 1992.

En niveles bajos, sensorialmente, se acepta la presencia de estos productos, que pueden dar un carácter distintivo de envejecimiento en vinos tintos jóvenes. Contribuye favorablemente a la complejidad del aroma al aportar notas de especias, humo, cuero y atributos sensoriales de amargura y astringencia (López-Cordón, 2009).

López-Cordón (2009) afirma que cuando los niveles de los fenoles volátiles de bajo peso molecular superan el umbral de percepción (0,18 mg/L para el 4-etilguayacol y 0,44 mg/L para el 4-etilfenol), *Brettanomyces* puede inducir potencialmente el deterioro relacionado con olores medicinales o de corral. Además, *Brettanomyces* es responsable de los olores fenólicos típico olor a ratón, sudor de caballo o rancio; resultado de las tetrahidropiridinas (2-etiltetrahidropiridina, 2-acetiltetrahidropiridina y 2-acetilpirrolina) sintetizadas por *Brettanomyces bruxellensis* a partir de lisina y etanol. También, la expresión de actividad β -glucosidasa libera antocianidinas, deglucosilando los antocianos, y afecta de forma notable a la estabilidad de color (**Figura 13**).

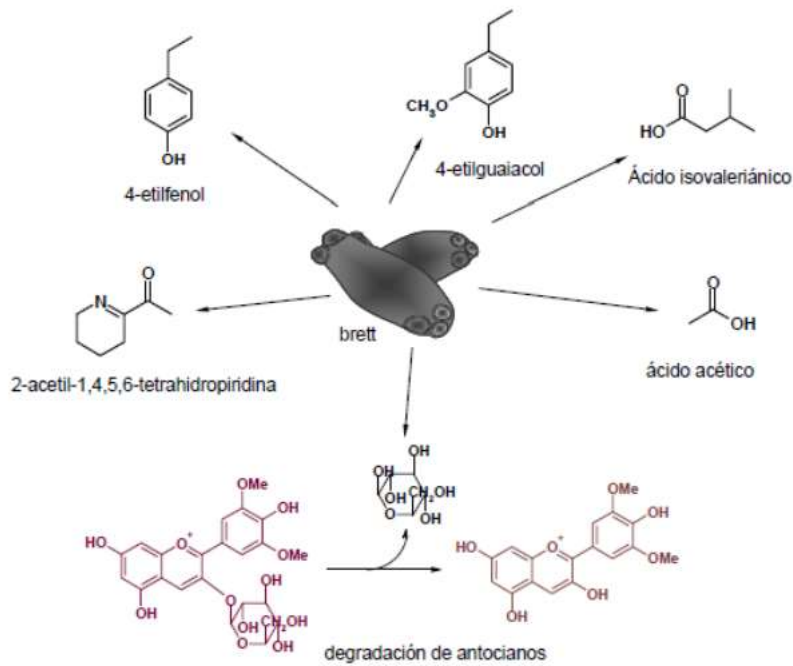


Figura 13: Defectos sensoriales producidos por *Brettanomyces*. Fuente: López-Cordón, 2007

Entre todos los fenoles volátiles que el género *Brettanomyces* puede producir, la formación de 4-vinilfenol y 4-etilfenol del ácido p-cumárico es sin duda la reacción más predominante en términos de cantidad y frecuencia (López-Cordón, 2009).

En las primeras etapas de elaboración del vino con las prácticas de maceración, pectolíticas y preparaciones enzimáticas que contengan cinamil esterase se promueve la formación de ácido hidroxicinámico. Este ácido es el precursor del sabor desagradable fenólico sintetizado por *Brettanomyces* (Comitini et al., 2019).

En los siguientes pasos de la elaboración de vino tinto, el manejo adecuado de la fermentación alcohólica y maloláctica es crítico. Fermentaciones atascadas o lentas, pH por encima de 3,60, altas temperaturas, técnicas de microoxigenación, tratamiento con sulfito ineficiente durante el envejecimiento, permiten el desarrollo de *Brettanomyces* (Barrado & Lepe, 2020).

Brettanomyces es capaz de formar 4-etilfenol y 4-etilguaiacol a partir de ácidos p-cumárico y ferúlico de la uva gracias a la acción secuencial de una cinnamato descarboxilasa que conduce a los vinilfenoles correspondientes y de una vinilfenol reductasa que reduce a continuación la unión vinílica obteniendo finalmente los fenoles, reacción que se observa en la **Figura 14** (Flanzy, 2000).

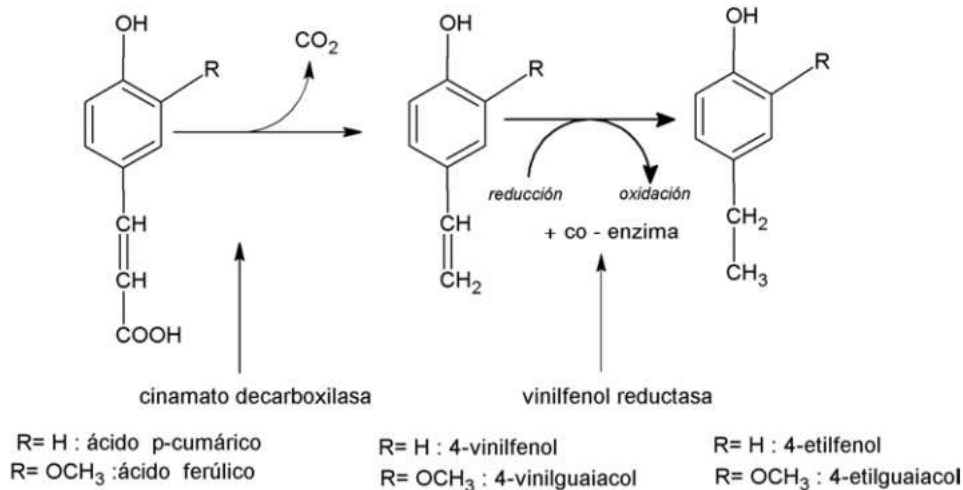


Figura 14: Síntesis de fenoles. Fuente: Chatonnet et. al, 1992.

Durante la fermentación alcohólica, *Brettanomyces* compite con distintos microorganismos típicos del proceso. *Saccharomyces cerevisiae* es el responsable del proceso de fermentación es por eso que, *Brettanomyces* tiene pocas posibilidades de imponerse (Portugal, 2012).

Al finalizar el proceso de fermentación, las condiciones benefician el crecimiento de *Brettanomyces* sobre otros microorganismos (Barrado & Lepe, 2020). Los altos niveles de etanol y los bajos niveles de azúcar, pH y oxigenación hacen que otras células de levadura, como *Saccharomyces cerevisiae*, sufran autólisis. Sin embargo, *Brettanomyces* tiene una resistencia excepcional a las condiciones alcohólicas en un entorno de nutrientes mínimos y unas características de crecimiento lento. Además, cuando el vino se almacena para su envejecimiento en barricas de madera, la microestructura porosa de las barricas de roble permite la entrada de oxígeno, lo que favorece el crecimiento de *Brettanomyces* (Tubia, 2018).

1.5 Tratamientos desodorizantes

En el Tratado de Enología de Togores 2010, se nombran algunos de los métodos que se utilizan para eliminar o reducir aromas indeseados en la industria vitivinícola:

Los olores anormales en los vinos pueden ser eliminados total o parcialmente mediante diversos tratamientos. El método más difundido es el carbón, aunque no es el único. También se pueden utilizar otras sustancias como el trigo o la cebada tostada, la harina de mostaza, los aceites, la leche, etc.

Los aceites actúan como desodorante por extracción de las sustancias liposolubles, siendo necesario realizar una emulsión enérgica en el vino, esperando que por diferencia de densidad el aceite suba a la superficie del vino, donde se debe separar con cuidado para que no queden restos en el mismo. Una posterior filtración realizada sobre celulosa a baja presión permite

eliminar los restos de aceite que pudiera contener el vino tratado. Se pueden utilizar aceites vegetales totalmente neutros y refinados, aunque posiblemente el aceite de parafina es el más adecuado, pudiendo aplicarse dosis del orden de 10 a 50 mL/hL. Los aceites también se pueden utilizar añadidos sobre la superficie del vino, en una capa de pequeño espesor, para impedir su oxidación al evitar el contacto con el oxígeno del aire.

La leche entera es también otro producto desodorante eficaz, especialmente cuando se trata de olores a humedad procedentes de una vendimia podrida, actuando por la materia grasa que contiene, además de coagular y sedimentar bajo la acidez de los vinos. Las dosis oscilan entre los 200 a 500 mL/hL.

La eliminación de los olores azufrados o de reducción por la acción de las levaduras, donde entre ellos destacan los del sulfuro de hidrógeno (SH₂) olor característico a huevos podridos, no presenta dificultad alguna, pues a veces es suficiente con una aireación del vino para eliminarlo, o bien mediante un simple tratamiento con sulfato de cobre. Sin embargo, cuando los olores a reducción proceden de los mercaptanos o tioles, también de olores nauseabundos, entonces el tratamiento es mucho más difícil y a veces imposible de eliminar del todo. Con este motivo siempre se recomienda realizar un tratamiento tan pronto aparezca en el vino un olor a sulfuro de hidrógeno, y antes de que esta sustancia se combine con otras formando compuestos más estables. (Togores, 2010, pp 1475-1476)

1.5.1 Tratamiento para 4-etilfenol y 4-etilguayacol

Los compuestos fenólicos del vino se dividen generalmente en dos grupos, flavonoides y no flavonoides, en función de su esqueleto de carbono. Los flavonoides incluyen antocianinas, monómeros y polímeros de flavan-3-ol y polímeros, flavonoles y dihidroflavonoles (Jin et. al, 2009). La estructura química de los compuestos flavonoides está basada en 15 átomos de carbono, incluyendo dos anillos de benceno unidos por una cadena lineal de tres carbonos, mientras que estructura de los no flavonoides presenta un anillo aromático primario unido a uno o tres carbonos (Karak, 2019).

La mayoría de los no flavonoides que se encuentran en las uvas son ácidos hidroxicinámicos, ácidos hidroxibenzoicos (ácido gálico, producto de la hidrólisis de los taninos de la uva o del roble), estilbenos (resveratrol) y alcoholes fenólicos (Castillo-Sánchez et. al, 2008).

Esta clasificación de fenoles no-flavonoides y flavonoides se observa en la **Figura 15**:

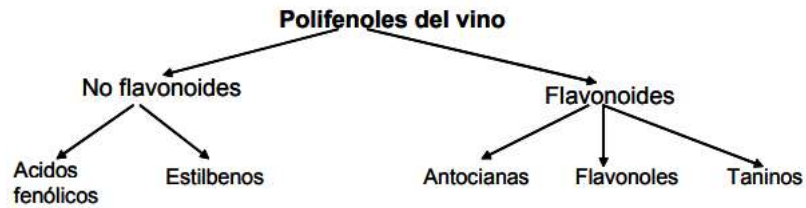


Figura 15: Polifenoles presentes en el vino. Fuente: Catania & Avagnina, 2007.

Los diferentes compuestos presentes en el vino son principalmente derivados de los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido cafeico, el ácido *p*-cumárico, el ácido ferúlico y el ácido sináptico (**Figura 16**) (Rentsch, Wilkens & Winterhalter, 2009).

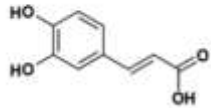
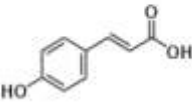
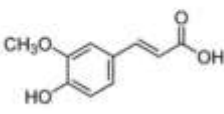
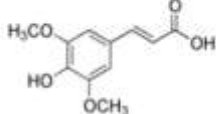
Ácido cafeico	Ácido <i>p</i>-Cumárico
$C_9H_8O_4$	$C_9H_8O_3$
	
Ácido ferúlico	Ácido sináptico
$C_{10}H_{10}O_4$	$C_{11}H_{12}O_5$
	

Figura 16: Principales ácidos hidroxicinámicos. Fuente: Díaz García, 2012.

1.5.1.1 Lías de levaduras

Las lías son uno de los subproductos más importantes de las bodegas. Se definen como el residuo que se forma en el fondo de los recipientes que contienen vino tras la fermentación, durante el almacenamiento o después de diversos tratamientos como filtración o centrifugación (Pérez-Serradilla & De Castro, 2008).

Las lías del vino están compuestas principalmente por microorganismos (levaduras muertas), ácido tartárico, materia inorgánica y compuestos fenólicos. La literatura también ha informado de la presencia de antocianinas y otros compuestos fenólicos como constituyentes (Morata et al., 2003).

Se utilizan en el vino y participan activamente en la adsorción de compuestos fenólicos. Se produce una interacción entre los polifenoles del vino y las proteínas mediante enlaces de Van der Waals. Aunque esta interacción es limitada, tiene un efecto pronunciado en la composición fenólica del vino. Existe una correlación entre la

adsorción de polifenoles y la presencia de levaduras vivas o muertas en el vino (Kheir, 2013).

La extracción de los fenoles de la uva es un aspecto clave de la elaboración del vino tinto. Los compuestos fenólicos se encuentran principalmente en los hollejos y semillas de las uvas *Vitis vinifera*. Es por esto, que durante la elaboración de vino tinto se deja el líquido parcialmente fermentado en los hollejos para extraer más taninos, color y sabor (Arkell y George 2003). Sin la maceración, el vino elaborado con uvas de piel oscura es simplemente rosado (Robinson & Harding 1999). El proceso combinado de fermentación y maceración puede durar entre 24 horas y 3 semanas, dependiendo del color del producto final necesario. La agitación del mosto antes, durante y después de la fermentación primaria, se sabe que aumenta la extracción de fenoles (Ough y Amerine 1961).

Los compuestos fenólicos se transfieren de la uva al vino durante la maceración, pero una elevada proporción de estos compuestos permanece en los subproductos de la vinificación, como las lías. Las lías del vino contienen compuestos fenólicos debido a la capacidad de adsorción de la pared celular de la levadura (Morata et al., 2005). El perfil fenólico en las lías depende del tipo de uva triturada y de otros factores presentes durante la vinificación (Mena et al., 2014).

El mecanismo de adsorción depende del tipo y cantidad de los diferentes compuestos fenólicos, así como de otras variables, como la variedad de uva, el grado de madurez de las bayas, el método de maceración y la temperatura de fermentación (Ye, Harrison, Cheng, & Bekhit, 2015).

La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* representa 15-30% del peso seco de la célula, dependiendo de las condiciones de crecimiento (Dimopoulou, Lonvaud-Funel & Dols-Lafargue, 2017), y está formada por capas de polisacáridos diferentes e interconectadas. La capa exterior está formada por manoproteínas, conectadas a una matriz de β -1,3 glucano amorfo, mientras que la capa interna está formada por β -1,3 glucano fibroso, sobre una pequeña cantidad de quitina (**Figura 17**) (Lipke & Ovalle, 1998).

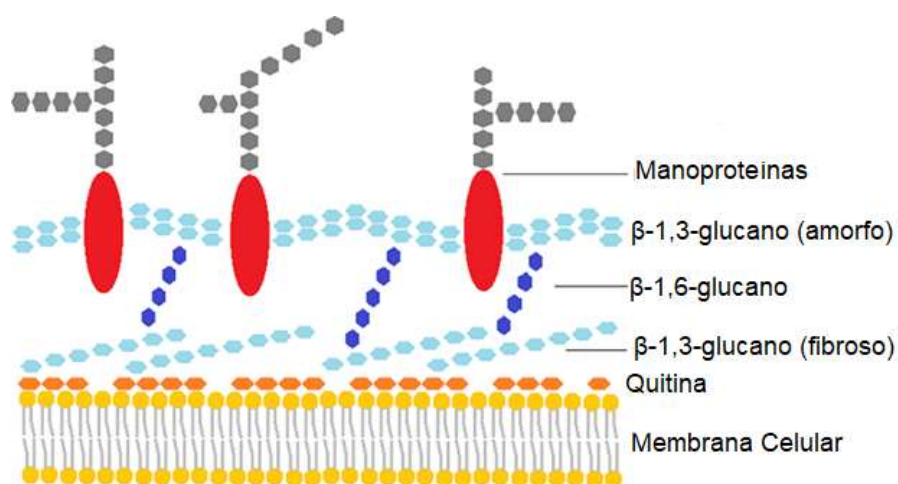


Figura 17: Organización de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Fuente: De Iseppi et al., 2020.

En la industria vitivinícola los residuos generados son principalmente de carácter orgánico, originando orujo de uva en un 63%, lías en un 13% (residuos sólidos, principalmente desechos de levaduras), tallos o raquis en un 12% y lodos desecados en un 12%. De estos, solo los dos primeros son usualmente utilizados en otros procesos (orujo de uva y lías), mientras que el resto de los desechos orgánicos son tradicionalmente incinerados o desechado en terrenos (Burg et al., 2014).

Actualmente la mayoría de las bodegas destinan las lías de vinificación a obtener alcohol por destilación (Dimou et al., 2016) y ácido tartárico salificado por cristalización. No obstante, hay otras que acumulan lías junto con otros subproductos vitivinícolas para la realización de compost (Braga et al., 2002).

1.5.1.2 Polivinilpolipirrolidona (PVPP)

El PVPP, es un clarificante sintético ampliamente usado en la industria vitivinícola para disminuir el contenido de taninos y otros polifenoles y así lograr combatir la tendencia al pardeamiento, reducir la astringencia y corregir el color.

Este clarificante mejora la estabilidad de los vinos eliminando los compuestos fenólicos susceptibles de oxidarse y polimerizarse, que comprometen en el tiempo el color, la limpidez y las cualidades organolépticas de los vinos (Jiménez Martínez, 2018).

El PVPP se obtiene a partir de la polimerización de la vinilpirrolidona. El producto que deriva está formado por macromoléculas organizadas en red (**Figura 18**). El modo de acción de este compuesto es por adsorción (Ribéreau-Gayon et. al, 2021).

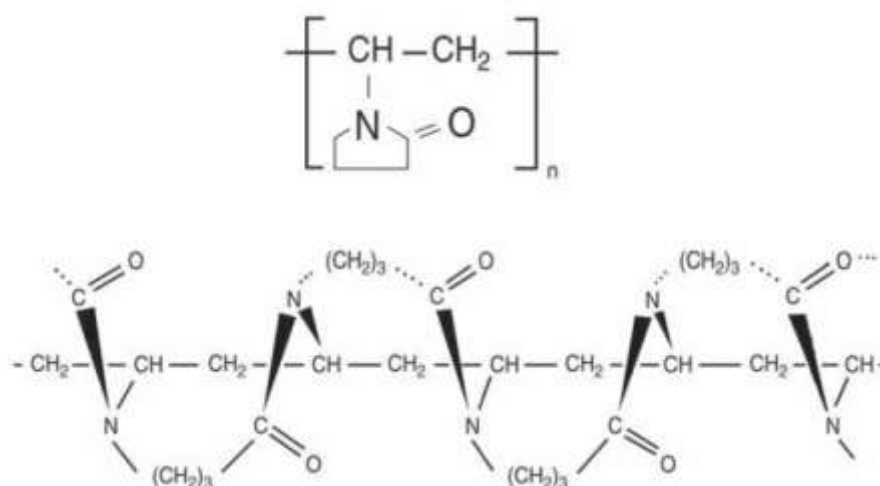


Figura 18: Estructura de la polivinilpolipirrolidona (PVPP). Fuente: Togores, 2010.

El PVPP adsorbe selectivamente los compuestos fenólicos por formación de puentes de hidrógeno entre el grupo hidroxil fenólico y el enlace amida de la PVPP (**Figura 19**) (Mierczynska-Vasilev & Smith, 2015). De esta forma, arrastra consigo los compuestos fenólicos que a él se enlacen, eliminándolos del medio. Dentro del grupo de polifenoles, el PVPP adsorbe preferentemente aquellos que poseen un mayor grado de hidroxilación (taninos fundamentalmente) (Togores, 2010).

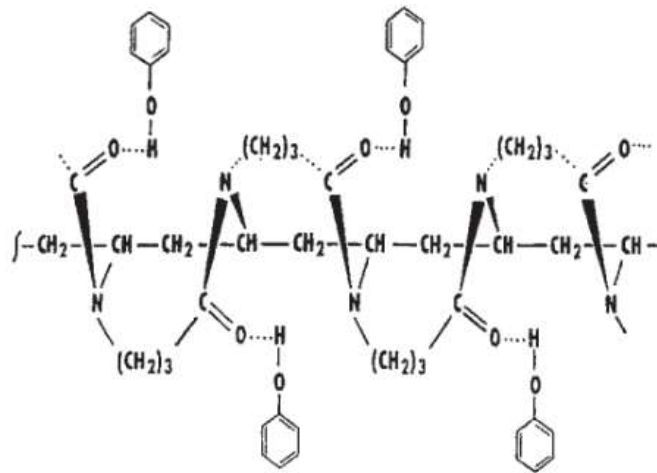


Figura 19: Mecanismo de fijación de los polifenoles por el PVPP. Fuente: Molina, 2000.

Según el grado de polimerización, el PVPP adsorbe selectivamente, de forma decreciente: compuestos antocianógenos >> catequinas >> flavonoles >> ácidos fenólicos ⁽¹⁾.

El PVPP presenta gran afinidad por los polifenoles, de forma que, debido a su particular insolubilidad en medio hidroalcohólico, está especialmente adaptado para eliminar los compuestos fenólicos del medio (Togores, 2010).

Su selectividad y afinidad puede ser complementaria de tratamientos con caseína o bentonita, pero no puede ser reemplazada por estos dos productos (Mierczynska-Vasilev & Smith, 2015).

Los compuestos fenólicos del vino forman habitualmente complejos solubles con las proteínas, siendo frecuente constatar una disminución en valor de proteínas después de un tratamiento con PVPP (Laborde et. al, 2006).

¹ Bibliografía: Ficha técnica de POLYEX PVPP. Proveedor: OenOfFrance

2. Hipótesis y objetivos

2.1 Hipótesis

A partir de una revisión bibliográfica se podrán hallar insumos de bajo costo y prácticos para disminuir la concentración de etilfenoles provocados por la levadura *Brettanomyces spp.* en vinos tintos terminados.

2.2 Objetivos generales y particulares

Objetivo general

- Proponer insumos que se utilizan habitualmente en bodega, que permitan disminuir los fenoles volátiles como 4-etilfenol y 4-etilguayacol en vinos tintos, que a la vez de efectivos sean económicos y prácticos.

Objetivos particulares

- Describir el uso de lías de levaduras provenientes de la fermentación alcohólica para la disminución de fenoles volátiles presentes en el vino y causados por la acción de la levadura *Brettanomyces*.
- Describir el uso de la polivinilpolipirrolidona (PVPP) en la disminución de fenoles volátiles presentes en el vino y causados por la acción de la levadura *Brettanomyces spp.*

3. Antecedentes, descripción de materiales, fuentes y resultados bibliográficos

La producción de vinos requiere de gran atención a los posibles ingresos de sustancias químicas o agentes microbiológicos durante la vinificación y crianza. Como resultado de estas contaminaciones, puede suceder la presencia de malos olores, siendo muy negativos para la calidad sensorial del vino. Entre los defectos que pueden aparecer, se encuentra el provocado por fenoles volátiles, entre ellos el 4-etilfenol y 4-etilguayacol, los cuales son particularmente perjudiciales. El descriptor asociado con estos fenoles en el vino se conoce generalmente como aroma a establo, animal sudado y picante (Lisanti et al., 2017). En los vinos estos descriptores organolépticos están asociados a la presencia y desarrollo de levaduras *Brettanomyces spp.*

Es muy difícil revertir la situación de un vino en donde se han desarrollado estos aromas productos de la contaminación con esta levadura. Se requieren técnicas que resultan costosas y a la vez disminuyen la calidad global del vino.

En consecuencia, en el presente trabajo se busca aportar conocimientos acerca de ciertos insumos que resultan económicos y prácticos, para disminuir la presencia de estos fenoles volátiles presentes en el producto final.

Según la bibliografía consultada existen dos posibles insumos que podrían aplicarse para tal fin. Una es el uso o el contacto del vino con las lías de levaduras y el otro es el uso o aplicación de PVPP, usados para favorecer la extracción de taninos y como clarificante respectivamente. Actúan mediante el fenómeno de adsorción y podrían ser útiles para disminuir la presencia de estos aromas desagradables en el vino.

La adsorción corresponde a la transferencia de una molécula de la fase líquida hacia la fase sólida. Este fenómeno obedece a las leyes de equilibrio entre la concentración en fase líquida y la concentración en fase sólida, sobre la superficie del material adsorbente (Soto Álvarez, 2015).

Una herramienta económica sería el uso de lías de levaduras obtenidas una vez completada la fermentación alcohólica cuando las levaduras comienzan un proceso de autólisis por la liberación de una enzima llamada autolisasa, que causa un efecto de hidrólisis celular. Las células van decantando al fondo del tanque de fermentación donde se depositan. Las paredes celulares de las levaduras tienen la capacidad de unir diferentes compuestos del vino, por lo que su uso resulta interesante para eliminar compuestos indeseables presentes en el mosto que afectan la fermentación alcohólica o que tienen un impacto negativo en la calidad del vino (Jiménez-Moreno & Ancín-Azpilicueta, 2009).

Es importante tener en cuenta que las paredes de levadura también pueden adsorber en su superficie compuestos aromáticos deseables. Lubbers (1994) afirma: “Grandes cantidades de compuestos aromáticos, especialmente los más hidrofóbicos, tales como alcohol isoamílico, octanal, hexanoato de etilo, octanoato de etilo y 13-ionona, podrían perderse si los mostos se procesan con grandes cantidades de paredes de levadura”.

Por otro lado, Lisanti et. al 2017 evaluaron una serie de clarificantes, entre ellos carbón activado (20 g/hL), zeolita (20 g/hL) y **PVPP** (80 g/hL), en base a su eficacia en la

disminución de la concentración de 4-etilfenol y 4-etilguayacol, resultando el PVPP como el más efectivo y concluyendo que el mismo presenta gran afinidad por los polifenoles.

Existen otras sustancias que también pueden adsorber aromas como son la caseína y la albúmina, pero estos clarificantes son proteínas declaradas potencialmente alérgicas. Debido a ello no estarían dentro de las posibilidades de ser elegidas, además de ser compuestos más costosos (Efsa Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies, 2011).

Otra técnica muy utilizada en las bodegas es el quitosano de origen fúngico. Taillandier et al. 2015, demostró que el quitosano puede inducir efectos tanto físicos como biológicos en las células de *Brettanomyces bruxellensis*: fenómenos de adsorción debido a interacciones electrostáticas que conducen a la agregación y sedimentación de las células y daños en la membrana celular que conducen a la fuga de ATP y, por lo tanto, a pérdida drástica de viabilidad de las células de *Brettanomyces bruxellensis*. Así, el modo de acción antimicrobiano del quitosano contra dicha levadura no es un mecanismo simple sino el resultado de varios mecanismos que conducen a una disminución neta de la concentración de células viables en el medio. Debido a que este compuesto actúa directamente sobre el microorganismo es que no será considerado en la presente revisión.

Tanto las lías de levaduras como el PVPP son insumos enológicos relativamente económicos y fáciles de adquirir, que podrían ser útiles para recuperar vinos donde *Brettanomyces* produjo fenoles volátiles como 4-etilfenol y 4-etilguayacol.

3.1 Lías de levaduras

Chassagne et al. 2005, estudiaron diferentes tipos de lías de levadura para determinar su capacidad de adsorción de fenoles volátiles. Los tratamientos que utilizaron fueron: *i.* levadura seca activa (LSA), *ii.* levadura de fermentación de un vino sintético, *iii.* levaduras de una fermentación convencional de vino blanco variedad Chardonnay (etanol 12% (v/v), pH 3,05), *iv.* levaduras de una fermentación convencional vino tinto variedad Pinot Noir (etanol 13% (v/v), pH 3,40).

Aquellas lías procedentes de fermentaciones se recuperaron mediante centrifugación durante 10 minutos a 10°C, al finalizar la fermentación alcohólica.

Para el ensayo se formuló un vino sintético con el fin de tomarlo como modelo y para aplicar los tratamientos, al cual se le ajustó el pH a 3,5 con hidróxido de sodio 5M. A este mismo vino se le añadieron 4-etilfenol y 4-etilguayacol en concentraciones de 1000 y 500 µg/L, respectivamente. Además 15 g/L de lías de levadura. Las muestras se almacenaron a 15°C en una sala oscura sin agitación.

La cantidad absorbida de fenoles volátiles se calculó a partir de la diferencia de concentración entre las muestras control y los tratamientos. Para cada experimento, el análisis de fenoles por cromatografía gaseosa (CG) se realizó por duplicado.

Si bien el ensayo de sorción se realizó a lo largo de 62 h, en este reporte se demostró que en el vino sintético modelo, durante las 2 primeras horas se adsorbieron la mayor cantidad de fenoles volátiles ya que luego de ese tiempo no observaron pérdidas significativas.

En la tabla 1, se pueden observar los valores del coeficiente de partición (K_{masa})⁽²⁾ tanto para 4-etilfenol como para 4-etilguayacol, entre la solución modelo y la levadura.

Tabla 1: Coeficiente de partición de 4-etilfenol y 4-etilguayacol para concentraciones volátiles de **1000 µg/L** y **500 µg/L**, respectivamente, en vino sintético modelo (Chassagne et. al, 2005).

Tipo de lías de levadura	Coeficiente de partición	
	4-etilguayacol	4-etilfenol
Levadura seca activa	27,3 ± 3,5	18,9 ± 4,9
Levadura de fermentación en medio sintético	27,3 ± 5,6	32,7 ± 0,5
Lías de levadura de Chardonnay	50,6 ± 8,3	45,3 ± 9,6
Lías de levadura de Pinot Noir	87,0 ± 27	909 ± 54

Los resultados revelaron que la capacidad de sorción de la levadura no se ve modificada por el proceso de fermentación. Las lías de levaduras fueron capaces de disminuir la concentración de 4-etilguayacol un 26%, mientras que el 4-etilfenol disminuyó un 33%.

Finalmente, Chassagne et al. 2005, concluyeron que la adsorción de solutos se produce predominantemente por unión superficial entre los fenoles a la levadura y que los sitios disponibles en el sorbente podrían ser el factor limitante para la sorción.

Mediante un diseño factorial, demostraron que el estado de autólisis juega un papel positivo en el proceso de sorción, pero el pH (3.00 – 4.00), la temperatura (10 – 15 °C) y el contenido de etanol (10- 15 % v/v), tienen un efecto negativo cuando sus valores aumentan, es decir, disminuye el porcentaje de sorción cuando estos parámetros aumentan, esto podría deberse a la presencia de enlaces polares además de las interacciones hidrofóbicas entre los fenoles volátiles y la superficie de la levadura. El aumento del pH aumentaría el grado de ionización de los grupos negativos presentes en la biomasa.

El parámetro fisicoquímico que más influye de manera negativa en la sorción es el contenido de etanol. Este tiende a elevar la solubilidad de los fenoles volátiles en la fase líquida, lo que podría contribuir a la disminución de la sorción por parte de la levadura.

Finalmente, se concluyó que las lías de levaduras fueron efectivas en la disminución 4-etilfenol y 4-etilguayacol y que el estado de autólisis de la levadura y el bajo contenido de etanol aumentan el nivel de sorción de estos fenoles; aportando de esta manera un enfoque rentable y eficiente para eliminar o disminuir los defectos organolépticos en el vino.

² Coeficiente de partición: relación de las concentraciones en equilibrio de una sustancia disuelta en un sistema bifásico consistente en dos disolventes considerablemente inmiscibles.

En el año 2009, Jiménez-Moreno & Ancín-Azpilicueta, demostraron que es posible reducir el contenido de 4-etilfenol y 4-etilguayacol de un vino contaminado con *Brettanomyces* usando como aditivo enológico lías de levaduras.

En este estudio también se preparó un vino sintético diluyendo 6 g de ácido tartárico y 130 ml de etanol en 1 litro de agua desionizada, ajustando el pH de la solución a 3.2 con NaOH 3M.

Por un lado, a una alícuota de 100 ml de esta preparación se le añadió una mezcla de 4-etilfenol y 4-etilguayacol en una concentración de 1 mg/L de cada uno de ellos. Además, se le agregaron 5 g/L de lías de levaduras provenientes de *Saccharomyces cerevisiae*. El mismo vino sintético se conservó sin agregado de levadura para ser tomado como testigo.

También se estudió el comportamiento de adsorción cuando los compuestos volátiles se agregaban por separado, es decir, por un lado 4-etilfenol y por otro, 4-etilguayacol.

Ambas pruebas se llevaron a cabo con y sin condiciones de agitación, para observar si la presencia de aire influía en la cantidad adsorbida de fenoles. La temperatura de incubación que se utilizó fue de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Se midió la concentración de fenoles volátiles a diferentes tiempos de contacto entre las lías de levadura y los fenoles. Una vez determinado el tiempo de equilibrio³ para el 4-etilfenol y el 4-etilguayacol, se cuantificó mediante cromatografía gaseosa (CG).

El porcentaje de sorción representa la diferencia entre la concentración del compuesto volátil en la muestra control y la concentración de este compuesto en la muestra con lías de levadura.

Como resultado de este estudio, se observó que la unión del 4-etilfenol y 4-etilguayacol a las lías de levadura fue muy rápida. Para ambos fenoles volátiles, el tiempo de equilibrio necesario fue de tres horas, aunque después de las dos primeras horas apenas se observaron cambios importantes en la concentración de los compuestos. Este resultado es similar al de Chassagne et al. 2005, que reportó 2 h para que se realice la máxima sorción. Debido al corto tiempo de proceso, se considera probable que estos compuestos se unieran a la superficie más externa de las paredes de la levadura, que está formada por manoproteínas y estas macromoléculas serían las principales responsables de la unión de los fenoles volátiles.

Más aún, Jiménez-Moreno & Ancín-Azpilicueta 2009, proponen que la unión entre los fenoles volátiles estudiados y las paredes de las levaduras se produjera a través de interacciones electrostáticas débiles o a través de puentes de hidrógeno. La sorción se produce, principalmente por unión a la superficie de las levaduras y los sitios disponibles en el sorbente los cuales son el factor limitante para esta acción.

En la **Figura 20** se muestran los resultados cuando el experimento se realizó con los fenoles volátiles por separado, con o sin agitación.

³ Tiempo de equilibrio: tiempo en horas, donde ya no se observan cambios importantes en la concentración de los compuestos.

La concentración del 4-etilfenol y 4-etilguayacol disminuyó en las muestras experimentales (12,1% y 10,1% respectivamente) en comparación con la muestra control cuando no se utilizó agitación.

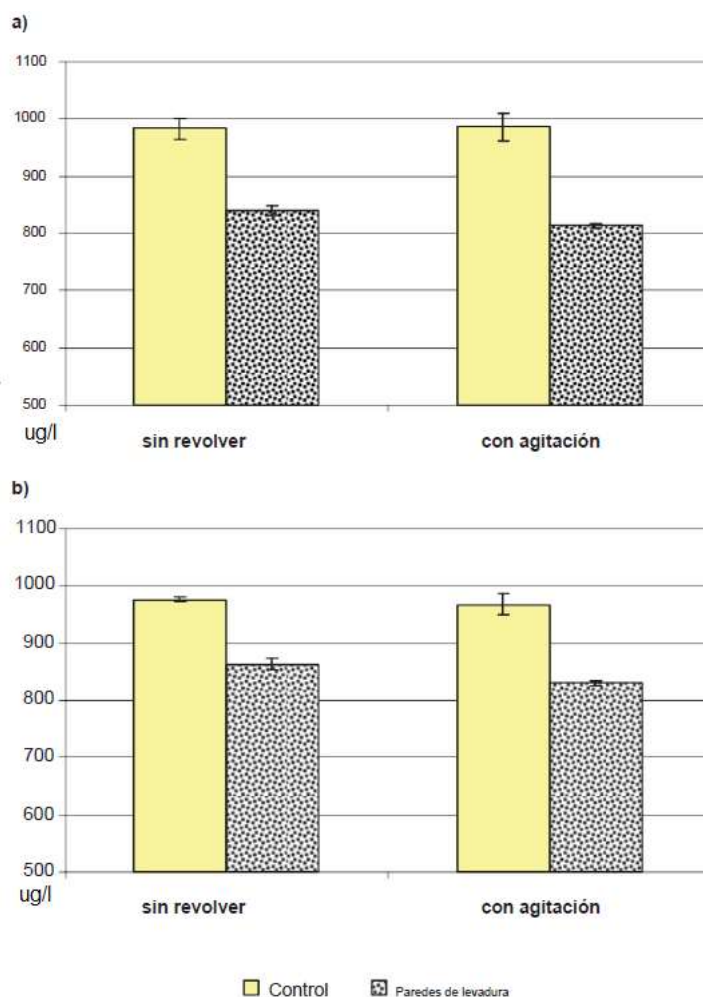


Figura 20: Experimentos de sorción para a) 4-etilfenol y b) 4-etilguayacol individualmente sin agitación y con agitación. Fuente: Jiménez-Moreno & Ancín-Azpilicueta, 2009.

En aquellos tratamientos con agitación magnética, se observó un aumento en la sorción de ambos compuestos en comparación con los vinos sin agitación; la sorción fue más importante en el caso del 4-etilfenol que en el 4-etilguayacol. La concentración de 4-etilfenol, tras alcanzar el equilibrio en el experimento con agitación, disminuyó en comparación con la muestra control (15,1%), y en caso del 4-etilguayacol esta reducción fue menor (12,1%).

En este estudio, también ensayaron la sorción tanto del 4-etilfenol como del 4-etilguayacol cuando ambos estaban presentes simultáneamente en la misma muestra, con y sin agitación.

Ambos compuestos volátiles se unieron a las lías de levadura, aunque en los dos casos la sorción fue menor que la observada en los experimentos realizados con los compuestos por separado.

En el experimento sin agitación, las concentraciones de 4-etilfenol y el 4-etilguayacol disminuyeron (6,3% y 1,6% respectivamente) en comparación con la muestra control.

En el experimento con agitación, ambos compuestos se unieron en mayor medida a las paredes de la levadura (8% y 4,4% respectivamente) (**Figura 21**).

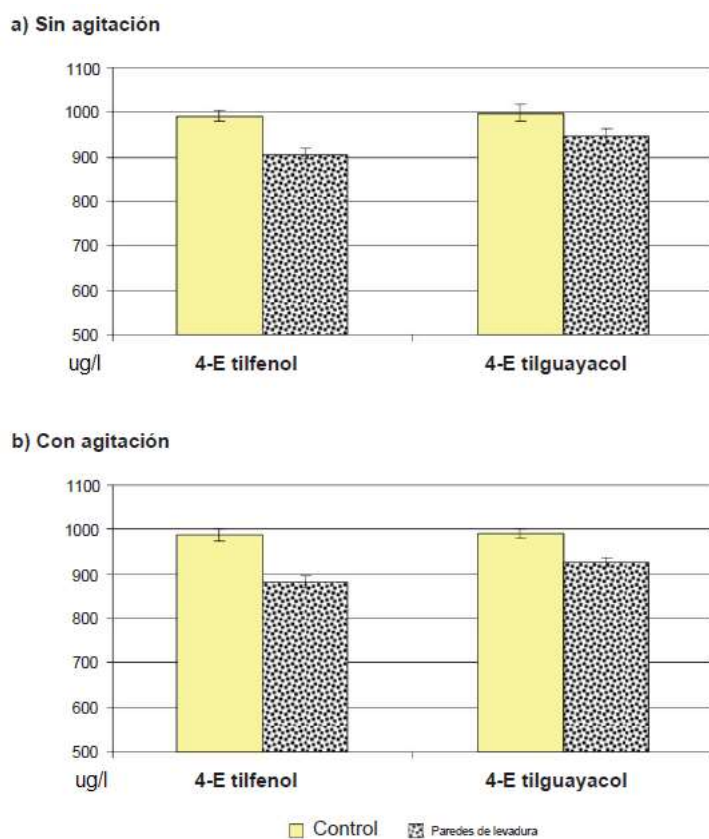


Figura 21: Experimentos de sorción con 4-etilfenol y 4-etilguayacol conjuntamente a) sin agitación y b) con agitación. Fuente: Jiménez-Moreno & Ancín-Azpilicueta, 2009.

Observaron que la reducción del 4-etilfenol fue de aproximadamente la mitad que la obtenida cuando el 4-etilguayacol no estaba presente en la muestra. Sin embargo, la reducción de la concentración de 4-etilguayacol observada cuando el 4-etilfenol estaba presente en la muestra es mucho menos importante que la obtenida en los experimentos individuales.

Esto indicaría una mayor afinidad por el 4-etilfenol por parte de las lías de levaduras en comparación con el 4-etilguayacol. Además, la presencia de 4-etilfenol en el medio podría dificultar la sorción del 4-etilguayacol.

Según este estudio, la unión del 4-etilfenol a las paredes de la levadura podría disminuir el número de sitios de sorción y/o hacerlos más inaccesibles.

Finalmente, se concluye que las lías de levadura utilizadas en este estudio redujeron la concentración de 4-etilfenol y 4-etilguayacol presentes en el vino sintético. La agitación favoreció la retención de estos compuestos a las paredes de la levadura.

La unión de estos fenoles volátiles fue muy rápida, entre 2 y 3 h. Esto indicaría que la sorción de compuestos volátiles a las paredes de la levadura se produce en las capas externas de este aditivo enológico. Además, esta sorción depende de los sitios disponibles en el sorbente, dado que al parecer el sustrato se satura al añadir ambos compuestos al mismo vino sintético.

En la misma línea del uso de lías de levaduras y su evaluación frente a otros productos enológicos, los investigadores Barbosa, Hogg & Couto (2012), realizaron sus aportes, pero en esta oportunidad con vinos naturalmente contaminados con fenoles volátiles en concentraciones bajas de etilfenoles, pero por encima del umbral de detección.

En este caso se ensayaron varias prácticas enológicas, que en función del objetivo de la tesis se hará foco en aquel que considera las paredes de levaduras (Extraferm), levaduras autolisadas, lías finas de vino 2006 y lías pesadas de vino 2006.

Se entiende como lías pesadas aquellas compuestas por partículas vegetales, aglomeraciones de cristales tartáricos, levaduras, materia colorante, taninos precipitados y escamas derivadas de reacciones entre proteínas, polisacáridos y taninos durante la maceración. Estas partículas sedimentan dentro de las 24 h. Las células de levaduras pueden quedar atrapadas en los aglomerados, por lo que se vuelven menos disponibles para las interacciones de sorción con otros compuestos (Delteil, 2002).

Inicialmente se cuantificó el nivel de contaminación de 4-etilfenol y 4-etilguayacol mediante cromatografía de gases-detección de ionización de llama (GC-FID). El vino contenía 3413 µg/L de 4-etilfenol y 437 µg/L de 4-etilguayacol.

Cada tratamiento consistió en el agregado de: *i.* paredes de levaduras marca comercial Extraferm (3 g/L), *ii.* levaduras autolisadas (3 g/L), *iii.* lías finas de vino tinto 2006 recogidas después de la fermentación maloláctica, la dosis utilizada fue de 2% v/v con agitación magnética durante 5 minutos, *iv.* lías pesadas de vino tinto 2006 obtenidas tras la fermentación alcohólica al 2% v/v bajo agitación magnética durante 5 minutos.

Cada uno de los tratamientos se realizaron por triplicado en botellas de vidrio oscuro de 1,5 L, almacenadas a temperatura ambiente.

Además del análisis cuantitativo se evaluó sensorialmente los vinos mediante un panel de 7 jueces entrenados. El efecto de los distintos tratamientos se evaluó a través de pruebas de comparación múltiple. Se pidió a los panelistas que puntuaran en una escala -3 a +3 la intensidad de los fenoles volátiles en comparación con el vino de control (no tratado, puntuación = 0). Los datos obtenidos se convirtieron a una escala de 0 a 6, en la que el control recibió la puntuación fija de 3.

Las muestras de los vinos tratados con lías, tanto finas como pesadas, fueron significativamente diferentes al control. En cuanto al uso de lías finas 2006, el resultado estuvo de acuerdo con los análisis químicos ya que fue donde menor intensidad fenólica se observó. Todos los catadores notaron un aumento en el carácter afrutado, quizás debido a la liberación de compuestos aromáticos. Es importante señalar que el vino tratado con lías finas se describió como más fresco y afrutado que el control.

En la **Tabla 2**, se muestran los resultados en donde el tratamiento más eficiente fue el uso de lías de levaduras finas logrando reducir un 47% la concentración de 4-etilfenol y 27% de 4-etilguayacol.

Tabla 2: Concentración de 4-etilfenol y 4-etilguayacol ($\mu\text{g/L}$) en el control y en los vinos tratados del ensayo 2 (Barbosa, Hogg & Couto, 2012).

	4-etilfenol		4-etilguayacol	
	Media \pm error estándar ($\mu\text{g/L}$)	% eliminación	Media \pm error estándar ($\mu\text{g/L}$)	% eliminación
Control	3413 \pm 66		437 \pm 23	
Paredes de levadura (Extraferm)	3145 \pm 213	8	407 \pm 11	7
Levaduras autolisadas	3441 \pm 143	0	439 \pm 14	0
Lías finas de vino 2006 (2%)	1818 \pm 192	47	319 \pm 86	27
Lías gruesas de vino 2006 (2%)	3145 \pm 133	8	405 \pm 30	7

Las lías pesadas también redujeron la concentración de fenoles volátiles, aunque en menor porcentaje de remoción, lo que, según Barbosa, Hogg & Couto (2012), puede estar relacionado con el hecho de que las lías pesadas contienen una menor proporción de material de levadura intacto ya que éstas se obtienen inmediatamente después del final de la fermentación alcohólica cuando la mayor parte de las levaduras todavía están en suspensión. Tanto las lías finas como pesadas presentaron un impacto positivo significativo frente al control.

En la investigación realizada por Barrio – Galán et al. 2012, se evalúa la interacción de compuestos fenólicos y volátiles con lías de levadura, roble sin tostar y diferentes preparaciones comerciales de derivados de levadura en soluciones de vino modelo.

Para este estudio utilizaron dos soluciones de vino modelo con 13% v/v de etanol y ajustaron el pH a 3,5 con NaOH. En una de ellas añadieron nueve compuestos fenólicos (entre ellas, ácido *trans*-p-cumárico, *trans*-resveratrol, ácido *trans*-caftárico, etc). En la otra solución agregaron diez compuestos volátiles (entre ellos, guayacol, 4-etilfenol, eugenol, 4-vinilfenol, etc).

Dentro de los compuestos de interés para esta revisión bibliográfica, nos centramos en el agregado de 6 mg/L de ácido *trans*-p-cumárico y 0,7 mg/L de 4-etilfenol.

Se evaluaron: *i.* siete preparaciones comerciales diferentes de derivados de levadura (0,4 g/L), *ii.* lías de levaduras de vino blanco (2 g/L), *iii.* virutas de roble francés sin tostar (4 g/L). Las botellas se mantuvieron cerradas a 15°C durante 60 días y se homogenizaron por agitación manual dos veces por semana. Los análisis los llevaron a cabo a los 15, 30 y 60 días de tratamiento mediante cromatografía de gases-masa (GC-MS).

Los derivados de levaduras describen en la **Tabla 3**:

Tabla 3: Características de los diferentes derivados de levadura comercial (YD) (Barrio-Galán et. al, 2012).

Levadura	Características
YD1	Producto con levadura autolisada enriquecida en polisacáridos

YD2	Producto con levadura autolisada enriquecida en polisacáridos y con actividad glucanasa
YD3	Producto con polisacáridos extraídos enzimáticamente de las paredes de las levaduras seleccionadas
YD4	Producto con levadura que contiene fracción peptídica
YD5	Producto constituido exclusivamente de polisacáridos de la pared celular de la levadura
YD6	Producto con paredes celulares de la levadura rico en manoproteínas y nucleótidos Manoproteínas de peso molecular medio (150 kDa.)
YD7	Producto con paredes celulares de la levadura rico en manoproteínas y nucleótidos

Como se observa en la **Tabla 4**, la concentración del ácido *trans*-p-cumárico en el vino modelo tratado con chips y lías disminuyó con respecto al vino control, especialmente en los tratados con lías. Esta disminución se encontró después de 15 días de tratamiento y se mantuvo hasta el final (60 días).

Tabla 4: Concentración (mg/L) de ácido *trans*-p-cumárico en solución de vino modelo a 15, 30 y 60 días de tratamiento (Barrio-Galán et. al, 2012).

	Días de tratamiento		
	15	30	60
	(mg/L) ácido <i>trans</i> -p-cumárico		
Control	5,78	5,83	5,77
YD1	5,84	5,82	5,79
YD2	5,83	5,84	5,75
YD3	5,82	5,81	5,78
YD4	5,81	5,74	5,80
YD5	5,80	5,73	5,80
YD6	5,83	5,78	5,74
YD7	5,81	5,81	5,79
Roble	5,41	5,31	5,17
Lías	4,87	4,74	5,00

Después de los 30 días de tratamiento, todos los vinos suplementados con productos derivados de levaduras comerciales presentaron concentraciones de 4-etilfenol inferiores a las del vino control (**Tabla 5**).

Barrio-Galán et al. 2012, observaron que después de 60 días de tratamiento, el efecto de unión desapareció a excepción del YD7.

Tabla 5: Concentración (mg/L) de 4-etilfenol en solución de vino modelo a 15, 30 y 60 días de tratamiento (Barrio-Galán et. al, 2012)

	Días de tratamiento		
	15	30	60
	(mg/L) 4-etilfenol		
Control	0,703	0,694	0,637

YD1	0,599	0,496	0,627
YD2	0,663	0,607	0,601
YD3	0,689	0,542	0,618
YD4	0,693	0,155	0,663
YD5	0,699	0,587	0,663
YD6	0,714	0,607	0,664
YD7	0,693	0,648	0,680
Roble	0,684	0,618	0,621
Lías	0,664	0,681	0,570

A diferencia de los demás autores, Barrio-Galán et al. 2012, pudieron ver que la adsorción de los compuestos fenólicos ocurrió en los primeros 15 días de tratamiento, manteniéndose constante por 2 meses; sin embargo, los compuestos volátiles mostraron una primera retención, pero luego de 30 a 60 días, observaron una liberación de los compuestos previamente unidos.

3.2 Polivinilpolipirrolidona

Lisanti et al. 2008, estudiaron en comparación la adsorción de fenoles volátiles en vino blanco y en vino tinto.

Para el caso de vino blanco, adicionaron 250 µg/L de 4-etilguayacol y 2470 µg/L de 4-etilfenol. Este fue tratado con: *i.* carbón activado (20 g/hL), *ii.* bentonita (30 g/hL) y *iii.* lias de levadura (40 g/hL). El contacto lo realizaron durante 14 h a 20°C.

Para el vino tinto utilizaron un vino poco contaminado como testigo. Para hacer el ensayo más representativo le adicionaron a este mismo vino concentraciones de 125 µg/L de 4-etilguayacol y 1235 µg/L de 4-etilfenol, para igualar el contenido del vino blanco. Los dos fueron tratados con: *i.* carbón activado (20 g/hL), *ii.* zeolita (20 g/hL) y *iii.* PVPP (80 g/hL).

Luego de los tratamientos analizaron fenoles volátiles y polifenoles totales mediante absorbancias a 280nm y 420nm.

Lisanti et al. 2008 concluyeron que, el PVPP fue efectivo para reducir los fenoles volátiles sólo cuando la contaminación era moderada, es decir en el vino naturalmente contaminado. El clarificante disminuyó la concentración cercana al umbral de percepción.

Por otro lado, todos los tratamientos redujeron la densidad óptica a 420nm, 520nm y 620nm, así como el contenido de polifenoles. Donde el PVPP fue el que produjo mayor disminución del contenido de polifenoles.

Se debe tener en cuenta que todos los tratamientos aplicados, tanto en vino blanco como en vino tinto, disminuyeron los niveles de acetato de isoamilo y esterés etílicos, compuestos fermentativos responsables de los olores afrutados.

Para el uso de PVPP, Lisanti et al. 2017, realizaron otro ensayo donde un vino tinto, elaborado mediante un proceso de vinificación convencional, fue tratado con tres agentes clarificantes diferentes: *i.* carbón activado, *ii.* PVPP y *iii.* zeolita.

Antes del tratamiento, el vino fue analizado por cromatografía de gases-espectrometría de masas en modo de monitorización de iones seleccionados (GC-MS) para determinar la concentración inicial de 4-etilfenol y 4-etilguayacol. La cromatografía utilizada consistió en una triple extracción con n-pentano y posterior determinación de los analitos con cromatografía de gases-espectrometría de masas en modalidad de monitoreo iónico selectivo.

Obtuvieron como resultado del análisis que el vino presentaba una ligera contaminación, con concentraciones de 46 µg/L para el 4-etilguayacol y 539 µg/L para el 4-etilfenol.

Este vino poco contaminado también fue adicionado con fenoles volátiles para aumentar la cantidad y permitir la evaluación de la eficacia de los tratamientos de clarificación a niveles más altos de contaminación. Finalmente, el vino contenía 126 µg/L de 4-etilguayacol y 1969 µg/L de 4-etilfenol.

Cada tratamiento se realizó por triplicado en alícuotas de 2L de vino. En este caso, nos centraremos específicamente en el uso de PVPP.

Según las indicaciones del fabricante del aditivo enológico, se añadió PVPP directamente en el vino, en una dosis de 80 g/hL. El ensayo lo llevaron a cabo en botellas de vidrio de 2L las cuales se sometieron a agitación magnética (10 minutos) y luego sedimentación (14 horas a 20°C). A su vez, reservaron una botella sin tratamiento para utilizarla como testigo.

Tras la sedimentación y la filtración, las réplicas experimentales, es decir el vino naturalmente contaminado y el adicionado con etilfenoles, se sometieron a análisis químicos (GC-MS) y sensoriales.

Se evaluó el efecto de los distintos tratamientos con los correspondientes vinos no tratados (vino naturalmente contaminado y vino enriquecido) mediante una prueba triangular, con el fin de evaluar la existencia de diferencias sensoriales perceptibles tras los tratamientos. El panel estuvo compuesto por 26 jueces, en los cuales 13 jueces recibieron el vino tratado como muestra par y 13 recibieron el vino control como muestra impar. El orden de presentación de cada conjunto de muestras fue aleatorio entre los jueces.

En primer lugar, se realizó una prueba triangular para evaluar si todos los vinos tratados diferían significativamente de los vinos control (vino naturalmente contaminado y vino enriquecido). Tras los tratamientos con carbón, zeolita y PVPP, el vino enriquecido con fenoles volátiles no se diferenció significativamente de los vinos tratados, obteniéndose los siguientes resultados:

-Carbón vegetal: aciertos/total= 11/26, $p=0,220$

-Zeolita: aciertos/total= 11/26, $p=0,220$

-PVPP: aciertos/total= 9/26, $p=0,518$

En cuanto al vino naturalmente contaminado, sólo los tratamientos con carbón y PVPP dieron como resultado una diferencia sensorial significativa:

-Carbón vegetal: aciertos/total= 20/26, $p < 0,001$

-Zeolita: aciertos/total= 12/26, $p=0,121$

-PVPP: aciertos/total= 18/26, $p < 0,001$

Estas diferencias fueron atribuidas únicamente al olor, por esto, a continuación, se evaluó el perfil de olor del vino naturalmente contaminado antes y después de los tratamientos con carbón vegetal y PVPP.

El olor “fenólico” fue el más intenso en el perfil del vino naturalmente contaminado. El segundo olor más intenso fue “hierba”, mientras que los olores a “frutos rojos”, “flores” y “picante” se percibieron en menor intensidad.

Después de ambos tratamientos, la disminución de 4-etilfenol y 4-etilguayacol reflejó una disminución de la intensidad de olor “fenólico” y “herbáceo” en mayor medida con carbón vegetal que con PVPP. Curiosamente, después de los dos tratamientos, se produjo el aumento de la intensidad del olor a “frutos rojos”. Este resultado puede parecer en desacuerdo con la eliminación de ésteres, que son los principales compuestos asociados a las notas frutales en el vino. Sin embargo, se observó que 4-etilfenol y 4-etilguayacol suprimen la nota afrutada en los vinos, incluso en concentraciones mínimas. Por lo tanto, aunque los tratamientos redujeron las concentraciones de ésteres, la reducción de los niveles de 4-EP y 4-EG, con la consiguiente disminución de la intensidad del olor “fenólico”, resultó en la mejora del olor frutal derivado de los ésteres. El perfil aromático se observa en la **Figura 22**.

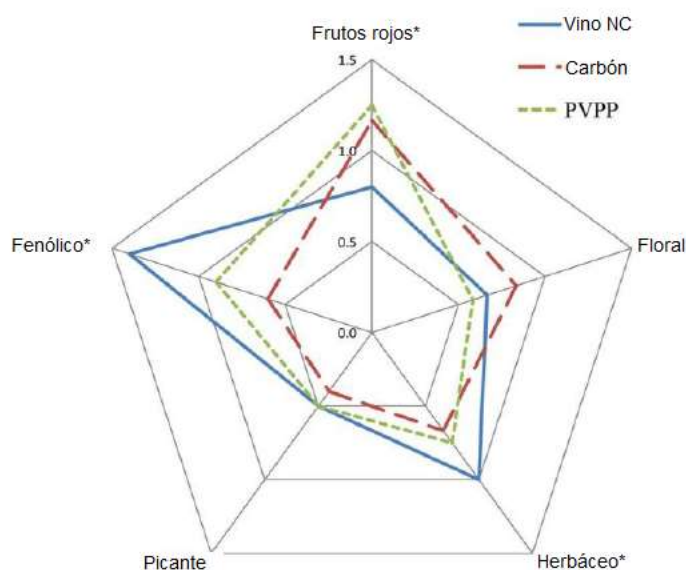


Figura 22: Perfiles de olor del vino naturalmente contaminado (vino NC) antes y después de los tratamientos con carbón activado y PVPP.

El asterisco en los descriptores indica una diferencia significativa ($p < 0,001$) entre el vino control y el tratado. Fuente: Lisanti et. al, 2017.

Luego de análisis cuantitativo de los fenoles volátiles, Lisanti et al. 2017, concluyeron que, en el vino contaminado naturalmente, el PVPP redujo significativamente el nivel de 4-etilfenol en un 11% (**Tabla 6**).

Tabla 6: Efecto de carbón vegetal, PVPP y zeolita sobre la concentración de 4-etilguayacol y 4-etilfenol en los vinos, expresado en $\mu\text{g/L}$ (Lisanti et. al, 2017)

	4-etilguayacol	4-etilfenol
Naturalmente contaminado	46,1 ± 3,6	539 ± 48
Carbón Vegetal	41,0 ± 2,1	441 ± 42
PVPP	43,3 ± 2,4	482 ± 26
Zeolita	43,4 ± 1,6	473 ± 55
Vino adicionado	125,7 ± 8,4	1969 ± 244
Carbón Vegetal	115,7 ± 6,7	1687 ± 189
PVPP	118,7 ± 5,6	1724 ± 240
Zeolita	116,5 ± 7,7	1794 ± 256

Ninguno de los tratamientos utilizados (PVPP, zeolita y carbón activado) fue eficaz para reducir de forma significativa la concentración de 4-etilfenol y 4-etilguayacol en el vino adicionado con fenoles volátiles. Sin embargo, a pesar de la ausencia de significación estadística, la cantidad de 4-etilfenol y 4-etilguayacol eliminada del vino contaminado naturalmente fue de tres a cuatro veces superior a la del vino contaminado (adicionado con 4-etilfenol y 4-etilguayacol).

Esto sugiere, según Lisanti et al. 2017, que la adsorción dependía del nivel de fenoles volátiles. Sin embargo, los componentes de la matriz del vino parecen haber determinado la saturación de los sitios de unión. Por lo tanto, la cantidad adsorbida de fenoles volátiles no fue significativa respecto a la concentración inicial.

Tanto el carbón activado como el PVPP son adsorbentes no específicos que tienden a unirse a un gran número de moléculas. Debido a esto es que, a pesar de la deseable disminución de la concentración de los compuestos de mal olor, también pueden reducirse los niveles de los aromas deseables de un vino. Por ejemplo, en este estudio realizado por Lisanti et al. 2017, el acetato de isoamilo y los ésteres etílicos, compuestos fermentativos responsables de los aromas frutados del vino, disminuyeron con los tratamientos probados.

Otro enfoque que aportó Salameh et al. 2008, fue la adsorción del ácido p-cumárico para evitar la formación de etilfenoles por *Brettanomyces*.

Para el ensayo Salameh et al. 2008, utilizaron **3 g/L** de PVPP en un vino sintético sin ácido p-cumárico. Aplicaron un diseño factorial experimental donde estudiaron la variación de la cantidad adsorbida de ácido p-cumárico en diferentes concentraciones.

Los factores en estudio fueron el pH (3- 3,5- 4), la temperatura (25, 30, 35 °C) y la concentración de etanol (10-11,5-13 % v/v). Aplicaron agitación de 250 rpm y todas las pruebas fueron comparadas con muestras testigo sin PVPP. Las concentraciones de p-cumárico fueron 2,5 y 20 mg/L. El tiempo de contacto fue de 5 h.

Finalmente, Salameh et al. 2008, concluyeron que sólo la temperatura tuvo un efecto significativo sobre la adsorción, ésta mejoró cuando aumentaron la temperatura de 25 a 35°C (**Figura 23**). La concentración de etanol y el pH, no tuvieron un efecto directo sobre la adsorción para ninguna de las concentraciones estudiadas de ácido p-cumárico. Esto podría presentar una solución para evitar su biotransformación.

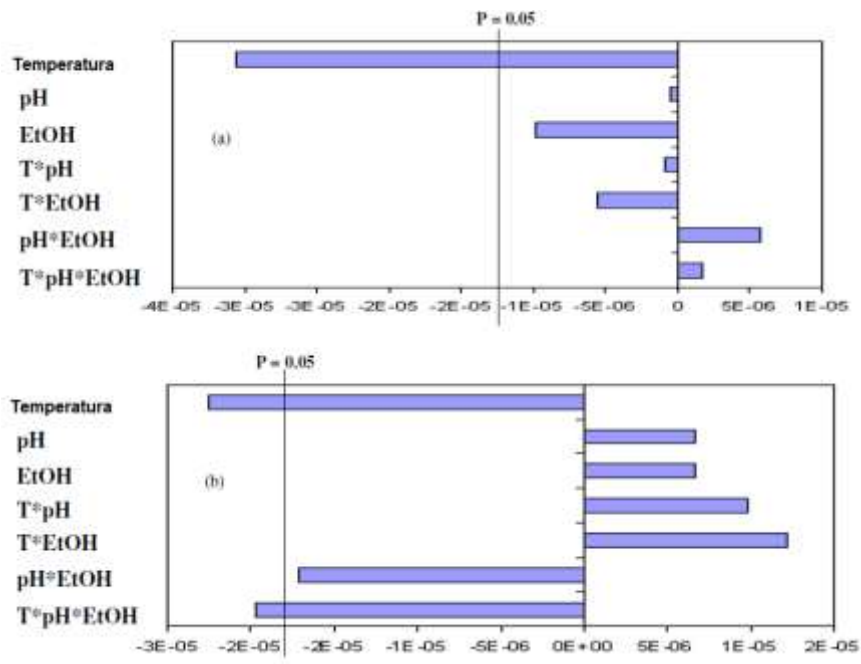


Figura 23: Efecto estimado de los factores cuando utilizaron PVPP como adsorbente a) 20 mg/L y b) 2,5 mg/L de ácido p-cumárico. Fuente: Salameh et. al, 2008.

4. Resultados y Discusión

El objetivo de la revisión bibliográfica es proponer posibles insumos de uso común en bodegas, que permitan disminuir los fenoles volátiles como 4-etilfenol y 4-etilguayacol en vinos tintos, con la finalidad de presentar una solución para aquellas grandes bodegas y/o medianos o pequeños productores que por diversos motivos sus vinos se han contaminado con *Brettanomyces spp.* De esta manera, brindar una posibilidad de recuperar la producción sin sufrir grandes pérdidas y obteniendo una calidad aceptable del producto final.

Una vez que un vino se contamina con *Brettanomyces* se producen niveles excesivos de fenoles volátiles, especialmente en el vino tinto. Siguiendo el objetivo de describir el uso de lías de levaduras provenientes de la fermentación alcohólica, se puede concluir que la sorción de fenoles volátiles utilizando dicho insumo, es efectivo en la eliminación de 4-etilfenol y 4-etilguayacol.

En la **Tabla 7**, se resumen los resultados obtenidos por los distintos autores planteados en la revisión:

Tabla 7: Resumen de los porcentajes de disminución obtenidos por cada uno de los autores investigados en el uso de lías de levaduras.

		Porcentaje de disminución			
		4-etilfenol	4-etilguayacol	Ácido p-cumárico	
Lías de levaduras	Chassagne et al. 2005		33%	26%	-
	Jiménez-Moreno & Ancín-Azpilicueta 2009 (individualmente)	Con agitación	15,1%	12,1%	-
		Sin agitación	12,1%	10,1%	-
	Jiménez-Moreno & Ancín-Azpilicueta 2009 (conjuntamente)	Con agitación	8%	4,4%	-
		Sin agitación	6,3%	1,6%	-
	Barbosa, Hogg & Couto 2012		47%	27%	-
	Barrio-Galán et al. 2012	15 días	5%	-	19%
		30 días	3%	-	21%
		60 días	19%	-	17%

A pesar de alcanzar grandes porcentajes de disminución, como en caso de Barbosa, Hogg & Couto 2012, en ninguna de las investigaciones se logró reducir la concentración de fenoles volátiles por debajo del umbral de percepción (4-etilfenol: 0,44 mg/L y 4-etilguayacol: 0,18 mg/L). De igual manera, a nivel sensorial se redujo el aroma a establo y se potenciaron los aromas afrutados.

El otro aditivo estudiado, fue el PVPP, cuyo objetivo era describir su uso para la disminución de fenoles volátiles presentes en el vino, causados por la acción de la levadura *Brettanomyces*.

En la **Tabla 8**, se presentan los porcentajes de disminución de 4-etilfenol y 4-etilguayacol:

Tabla 8: Resumen de los porcentajes de disminución obtenidos por cada uno de los autores investigados en el uso de lías de levaduras.

		Porcentaje de disminución		
Autores		4-etilfenol	4-etilguayacol	Ácido p-cumárico
PVPP	Lisanti et al. 2008	11%	7%	-
	Lisanti et al. 2017	11%	7%	-

Se concluye que podría utilizarse PVPP para eliminar los fenoles volátiles, siempre y cuando los fenoles volátiles se encuentren en bajas concentraciones, de 46 µg/L para el 4-etilguayacol y de 539 µg/L para el 4-etilfenol, es decir, una contaminación media-baja.

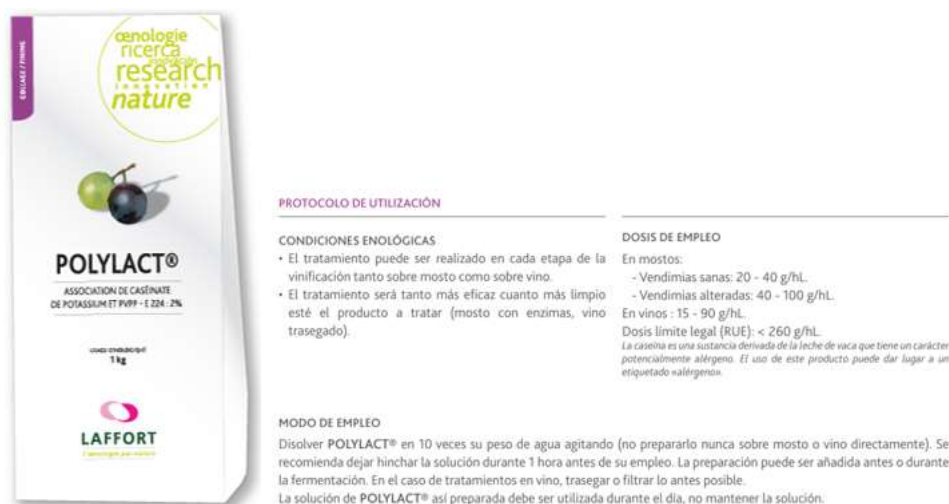
Como se observa en la **Tabla 8**, se resaltan los porcentajes de aquellos ensayos en donde las concentraciones finales de 4-etilfenol y 4-etilguayacol se encuentran por debajo o muy cerca del umbral de percepción: 0,44 mg/L y 0,18 mg/L, respectivamente. Es importante tener en cuenta que el uso de este aditivo enológico también puede llegar a modificar otros compuestos aromáticos deseables, tales como acetato de isoamilo y esterés etílicos.

Para el caso del uso de PVPP, se sugiere que serían necesarios más estudios en relación a la utilización de este aditivo para el fin específico de reducir fenoles volátiles ya que hasta el momento la bibliografía es escasa.

Para aplicar lo propuesto en la revisión bibliográfica se deben tener en cuenta costos aproximados de los insumos, los cuales se describen a continuación:

- Lías de levaduras: Este insumo está compuesto por levaduras añadidas al momento de la fermentación, o bien, pueden desarrollarse las propias levaduras nativas presentes en la baya. En la mayoría de las bodegas son consideradas un residuo el cual es enviado a destilerías o utilizado para compost. Es por esto, que la utilización de lías de levaduras para el fin de disminuir fenoles volátiles presenta una alternativa de uso ya que permite reutilizar el insumo y no descartarlo.
- PVPP: siguiendo el estudio descrito por Lisanti et al. 2017, se utilizarían 80 g/hL de este insumo para reducir los niveles de 4-etilfenol y 4-guayacol. Un paquete de 1kg de PVPP marca Laffort (**Figura 24**) cuesta alrededor de 19

US\$. Para tratar 100 hL de vino se necesitarían 8kg, es decir, se tendría un costo total de 150 US\$.



PROTOCOLO DE UTILIZACIÓN

CONDICIONES ENOLÓGICAS

- El tratamiento puede ser realizado en cada etapa de la vinificación tanto sobre mosto como sobre vino.
- El tratamiento será tanto más eficaz cuanto más limpio esté el producto a tratar (mosto con enzimas, vino trasegado).

DOSIS DE EMPLEO

En mostos:

- Vendimias sanas: 20 - 40 g/hL.
- Vendimias alteradas: 40 - 100 g/hL.

En vinos : 15 - 90 g/hL.

Dosis límite legal (RUE) : < 260 g/hL.

La caseína es una sustancia derivada de la leche de vaca que tiene un carácter potencialmente alérgico. El uso de este producto puede dar lugar a un etiquetado alérgico.

MODO DE EMPLEO

Disolver POLYLACT® en 10 veces su peso de agua agitando (no prepararlo nunca sobre mosto o vino directamente). Se recomienda dejar hinchar la solución durante 1 hora antes de su empleo. La preparación puede ser añadida antes o durante la fermentación. En el caso de tratamientos en vino, trasegar o filtrar lo antes posible.

La solución de POLYLACT® así preparada debe ser utilizada durante el día, no mantener la solución.

Figura 24: PolyLact (PVPP) Marca Laffort y su protocolo de utilización. Fuente: www.laffort.com

5. Conclusiones

En la revisión bibliográfica llevada a cabo, se proponía hallar insumos de bajo costo y prácticos para disminuir la concentración de etilfenoles, provocados por la levadura *Brettanomyces spp.* en vinos tintos terminados. Finalmente, se concluye que para reducir la concentración de 4-etilfenol y 4-etilguayacol, las lías de levadura proporcionan un enfoque rentable, ya que se aprovecha un residuo generado durante la fermentación alcohólica. Además, resulta eficiente por los resultados expuestos. Por lo tanto, se acepta la hipótesis planteada.

Por otro lado, para utilizar polivinilpolipirrolidona (PVPP) se deberían realizar más ensayos para demostrar que es efectivo para la adsorción de 4-etilfenol y 4-etilguayacol específicamente. A raíz de esto, se sugiere profundizar en estudios para la utilización del insumo enológico mencionado.

Idealmente, la prevención es la mejor estrategia para controlar el deterioro del vino por *Brettanomyces*, mediante la aplicación de altos estándares de higiene dentro de la bodega y teniendo materia prima de calidad. También es importante aplicar métodos fiables para la detección de contaminantes antes de que la calidad del vino se vea alterada. Sin embargo, si el vino ya está contaminado, se puede dificultar el crecimiento de *Brettanomyces*, por ejemplo, mediante el uso de agentes antimicrobianos adecuados como SO_2 y el almacenamiento en condiciones adecuadas.

Bibliografía

- Alejandre, M. M. L. (2007). *Manual de viticultura, enología y cata*. Almuzara.
- Álvarez, M. L. S. (2015). Extracción y purificación de compuestos fenólicos a partir de subproductos de destilería de vino (Doctoral dissertation, Universidade de Vigo).
- Álvarez, M. L. S. (2015). Extracción y purificación de compuestos fenólicos a partir de subproductos de destilería de vino.
- Arkell, J., & George, R. (2003). *Wine: A Comprehensive Guide to Drinking and Appreciating Wine*. New Holland Publishers Uk Limited.
- Arvik, T., & Henick-Kling, T. (2002). *Brettanomyces bruxellensis* occurrence, growth, and effect on wine flavor.
- Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., & Loureiro, V. (2012). The microbial ecology of wine grape berries. *International journal of food microbiology*, 153(3), 243-259.
- Barbosa, A., Hogg, T., & Couto, J. A. (2012). The influence of selected oenological practices on the sensory impact of volatile phenols in red wines. *OENO One*, 46(2), 131-138.
- Barrado, A. M., & Lepe, J. A. S. (2020). *Brettanomyces*, el enemigo silencioso. *ACE: Revista de enología*, (177), 1.
- Barrio-Galán, D., Ortega-Heras, M., Sánchez-Iglesias, M., & Pérez-Magariño, S. (2012). Interactions of phenolic and volatile compounds with yeast lees, commercial yeast derivatives and non-toasted chips in model solutions and young red wines. *European Food Research and Technology*, 234(2), 231-244.
- Bekhit, A. E., Cheng, V. J., Harrison, R., Ye, Z., Bekhit, A. A., Ng, T. B., & Kong, L. (2015). *Technological aspects of by-product utilization*. CRC Press (an imprint of Taylor & Francis Group).
- Bordet, F., Joran, A., Klein, G., Roullier-Gall, C., & Alexandre, H. (2020). Yeast–yeast interactions: mechanisms, methodologies and impact on composition. *Microorganisms*, 8(4), 600.
- Braga, F. G., Silva, F. A. L., & Alves, A. (2002). Recovery of winery by-products in the Douro demarcated region: production of calcium tartrate and grape pigments. *American journal of enology and viticulture*, 53(1), 41-45.
- Burg, P., Vítěz, T., Turan, J., & Burgová, J. (2014). Evaluation of grape pomace composting process. *Acta Univ Agric Silvic Mendelianae Brun*, 62(5), 875-881.
- Caboni, P., Sarais, G., Cabras, M., & Angioni, A. (2007). Determination of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol in wines by LC-MS-MS and HPLC-DAD-fluorescence. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(18), 7288-7293.
- Carrascosa, A. V., Muñoz, R., & González, R. (Eds.). (2011). *Molecular wine microbiology*. Cham, Switzerland: Elsevier.

- Castillo-Sánchez JX, García-Falcón MS, Garrido J, Martínez- Carballo E, Martins-Dias LR, Mejuto XC (2008) Phenolic compounds and colour stability of Vinhao wines: influence of wine-making protocol and fining agents. *Food Chem* 106:18–26
- Catania, C., & Avagnina, S. (2007). Implicancias organolépticas de los polifenoles del vino. Curso Superior de Degustación de vinos. EEA Mendoza. INTA.
- Chassagne, D., Guilloux-Benatier, M., Alexandre, H., & Voilley, A. (2005). Sorption of wine volatile phenols by yeast lees. *Food Chemistry*, 91(1), 39-44.
- Chatonnet, P., Miranda, A., & García, A. T. P. (2013). *Brettanomyces*: Mitos y realidades. *Enólogos*, (81), 44-60.
- Ciani, M., Capece, A., Comitini, F., Canonico, L., Siesto, G., & Romano, P. (2016). Yeast interactions in inoculated wine fermentation. *Frontiers in microbiology*, 7, 555.
- Comitini, F., Oro, L., Canonico, L., Marinelli, V., & Ciani, M. (2019). Occurrence of *Brettanomyces bruxellensis* on grape berries and in related winemaking cellar. *Frontiers in microbiology*, 10, 415.
- Custers, M. T. J. (1940). Onderzoekingen over het gistgeslacht *Brettanomyces*.
- De Iseppi, A., Lomolino, G., Marangon, M., & Curioni, A. (2020). Current and future strategies for wine yeast lees valorization. *Food Research International*, 137, 109352.
- De Simone, N., Pace, B., Grieco, F., Chimienti, M., Tyibilika, V., Santoro, V., ... & Russo, P. (2020). Botrytis cinerea and table grapes: A review of the main physical, chemical, and bio-based control treatments in post-harvest. *Foods*, 9(9), 1138.
- Delteil, D. (2002). Working with lees: key elements to wine maturing. *Australian and New Zealand grapegrower and winemaker*, 104-108.
- Díaz García, M. C. (2012). Perfil de compuestos funcionales en zumos de frutas rojas.
- Dimopoulou, M., Lonvaud-Funel, A., & Dols-Lafargue, M. (2017). Polysaccharide production by grapes must and wine microorganisms. In *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* (pp. 293-314). Springer, Cham.
- Dimou, C., Vlysidis, A., Kopsahelis, N., Papanikolaou, S., Koutinas, A. A., & Kookos, I. K. (2016). Techno-economic evaluation of wine lees refining for the production of value-added products. *Biochemical engineering journal*, 116, 157-165.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). (2011). Scientific Opinion related to a notification from the International Organisation of Vine and Wine (OIV) on ovalbumin/egg white to be used in the manufacture of wine as clarification processing aids pursuant to Article 6, paragraph 11 of Directive 2000/13/EC—for permanent exemption from labelling. *EFSA Journal*, 9(10), 2385.
- Escott, C., Del Fresno, J. M., Loira, I., Morata, A., & Suárez-Lepe, J. A. (2018). *Zygosaccharomyces rouxii*: Control strategies and applications in food and winemaking. *Fermentation*, 4(3), 69.
- Flanzy, C., Abbal, P., Agay, B., Asselin, C., Bachy, P., & Barre, P. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos* (2a. ed.). Madrid: A. Madrid Vicente.

- Fleet, G. H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 11-22.
- Fleet, G.H. and Heard, G.M. (1993) Yeast-Growth during Fermentation. In: Fleet, G.H., Ed., Harwood Academic, Wine, Microbiology and Biotechnology, Lausanne, 27-54.
- Fugelsang, K. C. (1997). Yeasts and molds. In *Wine microbiology* (pp. 68-116). Springer, Boston, MA.
- Fugelsang, K. C. (2007). *Wine microbiology*. Рипол Классик.
- Fugelsang, K. C., & Edwards, C. G. (2006). *Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures*. Springer Science & Business Media.
- Godoy, L., Martínez, C., Carrasco, N., & Ganga, M. A. (2008). Purification and characterization of a p-coumarate decarboxylase and a vinylphenol reductase from *Brettanomyces bruxellensis*. *International journal of food microbiology*, 127(1-2), 6-11.
- Instituto Nacional de Vitivinicultura (1992) [en línea] <https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-71-1992-25768/actualizacion> (Consulta: 26/10/2022).
- Jiménez Martínez, M. D. (2018). Posibilidades tecnológicas de las paredes celulares de los orujos de uva como agentes afinantes durante la vinificación. Proyecto de investigación.
- Jiménez-Moreno, N., & Ancín-Azpilicueta, C. (2009). Sorption of volatile phenols by yeast cell walls. *International Journal of Wine Research*, 1, 11-18.
- Jin, Z. M., He, J. J., Bi, H. Q., Cui, X. Y., & Duan, C. Q. (2009). Phenolic compound profiles in berry skins from nine red wine grape cultivars in northwest China. *Molecules*, 14(12), 4922-4935.
- Karak, P. (2019). Biological activities of flavonoids: an overview. *Int. J. Pharm. Sci. Res*, 10(4), 1567-1574.
- Kheir, J., Salameh, D., Strehaiano, P., Brandam, C., & Lteif, R. (2013). Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of *Brettanomyces/Dekkera* yeasts. *European Food Research and Technology*, 237(5), 655-671.
- Laborde, B., Moine-Ledoux, V., Richard, T., Saucier, C., Dubourdieu, D., & Monti, J. P. (2006). PVPP- polyphenol complexes: a molecular approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(12), 4383-4389.
- Lipke, P. N., & Ovalle, R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of bacteriology*, 180(15), 3735-3740.
- Lisanti, M. T., Gambuti, A., Genovese, A., Piombino, P., & Moio, L. (2017). Treatment by fining agents of red wine affected by phenolic off-odour. *European Food Research and Technology*, 243(3), 501-510.
- Lisanti, M. T., Piombino, P., Gambuti, A., Genovese, A., Siani, V. L., & Moio, L. (2008). Analytical evaluation of remedial treatments for red and white wines contaminated by

volatile phenols. Bulletin de l'OIV-Organisation Internationale de la Vigne et du Vin, 81(923-925), 45-56.

López-Cordón, E. N. (2009). *Brettanomyces/Dekkera* Control y detección en bodegas. Revista Enología N, 6(01/05), 1.

Loureiro, V., & Malfeito-Ferreira, M. (2006). *Dekkera/Brettanomyces* spp (pp. 354-398). CRC Press: Boca Raton, FL.

Lubbers, S., Charpentier, C., Feuillat, M., & Voilley, A. (1994). Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in a model wine. American Journal of Enology and Viticulture, 45(1), 29-33.

Malfeito-Ferreira, M. (2018). Two decades of “horse sweat” taint and *Brettanomyces* yeasts in wine: Where do we stand now? Beverages, 4(2), 32.

Mena, P., Ascacio-Valdés, J. A., Gironés-Vilaplana, A., Del Rio, D., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2014). Assessment of pomegranate wine lees as a valuable source for the recovery of (poly) phenolic compounds. Food Chemistry, 145, 327-334.

Mierczynska-Vasilev, A., & Smith, P. A. (2015). Current state of knowledge and challenges in wine clarification. Australian journal of grape and wine research, 21, 615-626.

Molina Úbeda, R. (2000). Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas.

Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2005). Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. European Food Research and Technology, 220(3), 341-346.

Morata, A., Gómez-Cordovés, M. C., Suberviola, J., Bartolomé, B., Colomo, B., & Suárez, J. A. (2003). Adsorption of anthocyanins by yeast cell walls during the fermentation of red wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(14), 4084-4088.

Oelofse, A., Pretorius, I. S., & Du Toit, M. (2008). Significance of *Brettanomyces* and *Dekkera* during winemaking: a synoptic review.

Organización Internacional de la Viña y el Vino. (Julio 2022). *Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2021*. <https://www.oiv.int/public/medias/8780/es-state-of-the-world-vine-and-wine-sector-abril-2022.pdf>

Ough, C.S. and M.A. Amerine. 1961. Studies with controlled fermentation. VI. Effects of temperature and handling on rates, composition, and quality of wines. American Journal of Enology and Viticulture 12(3):117–128.

Paraje, M. G., & Tamagnini, L. (2015). ¿Qué son las bacterias viables no cultivables? (revisión literaria). Revista de la Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, 2(2), 99-102.

Pérez-Serradilla, J. A., & De Castro, M. L. (2008). Role of lees in wine production: A review. *Food chemistry*, 111(2), 447-456.

Portugal, C. B. (2012). *Detección y caracterización de Brettanomyces bruxellensis y Trigonopsis cantarellii en el contexto enológico* (Doctoral dissertation, Universidad de La Rioja).

Revista de Enología Científica y Profesional (s.f) [en línea] <https://www.acenologia.com/websace/> (Consulta: 26/07/2022).

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (Eds.). (2006). *Handbook of enology, Volume 1: The microbiology of wine and vinifications* (Vol. 1). John Wiley & Sons.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2021). *Handbook of Enology, volume 2: The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley & Sons.

Robinson, J., & Harding, J. (1999). *The Oxford Companion to Wine*: Oxford University Press.

Romano, P. (2005). Proprietà tecnologiche e di qualità delle specie di lieviti vinari. *Microbiologia del Vino*. Casa Editrice Ambrosiana, Milan, Italy, 101-131.

Salameh, D., Brandam, C., Iteif, R., & Strehaiano, P. (2008) Adsorción del ácido p-cumárico del vino para evitar la formación de etilfenoles por *Brettanomyces*. [Archivo PDF] <https://www.infowine.com/intranet/libretti/libretto6230-02-1.pdf>

Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., & Verstrepen, K. J. (2015). *Brettanomyces* yeasts—From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International journal of food microbiology*, 206, 24-38.

Taillandier, P., Joannis-Cassan, C., Jentzer, J. B., Gautier, S., Sieczkowski, N., Granes, D., & Brandam, C. (2015). Effect of a fungal chitosan preparation on *Brettanomyces bruxellensis*, a wine contaminant. *Journal of Applied Microbiology*, 118(1), 123-131.

Togores, J. H. (2010). *Tratado de enología* (Vol. 1). Mundi-Prensa Libros.

Tubia, I., Prasad, K., Pérez-Lorenzo, E., Abadín, C., Zumárraga, M., Oyanguren, I. & Arana, S. (2018). Beverage spoilage yeast detection methods and control technologies: A review of *Brettanomyces*. *International journal of food microbiology*, 283, 65-76.

UCDAVIS Viticulture & Enology (s.f) [en línea] <https://wineserver.ucdavis.edu/#/> (Consulta: 26/10/2022).

Vernhet, A. (2019). Red wine clarification and stabilization. In *Red wine technology* (pp. 237-251). Academic Press.