



**UNIVERSIDAD DE TALCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**Efecto del dióxido de azufre y glutatión reducido sobre el pardeamiento oxidativo de mostos de uva
Carménère**

Memoria de título

José Tomás Cornejo Lorca

Talca, Chile

2023

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2023

APROBACIÓN



Profesor Guía: Felipe Laurie Gleisner, Ingeniero Agrónomo, M.S., Ph.D.



Profesor informante: Verónica Rachel Olate Olave, Lic. Tecnología Médica, Dra. en Ciencias,
mención I&D de Productos Bioactivos

Fecha de presentación de la Defensa de Memoria: 24 de enero del 2023.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al equipo del Laboratorio de Química enológica de la Facultad de Ciencias Agrarias por siempre mantener un grato ambiente de trabajo, por su constante apoyo y disposición a enseñarme, en especial a la Dra. Verónica Olate, por su amabilidad y cercanía, siendo una de las personas que siempre estuvo ahí preocupada de mis avances y de ayudarme cada vez que lo necesité.

Doy las gracias a mi profesor guía, por entregarme sus conocimientos, ideas y aclaraciones que me permitieron sacar adelante esta memoria.

Agradezco a mis amigos, a los que conocí en la Universidad, a los de la vida y a los que han llegado. Gracias por los buenos momentos vividos que hicieron más ameno el transcurso de estos años.

Agradezco a mi pololo Jonathan Vidal, quien fue un pilar fundamental durante el transcurso de este proyecto. Le agradezco por siempre confiar ciegamente en mí, incluso en los momentos en que creí que no podría, por siempre subirme el ánimo y ayudarme a tirar para arriba en los momentos más difíciles.

Gracias a mi familia, por su preocupación, paciencia, su entrega de cariño y por apoyarme cada vez que lo necesité. Agradezco a mi hermana Carolina, mi cuñado Gonzalo y mis sobrinas Alicia y Sofia por recibirme en su hogar y aguantarme meses, por hacerme sentir como en casa y preocuparse siempre de que nada me faltara.

Por último, quiero agradecer infinitamente a mi madre, que sin ella nada de esto hubiese sido posible. Gracias por siempre creer en mí, por sacrificarte siempre para que yo estuviera bien, por contenerme cada vez que lo pase mal y por ayudarme a ser quien soy hoy en día.

RESUMEN

Durante el proceso de vinificación, el contacto del jugo/vino con el oxígeno del aire es inevitable. A partir de la presencia de este gas se inician procesos oxidativos que generan cambios químicos y sensoriales en el vino, los que dependiendo de su magnitud resultarán positivos o negativos. En mostos, las oxidaciones son mediadas por enzimas oxidativas que usan como sustrato a los polifenoles y el oxígeno presentes en solución. Estas oxidaciones enzimáticas generan cambios que habitualmente son considerados negativos para el color, aromas y sabores del vino; y para evitarlas, es fundamental el uso de antioxidantes como el SO₂ o glutatión reducido (GSH), los que limitan los efectos negativos del oxígeno al entrar en contacto con el mosto.

En este estudio se evaluó el efecto de las adiciones de SO₂, GSH y su combinación sobre la oxidación enzimática en mosto de uva del cultivar Carménère. El efecto antioxidante de los compuestos utilizados fue evaluado de manera indirecta mediante análisis de absorbancia a 280, 420 y 520 nm en tiempos incrementales y a partir del análisis del contenido de acetaldehído, catequina, polifenoles totales y antocianinas tanto al inicio como al final del experimento. Por otro lado, se realizó un seguimiento del contenido O₂ disuelto en el tiempo para evidenciar su consumo durante el transcurso ensayo.

Los resultados de este estudio mostraron diferencias estadísticamente significativas entre el tratamiento control, sin adición de antioxidantes, y los tratamientos que recibieron SO₂, o SO₂ y GSH. El GSH por sí solo no generó protección alguna contra la oxidación, y cuando fue usado en combinación con SO₂ no produjo un efecto sinérgico o aditivo. De lo anterior se concluye que la aplicación de sulfitos, de manera individual, resultó ser la mejor alternativa para disminuir los efectos de la oxidación enzimática en el mosto.

ABSTRACT

During the winemaking process, the contact of the juice/wine with oxygen in the air is inevitable. The presence of this gas initiates oxidative processes that generate chemical and sensory changes in the wine, which, depending on their magnitude, will be positive or negative. In musts, oxidations are mediated by oxidative enzymes that use polyphenols and oxygen present in solution as substrates. These enzymatic oxidations generate changes, typically negative, in wine color, aromas and flavors; and to avoid them, the use of antioxidants such as SO₂ or reduced glutathione (GSH), which limit the negative effects of oxygen in contact with the must, are essential.

In this study, the effect of the additions of SO₂, GSH and their combination on enzymatic oxidation in grape must of the Carménère cultivar was evaluated. The antioxidant effect of the compounds used was evaluated indirectly by absorbance analysis at 280, 420 and 520 nm at incremental times and from the analysis of acetaldehyde, catechin, total polyphenols and anthocyanins content both at the beginning and at the end of the experiment. On the other hand, the dissolved O₂ content was monitored over time to show its consumption during the trial.

The results of this study showed statistically significant differences between the control treatment, without the addition of antioxidants, and the treatments that received SO₂, or SO₂ and GSH. GSH alone did not generate any protection against oxidation, and when used in combination with SO₂ it did not produce a synergistic or additive effect. From the above, it is concluded that the application of sulfites, individually, proved to be the best alternative to reduce the effects of enzymatic oxidation in the must.

ÍNDICE

Capítulos	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivo General.....	3
1.3. Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Importancia de la vid en Chile.....	4
2.2. Los mostos.....	4
2.3. Oxígeno y vinificación.....	4
2.3.1. Procesos oxidativos en el mosto.....	5
2.4. Uso de dióxido de azufre como antioxidante.....	6
2.5. El uso de glutatión cómo antioxidante.....	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	9
3.1. Ubicación del experimento.....	9
3.2. Mosto.....	9
3.3. Dióxido de azufre.....	9
3.4. Glutatión reducido.....	9
3.5. Diseño experimental y metodología.....	10
3.6. Mediciones de espectrofotometría.....	10
3.7. Medición de oxígeno disuelto por Nomasense O ₂	11
3.8. Análisis de polifenoles, catequina, acetaldehído y antocianinas.....	11
3.9. Análisis fisicoquímicos.....	11
3.10. Análisis estadístico.....	12
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
4.1. Concentración de oxígeno disuelto en el mosto.....	13
4.2. Disminución porcentual de la concentración de polifenoles totales.....	14
4.3. Disminución porcentual de la concentración de catequinas.....	15

4.4. Disminución porcentual de la concentración de antocianinas	17
4.5. Incremento porcentual de la concentración de acetaldehído	18
4.6. Absorbancia del mosto a diferentes longitudes de onda	19
5. CONCLUSIÓN	23
6. BIBLIOGRAFÍA.....	24
7. ANEXOS	28

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características principales del mosto elaborado y utilizado en el ensayo	9
Cuadro 2. Descripción de los tratamientos con sus respectivas abreviaciones	10

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Efecto protector del dióxido de azufre y el ácido ascórbico (Waterhouse y Laurie, 2006).....	2
Figura 2: Proceso de pardeamiento enzimático en mosto de uva (Li et al., 2008).....	6
Figura 3. Evolución de la concentración de oxígeno disuelto en el mosto para cada tratamiento, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ ; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ y 15 mg/L de GSH	13
Figura 4: Disminución porcentual entre la concentración de polifenoles en el mosto al inicio y final del ensayo para cada tratamiento, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ ; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ y 15 mg/L de GSH. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey (p < 0,05).	14
Figura 5. Disminución porcentual entre la concentración de catequina en el mosto al inicio y final del ensayo para cada tratamiento, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ ; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ y 15 mg/L de GSH. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey (p < 0,05).	16
Figura 6. Disminución porcentual entre la concentración de antocianinas en el mosto al inicio y final del ensayo para cada tratamiento, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ ; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ y 15 mg/L de GSH. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey (p < 0,05).....	17
Figura 7: Incremento porcentual entre la concentración de acetaldehído en el mosto al inicio y final del ensayo para cada tratamiento, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ ; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ y 15 mg/L de GSH. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey (p < 0,05).	18
Figura 8: Evolución del índice de polifenoles totales en el tiempo al someter el mosto a una longitud de onda de 280 nm, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ ; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ y 15 mg/L de GSH.....	19
Figura 9: Evolución de la absorbancia en el tiempo al someter el mosto a una longitud de onda de 420 nm, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ ; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ y 15 mg/L de GSH.	20

Figura 10: Evolución de la absorbancia en el tiempo al someter el mosto a una longitud de onda de 520 nm, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na₂S₂O₅; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na₂S₂O₅ y 15 mg/L de GSH.
.....21

1. INTRODUCCIÓN

Chile es uno de los principales países productores de vino a nivel mundial. Según el catastro vitivinícola nacional del 2021, la superficie de vides para vinificación alcanzó las 139.179 hectáreas (SAG, 2021). En cuanto a producción de vinos, nuestro país ocupa el sexto lugar dentro de los principales productores a nivel mundial y el cuarto en volumen de exportación, con una producción de 13,4 millones de hectolitros, de los cuales 8,7 millones de hectolitros son exportados (OIV, 2022). Una parte importante de dicho volumen corresponde a la exportación de vinos a granel y embotellados de bajo precio, por lo que Chile tiene el desafío de mejorar la calidad y rentabilidad de sus vinos (Cárdenas, 2020).

El proceso de vinificación es fundamental para la calidad del vino. A pesar de que la fermentación es un proceso fundamentalmente anaeróbico, durante varias de las etapas del proceso de elaboración del vino el oxígeno está presente (Tarko et al., 2020), desempeñando un papel positivo o negativo dependiendo principalmente de la dimensión de las exposiciones y de la presencia de sustancias en el mosto o vino capaces de reaccionar con este gas (Laurie et al., 2016). Por ejemplo, bajas cantidades de oxígeno puede favorecer el desarrollo de aromas y transformaciones gustativas, así como contribuir a la estabilidad en el color de los vinos tintos. Por el contrario, una concentración alta puede desencadenar procesos oxidativos con cambios detrimentales en las propiedades sensoriales de los vinos (Singleton, 1987).

Durante el procesamiento de las uvas, las reacciones de oxidación son en su mayoría enzimáticas (Oliveira et al., 2011) y se encuentran ligadas principalmente a la actividad de las enzimas polifenoloxidasas (PPO) que actúan sobre ácidos fenólicos (Zironi et al., 2009b). Un manejo inadecuado del oxígeno puede promover estas reacciones oxidativas resultando en una disminución de los caracteres varietales y la tipicidad del vino (Badea et al., 2017). Por tanto, la protección antioxidante durante la vinificación, desde la molienda y prensado, hasta el inicio de la fermentación, es de suma importancia para definir el estilo y mantener la calidad del vino que deseamos producir (Badea y Antoce, 2015).

Para evitar las oxidaciones en el mosto, se deben aplicar determinadas técnicas que permitan inhibir estas reacciones. Entre las técnicas aditivas, se encuentra el uso de dióxido de azufre (SO_2) (du Toit et al., 2006) y el uso de glutatión reducido (GSH), alternativa química incluida desde el 2015 entre las prácticas enológicas recomendadas por la OIV (Ferrer-Gallego et al., 2017).

El dióxido de azufre (SO_2), que en nuestro país es más conocido como anhídrido sulfuroso, es el producto químico más importante y ampliamente utilizado para limitar la oxidación de vinos convencionales (Li et al., 2008). El SO_2 en el mosto influye en el proceso de oxidación inhibiendo la actividad de las enzimas oxidativas,

especialmente la polifenoloxidasasa, PPO (Arriola y Tapia, 2017), haciendo que la tasa de consumo de oxígeno (O_2) disminuya drásticamente (du Toit et al., 2006). Además, su uso puede limitar las oxidaciones químicas al reducir los productos de oxidación a su forma original, por ejemplo, a partir del reciclaje de *o*-quinonas a fenoles (Tarko et al., 2020) (Figura 1).

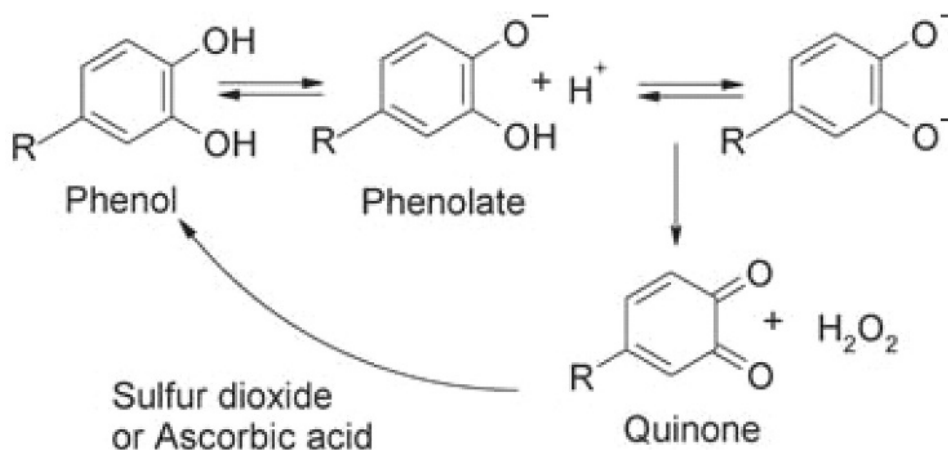


Figura 1: Efecto protector del dióxido de azufre y el ácido ascórbico (Waterhouse y Laurie, 2006)

Aun cuando las concentraciones de SO_2 utilizadas en vino son bajas, el consumo de SO_2 implica efectos potencialmente adversos para la salud de personas sensibles, cuando este sobrepasa los límites permitidos de consumo diario. La ingesta excesiva y la cantidad acumulada consumida de SO_2 pueden causar toxicidad en órganos vitales (Vally, Misso y Madan, 2009 citado en Ferrer-Gallego et al., 2017). En Chile está permitido que los vinos contengan como máximo 300 mg/L de anhídrido sulfuroso total o 75 mg/L en estado libre, y cuando se trata de vinos dulces, un máximo de 400 y 100 mg/L respectivamente, al superar estos límites los vinos son considerados como adulterados (Art. 27 de la ley N°18.455). Además del vino, una serie de otros alimentos de consumo habitual como frutas y hortalizas frescas, jugos industrializados, galletas, licores, embutidos, etc. contienen cantidades importantes de SO_2 (Alimentar et al., 2011; Ragan y Troxler, s. f.).

Una de las moléculas más prometedoras con capacidad antioxidante y de reciente aprobación por la OIV es el glutatión reducido, GSH (Badea y Antoce, 2015). En Chile su empleo está permitido durante la elaboración del vino en dosis máxima de 20 mg/L (Art. 23 de la ley N°18.455). El GSH puede disminuir el proceso de oxidación del mosto reaccionando con algunos productos de la transformación enzimática (PPO) del ácido caftarico (una de las sustancias más oxidables del mosto de uva) (Zironi et al., 2009b), y su efecto combinado sobre la oxidación en vinos ha sido previamente estudiada (Díaz et al., 2021).

En Chile, no se han desarrollado estudios donde haya determinado el impacto del uso de SO_2 y glutatión sobre la oxidabilidad en mostos de uva tinta, por lo que en este estudio se evaluará el efecto antioxidante individual de estas sustancias utilizadas y el observado a partir de su combinación.

1.1. Hipótesis

La aplicación combinada de SO₂ y GSH en mostos de uva del cultivar Carménère, es más efectivo en limitar el progreso de las reacciones de oxidación enzimática que la aplicación de SO₂ o glutatión reducido por separado.

1.2. Objetivo general

- Evaluar el efecto de la aplicación de SO₂, GSH, o su combinación sobre la oxidación enzimática de mosto de uva del cultivar Carménère.

1.3. Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la aplicación de 70 mg/L de Na₂S₂O₅ sobre la oxidación de un mosto elaborado a partir de uva del cultivar Carménère.
- Evaluar el efecto de la aplicación de 15 mg/L de GSH sobre la oxidación de un mosto elaborado a partir de uva del cultivar Carménère.
- Evaluar el efecto combinado de la aplicación de 70 mg/L de Na₂S₂O₅ y 15 mg/L GSH sobre la oxidación de un mosto elaborado a partir de uva del cultivar Carménère.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Importancia de la vid en Chile

La viticultura corresponde a uno de los principales rubros de importancia agrícola nacional. La superficie en Chile utilizada para el cultivo de vid (*Vitis vinifera* L.) es de 203.957 ha, de las cuales 141.918 ha están dedicadas a la producción de vino. Actualmente Chile es el primer exportador de vinos del nuevo mundo y cuarto exportador mundial de vinos (ODEPA, 2020); sin embargo, el precio que los consumidores están dispuestos a pagar no logra el reconocimiento propio de sus atributos (Cárdenas, 2020). Es por esta razón que resulta imprescindible la realización de investigaciones que apunten mejorar la calidad y rentabilidad de los vinos chilenos permitiendo reducir las deficiencias en factores asociados a la comercialización.

2.2. Los mostos

Durante los procesos de vinificación y antes de la fermentación se procesan las uvas a través de la molienda (o prensado) para obtener el jugo o mosto compuesto por pulpa, jugo, pieles y semillas; el que será posteriormente separado de los orujos en la elaboración de vinos blancos y macerado junto a los orujos en el caso de los vinos tintos (Enrique, 2011)

Antes de la fermentación, el mosto se compone principalmente de agua, azúcares, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, y otros componentes químicos minoritarios. La calidad y composición que tenga el vino está directamente relacionado con los componentes presentes en el mosto (Gutiérrez y Ricagno, 2010); y dentro de estos, los polifenoles tienen una gran importancia para la calidad del producto final. Su cantidad está determinada por diversos factores de cultivo y son unas de las sustancias más reactivas al oxígeno (Arriola y Tapia, 2017).

2.3. Oxígeno y vinificación

El oxígeno (O₂) representa aproximadamente un 20 % del aire que respiramos (Zironi et al., 2009b), por lo tanto, estará siempre presente en las operaciones de vinificación disolviéndose en el mosto y vino (Delteil, 2000).

El papel del oxígeno durante la vinificación es extremadamente complejo, debido a que este elemento es utilizado tanto por levaduras como por bacterias y es sustrato para numerosas transformaciones químicas del mosto, la pulpa y la maduración del vino (Tarko et al., 2020). Un ejemplo de lo anterior es su consumo por levaduras para producir esteroides de membrana durante la fermentación alcohólica. Este tipo de sustancias

permite que las levaduras tengan una mejor resistencia al etanol y absorción de nutrientes nitrogenados (Deshaies et al., 2020).

La aireación o exposición de los jugos o vinos al O₂, estimula una serie de reacciones químicas que afectan de manera positiva o negativa dependiendo del nivel de oxigenación (Laurie y Peña Neira, 2012). Por ejemplo, desde una perspectiva sensorial, la oxidación controlada podría ser beneficiosa para el vino tinto al realzar y estabilizar el color y reducir la astringencia (Oliveira et al., 2011). Por otro lado, un contacto excesivo con el oxígeno implica consecuencias negativas, ya que se alteran los compuestos fenólicos reduciendo el color y cuerpo del vino (Gómez Plaza, 2016). Además, según du Toit et al., (2006), “el exceso de oxígeno puede influir drásticamente en el sabor y composición microbiana del vino, formando sabores desagradable y crecimiento de microorganismos de descomposición”.

La influencia del oxígeno en el sabor, aroma y color se debe principalmente a los oxidantes de las sustancias radicalarias que derivan de su presencia. Los compuestos fenólicos, terpenos y otros componentes del vino son susceptibles a reacciones de oxidación que, en consecuencia, afectan la composición del vino (Tarko et al., 2020), siendo los compuestos fenólicos los sustratos principales para las oxidaciones (du Toit et al., 2006).

2.3.1. Procesos oxidativos en el mosto

La oxidación es un proceso en el que ocurre una transferencia de electrones entre pares reductores y oxidativos. En el vino, el O₂ es el principal responsable de esta reacción (du Toit et al., 2006). Muchos compuestos encontrados en el mosto y el vino coexisten como mezclas de sus formas reducidas y oxidadas, estos son los llamados "pares redox", y la reducción de un compuesto siempre va acompañada simultáneamente la oxidación de otro (Zironi et al., 2009b).

No obstante, lo anterior, durante las etapas iniciales de la vinificación, es decir durante la molienda de los racimos para la extracción del mosto, predominan las reacciones oxidación mediadas por enzimas oxidativas, llamadas pardeamientos enzimáticos (Oliveira et al., 2011). Estas reacciones ocurren debido a que, durante el proceso para la obtención del mosto, se destruyen las células y membranas que impiden la interacción de los polifenoles con las enzimas oxidorreductasas, las que, en presencia de oxígeno, propician la oxidación de compuestos fenólicos (Arriola y Tapia, 2017) (Figura 2).

Existen tres tipos de enzimas que participan en las reacciones de oxidación de moléculas, la peroxidasa, la lacasa y la polifenoloxidasas, siendo esta última la más estudiada en la industria de los alimentos por su incidencia en el fenómeno de pardeamiento (Guerrero, 2009).

La rapidez con que ocurra la actividad oxidante será mayor en la medida en que las bayas estén más rotas, la cantidad de O₂ disuelto en el mosto sea mayor, y la actividad de la enzima oxidante se más alta (Arriola y Tapia, 2017). Por otra parte, Tarko et al., (2020), señala que “la resistencia que tengan los mostos y vinos a la oxidación está dada por la cantidad de compuestos fenólicos presentes. Por ejemplo, los vinos tintos al ser macerados junto a los orujos contienen alta concentración de polifenoles lo que los hace mucho más fáciles de oxidar, pero a la vez mucho más resistentes al contacto con oxígeno”.

Dentro de las consecuencias que trae la oxidación enzimática de los mostos se encuentra: La formación de pigmentos de amarillo a marrón debido a la polimerización progresiva de los polifenoles (pardeamiento) y el desarrollo de depósitos que resultan en una disminución de los compuestos fenólicos (Tarko et al., 2020) (Figura 2).

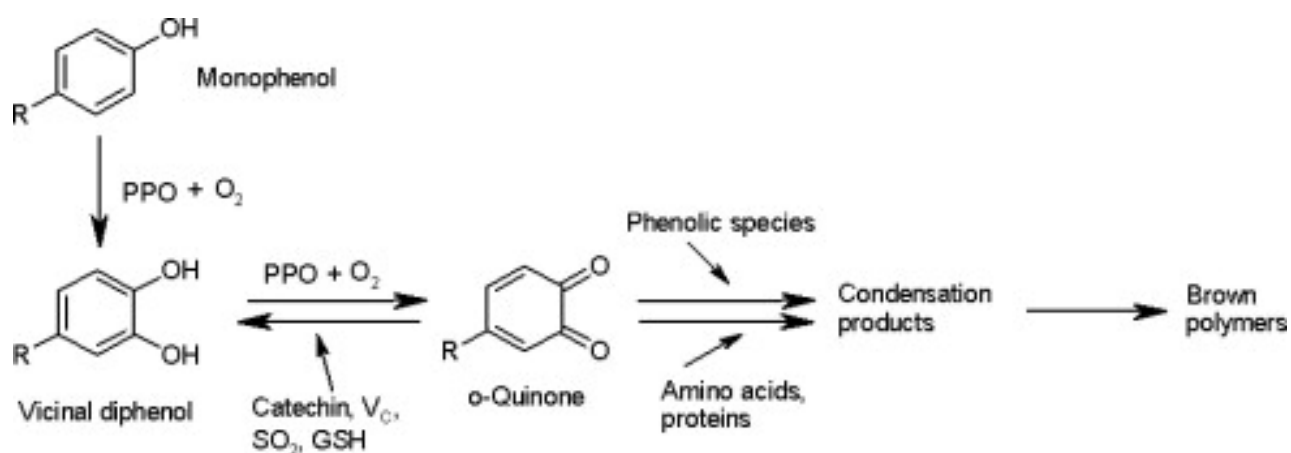


Figura 2: Proceso de pardeamiento enzimático en mosto de uva (Li et al., 2008).

Para reducir los efectos de las oxidaciones enzimáticas sobre la calidad de los mostos es esencial el uso de sustancias reductoras como el dióxido de azufre, glutatión, además de prácticas como control de la temperatura y uso de gases inertes (Singleton y Cilliers 1995, citado en (Laurie y Peña Neira, 2012)

2.4. Uso de dióxido de azufre como antioxidante

El anhídrido sulfuroso o dióxido de azufre (SO₂) es un gas producido por la combustión del azufre en el aire (Arriola y Tapia, 2017). Su uso como conservante se remonta hacia finales del siglo XVIII (Raposo, 2017). Este compuesto usado en la enología es uno de los aditivos más versátiles y eficientes debido a sus propiedades antisépticas y antioxidantes (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Sin embargo, se debe evitar el uso de dosis excesivas ya que puede ocasionar problemas de salud y desde el punto de vista enológico, afectar negativamente la calidad organoléptica del producto final, llegando incluso a producir defectos aromáticos característicos (Ribereau-Gayon et al., 2006 citado en Guerrero y Cantos-Villar, (2015)).

Dentro de las propiedades que tiene el SO₂ como antioxidante se destacan: La inactivación de la enzima polifenoloxidasas que interviene en el pardeamiento, inhibe las reacciones de Maillard, reacciona con el peróxido de hidrógeno y reduce las formas de quinonas (Guerrero y Cantos-Villar, 2015). Un estudio realizado por Comuzzo et al., (2015), demostró el gran rendimiento que tiene el SO₂ para prevenir la oxidación en vinos blancos y la dificultad para encontrar un aditivo que logre un efecto similar.

La acción antioxidante del SO₂ en los mostos consiste principalmente en la inhibición de las oxidaciones enzimáticas. Al añadir anhídrido sulfuroso se inhiben las enzimas responsables de las oxidaciones de los compuestos fenólicos del mosto (Polifenoloxidasas) (Zironi et al., 2009b), previniendo los efectos que alteran negativamente las propiedades sensoriales y el valor nutricional de los vinos (pardeamiento oxidativo) (Abramovič et al., 2015). A modo de ejemplo, “una adición SO₂ de 50 mg/L provoca una reducción de la actividad de la PPO en un 75-90%”(Tarko et al., 2020).

La eficacia que tenga este tratamiento sobre la capacidad oxidativa del mosto está directamente relacionada con la dosis, la rapidez en su adición y también de la acidez, estado sanitario y contenido de polifenoles del mosto (Arriola y Tapia, 2017).

La relevancia que tiene el estado sanitario de las bayas sobre la eficacia del SO₂ como antioxidante se evidencia en lo siguiente: La enzima tirosinasa (PPO, presente en la uva) es inactivada completamente con dosis bajas de sulfuroso en el mosto, mientras que la enzima lacasa, derivada de la pudrición por *Botrytis cinérea* es menos sensible a las adiciones de SO₂ (Zironi et al., 2009b). Por esta razón, evitar la oxidación en uvas botritizadas se hace mucho más complicado, aumentando el riesgo de pardeamientos enzimáticos.

2.5. El uso de glutatión como antioxidante

El glutatión (GSH) es un tripéptido encontrado naturalmente en muchas plantas y microorganismos. Está constituido por ácido glutámico, glicina y cisteína (Zironi et al., 2009b). La importancia del glutatión radica principalmente en su capacidad de evitar o reducir el pardeamiento del vino y la pérdida de aromas derivado de las reacciones de oxidación (Arriola y Tapia, 2017).

Durante la oxidación enzimática de los vinos, se oxidan los compuestos fenólicos mediante la enzima polifenoloxidasas a *o*-quinonas del ácido cafeoil tartárico (Tarko et al., 2020). Singleton et al., (1985) demostró que el glutatión puede disminuir el proceso oxidativo al reaccionar con las *o*-quinonas del ácido cafeoil tartárico, dando como resultado un tioéter conocido como 2-S-glutationil-trans-cafeoli-tárico, o también conocido como “producto de reacción de la uva” (GRP). En condiciones normales, es decir con uvas en buen estado sanitario, este compuesto permanece estable frente a la oxidación por la PPO, por lo que el glutatión es capaz de detener la cadena oxidativa que da como resultado el pardeamiento y oxidación del mosto (Zironi et al., 2009b).

Arriola y tapia (2017) afirman que mientras el glutatión esté presente en el medio, las oxidaciones se ven muy limitadas, pero cuando este compuesto se agota, las moléculas de GRP pueden ser nuevamente oxidadas por nuevas orto-quinonas y provocar un intenso pardeado del mosto. Sumado a esto, el GRP, es usado como sustrato para la lacasa producida por *Botrytis*, provocando que la vinificación de uvas botrytizadas siempre sea más susceptible a las reacciones de pardeamiento oxidativo (Kritzinger et al., 2013; Zironi et al., 2009b).

Un estudio realizado por Badea et al., (2017), demostró que el tratamiento con GSH en mostos de uva blanca condujo a la producción de vinos con perfiles sensoriales más complejos, teniendo una influencia importante en la protección de aromas varietales de los vinos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

Este estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Enológica, localizado en el campus Lircay de la Universidad de Talca en la comuna de Talca, durante los años 2021 y 2022.

3.2. Mosto

El mosto se extrajo a partir de uvas congeladas de la variedad Carménère, obtenidas a partir viñedo de docencia del campus Colchagua de la Universidad de Talca, ubicado en la comuna de Santa Cruz. A partir de dichas uvas se produjeron 4 litros de mosto el cual fue dividido en 12 muestras de 300 mL cada una para su posterior análisis experimental y extracción de datos.

Cuadro 1. Características principales del mosto elaborado y utilizado en el ensayo.

pH	°Brix	Acidez Titulable (g/L)	Azúcares reductores (g/L)	SO ₂ total (mg/L)	SO ₂ libre (mg/L)
3.80 +/- 0.03	25.52 +/- 0.05	1.59 +/- 0.13	230.43 +/- 0.42	0.08 +/- 0.001	0.0015 +/- 0.05

Cabe recalcar que la acidez titulable reportada en el cuadro 1, no es un resultado fiable ya que los reactivos empleados no se encontraban en óptimas condiciones.

3.3. Dióxido de azufre

El dióxido de azufre utilizado en este proyecto corresponde a metabisulfito de sodio (Na₂S₂O₅) proveniente de Merck S.A (Alemania) con una pureza del 97%. Dicha sustancia química se adicionó al mosto con una dosificación de 70 mg/L.

3.4. Glutación reducido

El glutatión usado en este ensayo corresponde a glutatión reducido (H₂NCH (CO₂H) CH₂CH₂CONHCH (CH₂SH) CONHCH₂CO₂H) proveniente de Merck S.A (Alemania) con una pureza ≥98%. Dicha sustancia química se adiciono al mosto con una dosificación de 15 mg/L.

3.5. Diseño experimental y metodología

El diseño experimental consistió en la realización de cuatro tratamientos, en donde se utilizó dióxido de azufre, glutatión reducido y su combinación, además de un tratamiento control sin aplicaciones (Cuadro 1). Se utilizaron 8 Kg de uva congelada del cultivar Carménère. Dicha uva fue descongelada y prensada mediante el uso de una prensa manual para producir 4 litros de mosto, del cual se tomaron 12 muestras de 300 mL cada una. Cada muestra fue vaciada en botellas Schott de 250 mL y fueron tratadas de la siguiente manera:

- El tratamiento 0, (T0), constó de 300 ml de mosto almacenado en botellas de vidrio Schott de 250 mL al cual no se le aplicó ningún tipo de tratamiento.
- El tratamiento 1, (T1), correspondió a 300 mL de mosto tratado con 70 mg/L de metabisulfito de sodio al momento del vaciado en botellas Schott de 250 mL.
- El tratamiento 2, (T2), consideró 300 mL de mosto tratado con 15 mg/L de glutatión reducido al momento del vaciado en botellas Schott de vidrio de 250 mL.
- El Tratamiento 3, (T3), constó de 300 mL de mosto tratado de forma combinada con las mismas condiciones descritas en los tratamientos T1 y T2.

Todos los tratamientos antes descritos se realizaron por triplicado

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos con sus respectivas abreviaciones

TRATAMIENTOS	ABREVIACIONES	DESCRIPCIÓN
Tratamiento 0	T0	300 mL de mosto de uva Carménère
Tratamiento 1	T1	300 mL de mosto de uva Carménère + 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅
Tratamiento 2	T2	300 mL de mosto de uva Carménère + 15 mg/L de GSH
Tratamiento 3	T3	300mL de mosto de uva Carménère + 70 mg/L de Na ₂ S ₂ O ₅ + 15 mg/L de GSH

3.6. Mediciones de espectrofotometría

Este estudio se realizó midiendo la absorbancia del mosto a las longitudes de onda de 280, 420 y 520 nm. Estas mediciones fueron realizadas con un espectrofotómetro de microplacas UV-Vis Epoch. Este aparato tiene la capacidad de medir longitudes de onda que van desde los 200 a los 999 nm y permite el uso de diversos formatos de microplacas.

Para la realización de este análisis se extrajo una muestra de 1,5 mL de mosto de cada botella, las muestras fueron depositadas en tubos Eppendorf de 1,5 mL y se centrifugaron a 13,2 mil rpm durante 7 minutos. Transcurridos los 7 minutos se separó el sobrenadante de cada muestra y se depositó en tubos Eppendorf de 1 mL.

Luego se realizaron 4 diluciones por muestra. Para esto se diluyeron 150 µL de las muestras de mosto anteriormente centrifugadas con 850 µL de agua destilada en tubos de 1 mL y se agitaron. Finalmente, se pipetearon 300 µL de cada dilución en placas de 96 pocillos y se midió la absorbancia a las longitudes de onda antes descritas en tiempos incrementales (0; 0,5; 1,5; 2,5; 20,5; 22; 23,5; 25,5; 49,5; 73,5; 97,5; y 155,5 horas).

3.7. Medición de oxígeno disuelto por Nomasense O₂

Para monitorear el contenido de oxígeno disuelto en el mosto, se utilizó un analizador de oxígeno Nomasense O₂ Prime. Este analizador monitorea los niveles de oxígeno disuelto mediante fotoluminiscencia de forma no destructiva ni invasiva en el vino o mosto mediante unos sensores ubicados en las botellas y una sonda de fibra óptica.

Para este ensayo se utilizó una botella por tratamiento, las cuales contenían en su interior un sensor que entregaba las concentraciones de oxígeno disuelto en ppm (ppb) y fueron monitoreados en tiempos incrementales (0; 0,5; 1,5; 2,5; 20,5; 22; 23,5; 25,5; 49,5; 73,5; 97,5 y 155,5 horas), a una temperatura ambiente de alrededor de 17 °C.

3.8. Análisis de polifenoles, catequina, acetaldehído y antocianinas

Este estudio se llevó a cabo mediante el uso de un analizador automático y multiparamétrico Y15 de Biosystems para mediciones enológicas. Este aparato permite la realización de diversos análisis de manera automática y en simultaneo mediante el uso de reactivos específicos para cada ensayo.

Las mediciones se hicieron al inicio y final del ensayo y fueron realizadas usando muestras de 1 ml de mosto centrifugadas a 13,2 mil rpm y filtradas mediante filtros de 0.45 µm.

3.9. Análisis fisicoquímicos

El mosto fue sometido a análisis de sólidos solubles (°Brix), por medio de refractómetro; análisis de pH por potenciometría; acidez titulable y azúcares reductores mediante el uso del analizador Y15.

3.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos a partir de las diversas mediciones de polifenoles, acetaldehído, catequinas y antocianinas fueron transformados a porcentajes y luego analizados estadísticamente mediante el software Statgraphics Centurion 19. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un factor de clasificación también llamado diseño completamente al azar (DCA) y se trabajó utilizando un nivel de confianza del 95%. En caso de existir diferencias significativas, se realizó pruebas de comparaciones múltiples de Tukey (5%).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Concentración de oxígeno disuelto en el mosto

En la figura 3, donde se presenta la evolución de la concentración de oxígeno disuelto en el mosto, se observa que todos los tratamientos comenzaron con una concentración parecida de oxígeno disuelto de alrededor de 7,70 mg/L de O₂. Esta concentración se redujo de manera drástica en los tratamientos T0 (Control) y T2 (GSH), durante las primeras 2 horas de seguimiento, disminuyendo a 1,60 y 2,06 mg/L de O₂ respectivamente.

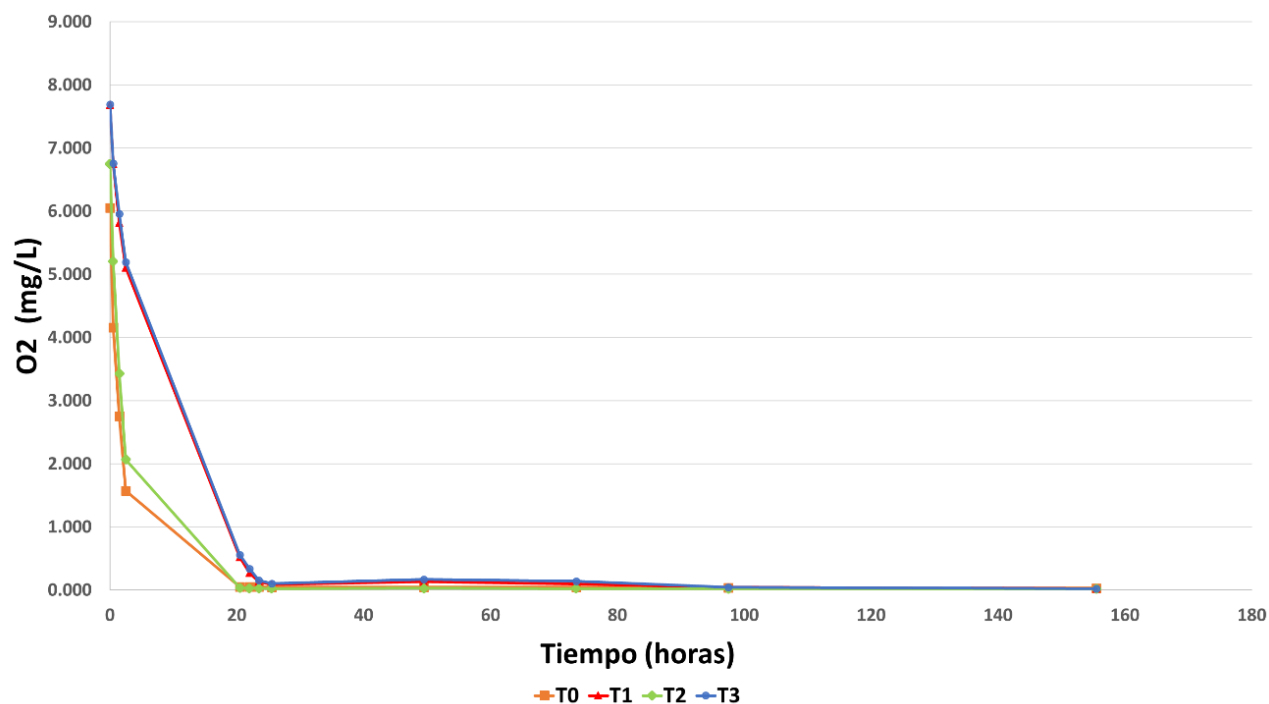


Figura 3. Evolución de la concentración de oxígeno disuelto en el mosto para cada tratamiento, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na₂S₂O₅; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na₂S₂O₅ y 15 mg/L de GSH

Los tratamientos T1 (SO₂) y T3 (SO₂ + GSH) tuvieron una disminución menor, pasando a una concentración de 5,1 mg/L de O₂ durante el transcurso de 2 horas. Finalmente, transcurridas 20 horas los tratamientos T0 y T2 llegaron a una concentración de casi 0 mg/L de O₂ y, por otra parte, los tratamientos T1 y T3 llegaron a esa concentración a las 24 horas.

Los ensayos que contenían metabisulfito de sodio (T1 y T3) presentaron un consumo de oxígeno disuelto menor en comparación a los que no lo contenían (T0 y T2). Por su parte, el tratamiento T0, fue el que disminuyó de manera más acelerada sus niveles de oxígeno disuelto, probablemente derivado de una mayor oxidación.

4.2. Disminución porcentual de la concentración de polifenoles totales

Los polifenoles del jugo de uva pueden ser usados como marcadores de la oxidación (Makhotkina et al., 2013), por lo que en este estudio se incluyó el análisis de polifenoles totales de forma de identificar los tratamientos que permitieron mantener de mejor manera el contenido de polifenoles en el tiempo.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico realizado, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre algunos tratamientos. Los tratamientos T1 y T3 presentaron una disminución menor de polifenoles con respecto a T0 y T2, Y tal como se observó en la figura 3, estos últimos fueron los que presentaron la más rápida disminución del O₂ disuelto en el mosto, y por ende los que más polifenoles oxidaron (Figura 4).

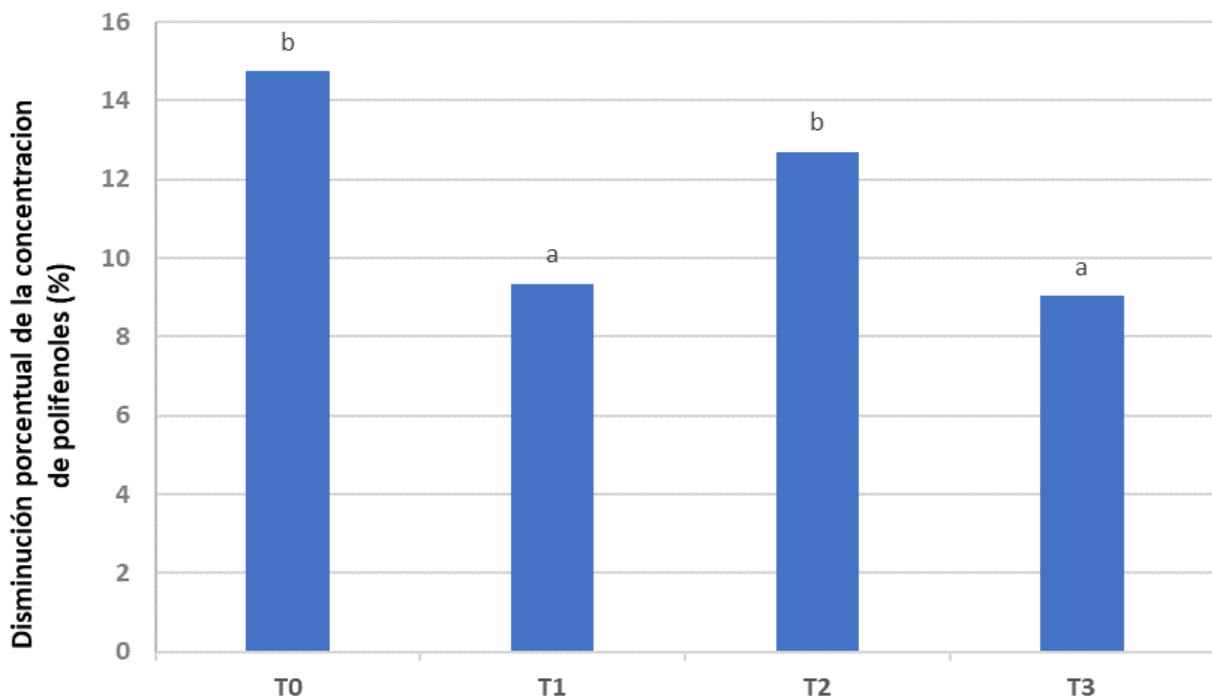


Figura 4: Disminución porcentual entre la concentración de polifenoles en el mosto al inicio y final del ensayo para cada tratamiento, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na₂S₂O₅; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na₂S₂O₅ y 15 mg/L de GSH. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey (p < 0,05).

Los tratamientos que involucraron el uso de SO₂, permitieron evitar en mayor medida la reducción de fenoles totales en el tiempo, en contraste con los tratamientos control y donde se usó GSH. Esto es concordante con lo demostrado por Arriola y Tapia (2017); Di Mattia et al. (2015); Makhotkina et al. (2013), quienes demostraron que la adición de SO₂ en el mosto, promueve un mayor contenido de polifenoles, gracias al papel protector del dióxido de azufre contra la oxidación.

Por otro lado, Makhotkina y Kilmartin (2009) también sostienen que el glutatión permite proteger los polifenoles de manera similar a como lo realiza el SO₂, al reaccionar con quinonas y reducirlas nuevamente a polifenoles o derivados de glutatión. Esto contrasta con lo anterior, los resultados obtenidos en este ensayo no evidenciaron un efecto significativo del GSH en la protección de los polifenoles.

4.3. Disminución porcentual de la concentración de catequinas

Las catequinas, cuya oxidación promueve la formación de quinonas y el pardeamiento del vino (Dal Cin, 2021), fueron analizadas para determinar su concentración y estabilidad en el tiempo.

De acuerdo con los resultados obtenidos del ANDEVA y la prueba de Tukey, el tratamiento que evitó de mejor manera la oxidación de catequinas fue T1 con una disminución de 1,8 % seguido por el tratamiento T3 el cual combinaba el uso de GSH y SO₂. En cuanto a la menor concentración, los tratamientos T0 y T2 fueron los que tuvieron el mayor porcentaje de disminución con un 13,9 % y 11% respectivamente (Figura 5).

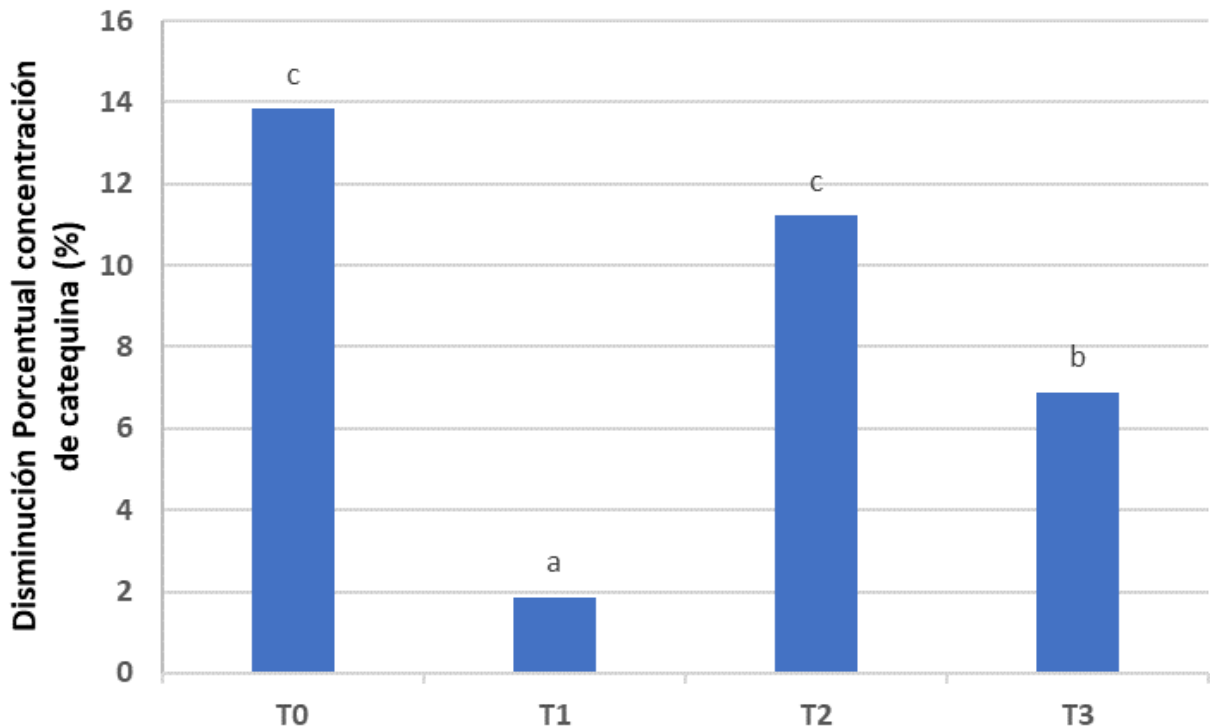


Figura 5. Disminución porcentual entre la concentración de catequina en el mosto al inicio y final del ensayo para cada tratamiento, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y 15 mg/L de GSH. Letras minúsculas distintas indican diferencias estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Los resultados obtenidos de la prueba de Tukey concuerdan con los datos obtenidos por Danilewicz y Wallbridge, (2010), quienes demostraron que el dióxido de azufre podía proteger eficazmente a las catequinas de la oxidación al reducir sus quinonas y recuperar los flavonoles.

Por otra parte, los autores Makhotkina y Kilmartin, (2009), demostraron que el glutatión permite proteger la catequina de la oxidación química en vinos, pero que puede ser menos efectiva que al utilizar SO_2 . Sin embargo, en este ensayo, los resultados obtenidos para el tratamiento con GSH demostraron que este compuesto no permitió evitar la oxidación enzimática de la catequina, ya que T2 no muestra una diferencia estadísticamente significativa con T0, el cual no contenía adición de antioxidantes.

Con respecto a lo concluido por los autores anteriormente mencionados, se esperaba que la combinación de GSH y SO_2 generaran una mejor protección que cuando se usan por sí solos, cosa que no se observó.

4.4. Disminución porcentual de la concentración de antocianinas

De acuerdo con los resultados obtenidos de la prueba de Tukey, se observó diferencias estadísticamente significativas entre algunos tratamientos (Figura 6). El tratamiento T1 fue el que logró evitar de mejor manera la pérdida de antocianinas en el tiempo, con una disminución de 10,5% durante el transcurso del experimento, seguido por T3, el cual logró una protección un poco más baja, pero significativamente inferior a las observadas para T0 y T2.

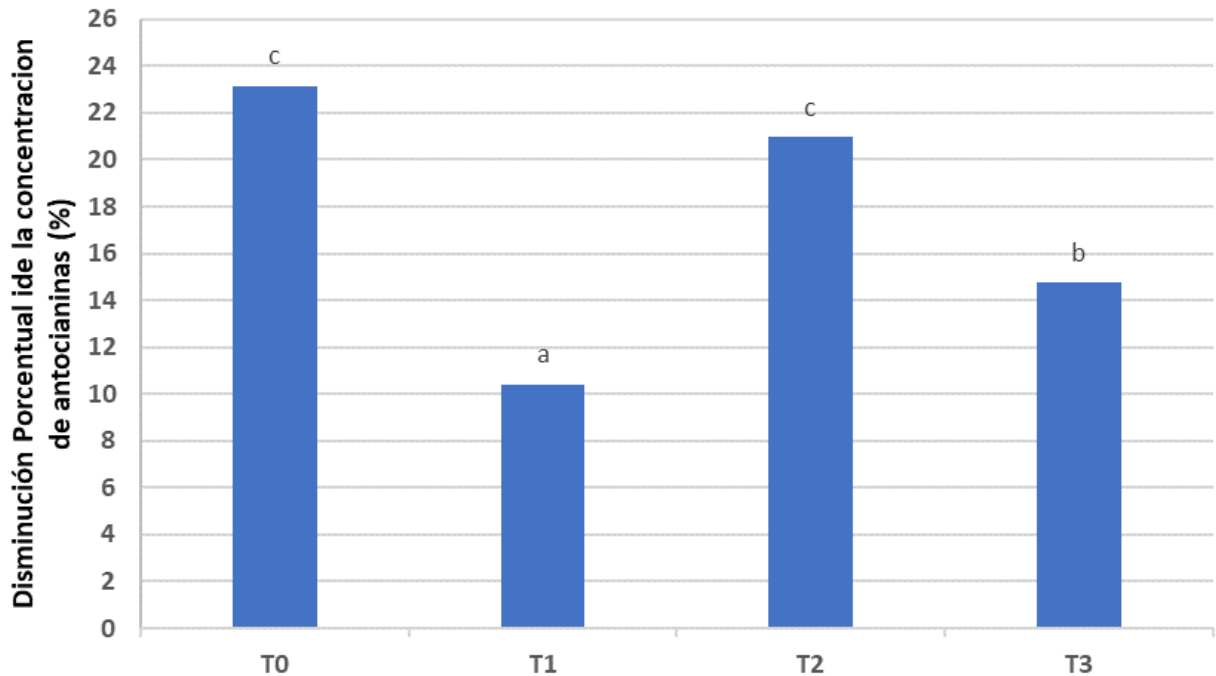


Figura 6. Disminución porcentual entre la concentración de antocianinas en el mosto al inicio y final del ensayo para cada tratamiento, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y 15 mg/L de GSH. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

En cuanto a T0 y T2, no se encontraron diferencias entre ellos, por lo tanto el uso de GSH por sí sólo, no impide la pérdida de los antocianos, derivada de la oxidación enzimática.

Los autores Gambuti et al., (2015), coinciden con los resultados de este ensayo, en donde evidencian que el SO_2 es un excelente conservador de antocianinas por sí sólo, así como en combinación con GSH. Sin embargo, el GSH por sí sólo no logra una buena mantención de estos compuestos. Por otro lado, Ćurko et al., (2021), también coincide, en que a mayores concentraciones de SO_2 se retrasa significativamente la pérdida de antocianinas en el tiempo.

4.5. Incremento porcentual de la concentración de acetaldehído

El acetaldehído es uno de los productos de oxidación más significativos observados en vinos, implicando una disminución de la calidad del producto final (Berradre et al., 2007). En mostos, el origen del acetaldehído deriva de las levaduras y de la contaminación con bacterias acéticas (Arriola y Tapia, 2017; Hernández y Barbero, 2008).

De acuerdo con el resultado del análisis estadístico ANDEVA y luego de la prueba de Tukey, se encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, siendo T0 el que difería con respecto a los demás. Se observó que el tratamiento T0 fue el que demostró el mayor incremento de acetaldehído durante el transcurso del experimento con un incremento del contenido de acetaldehído de casi 200% (Figura 7).

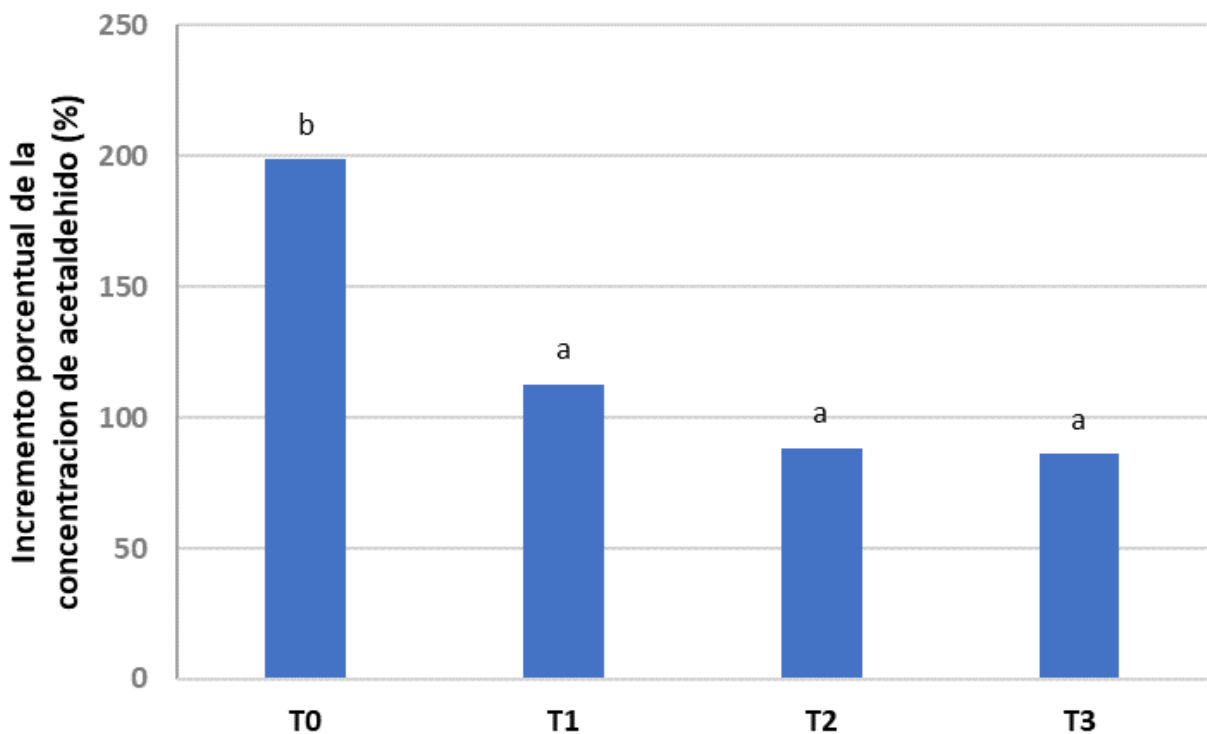


Figura 7: Incremento porcentual entre la concentración de acetaldehído en el mosto al inicio y final del ensayo para cada tratamiento, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y 15 mg/L de GSH. Letras minúsculas distintas indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Los autores Danilewicz y Wallbridge, (2010); Danilewicz et al., (2008), afirman que el SO_2 evita la formación de acetaldehído al reaccionar con este, evitando así la oxidación de polifenoles. Por otro lado Panero et al., (2015), concluyeron en su ensayo, que el SO_2 evita la formación de acetaldehído y que el GSH también lo hace, pero en una menor medida.

Si bien, en mostos, el acetaldehído se origina de manera diferente a como ocurre en vino, los resultados obtenidos evidencian que tanto el SO₂ como el GSH permiten reducir la formación de acetaldehído, coincidiendo con lo concluido por los autores mencionados anteriormente.

4.6. Absorbancia del mosto a diferentes longitudes de onda

Con el fin de obtener el índice de polifenoles totales de manera indirecta, se realizaron mediciones de absorbancias a 280 nm, a partir del método propuesto por Paronetto (1979).

Desde la figura 8, se observa que todos los tratamientos inician con una absorbancia de más o menos 18, esta absorbancia comienza a disminuir con el tiempo evidenciando una baja un poco más pronunciada en los tratamientos T0 y T2 los que al tiempo final marcaron una absorbancia de 14,2. Por otro lado, los tratamientos T1 y T3 marcaron una absorbancia más alta de 15.

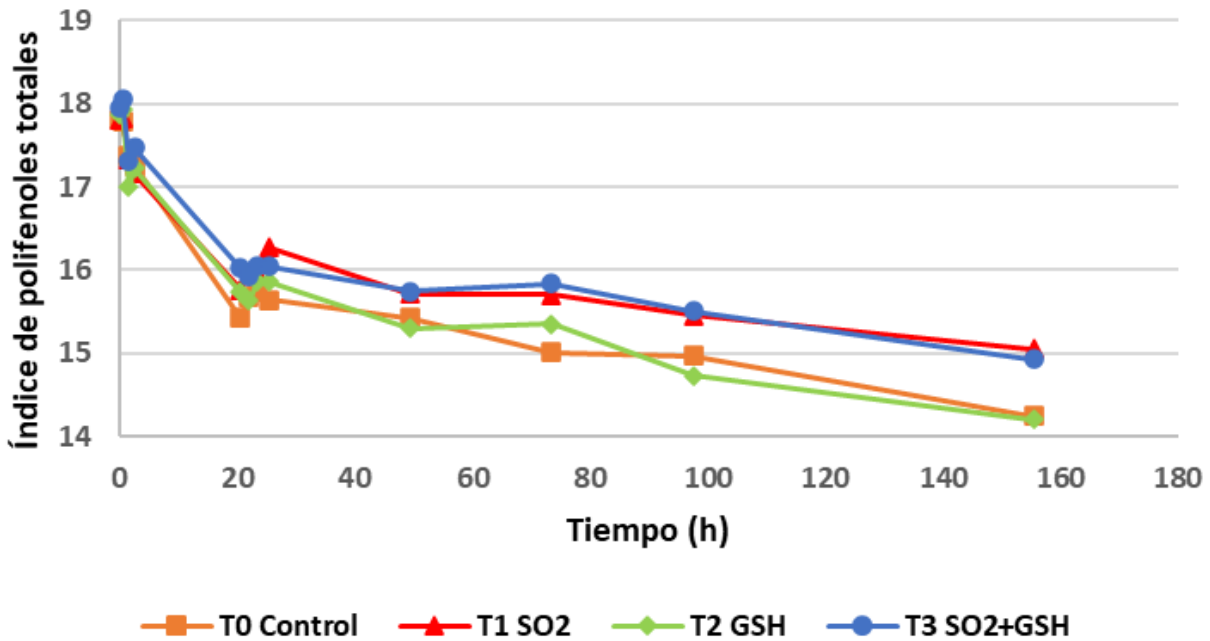


Figura 8: Evolución del índice de polifenoles totales en el tiempo al someter el mosto a una longitud de onda de 280 nm, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de Na₂S₂O₅; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de Na₂S₂O₅ y 15 mg/L de GSH.

Al observar una absorbancia un poco mayor en los tratamientos T1 y T3 podemos inferir que la concentración de polifenoles es mayor en estos dos tratamientos en contraste con los tratamientos T0 y T2. Estos resultados respaldan a los de la figura 3, reforzando que la concentración de polifenoles totales se mantuvo mayormente en los tratamientos que involucraban el uso de SO₂, ya que el porcentaje de disminución fue menor.

Por otra parte, se realizó la medición de absorbancia a 420 nm con el fin de obtener algún indicio de pardeamiento en el jugo ya que, a esta longitud de onda corresponde al rango del espectro de la zona de los colores amarillo pardo (Simpson, 1982).

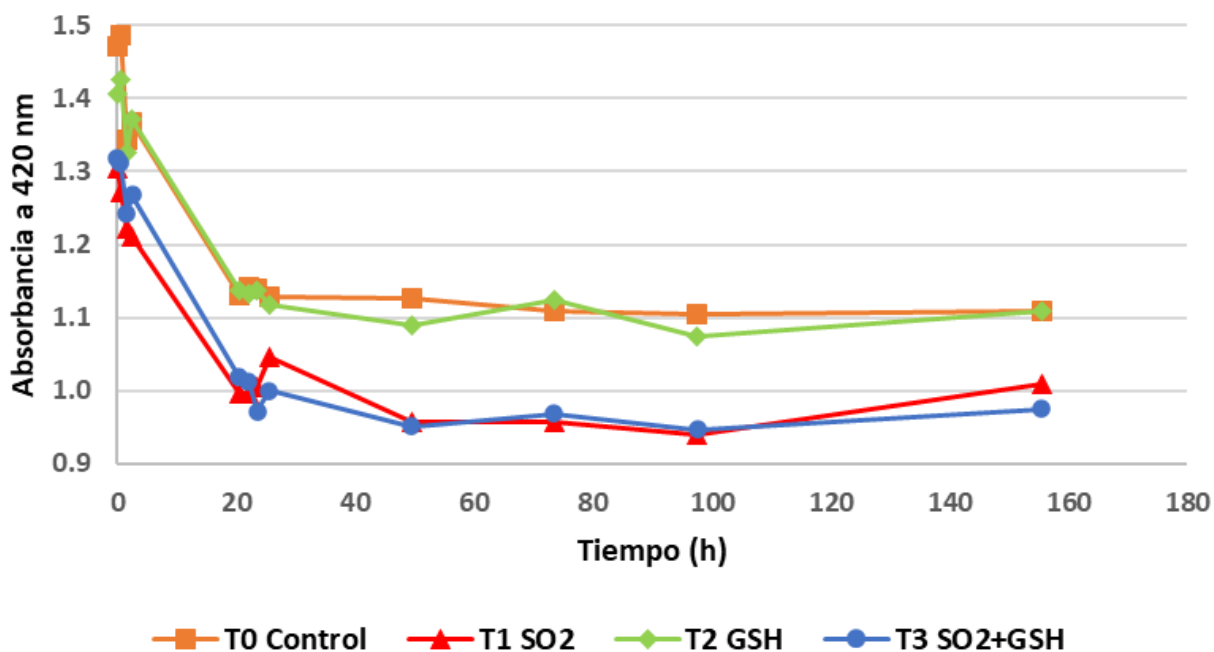


Figura 9: Evolución de la absorbancia en el tiempo al someter el mosto a una longitud de onda de 420 nm, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y 15 mg/L de GSH.

Los tratamientos mostraron una leve diferencia en cuanto a su curva de absorbancia en el tiempo (Figura 9), evidenciando una mayor absorbancia tanto al inicio como al final del ensayo en los tratamientos T0 y T2 con respecto a T1 y T3. Esto podría indicar que los jugos T0 y T2, presentan un mayor grado de pardeamiento desde el inicio de las mediciones, sugiriendo un mayor grado de oxidación desde el inicio al final del ensayo, lo cual a su vez quedó evidenciado en las mediciones de catequina, en donde se observa una mayor pérdida de catequina en estos dos tratamientos.

Los autores Makhotkina et al. (2013), demostraron que al tratar la uva con distintas dosis de SO_2 , el índice de pardeamiento a 420 nm era mayor en jugos que contenían menores dosis de sulfuroso. Por lo tanto, es posible respaldar que los tratamientos T1 y T3 al contener ambos SO_2 , evitaron en mayor medida el pardeamiento y oxidación del jugo.

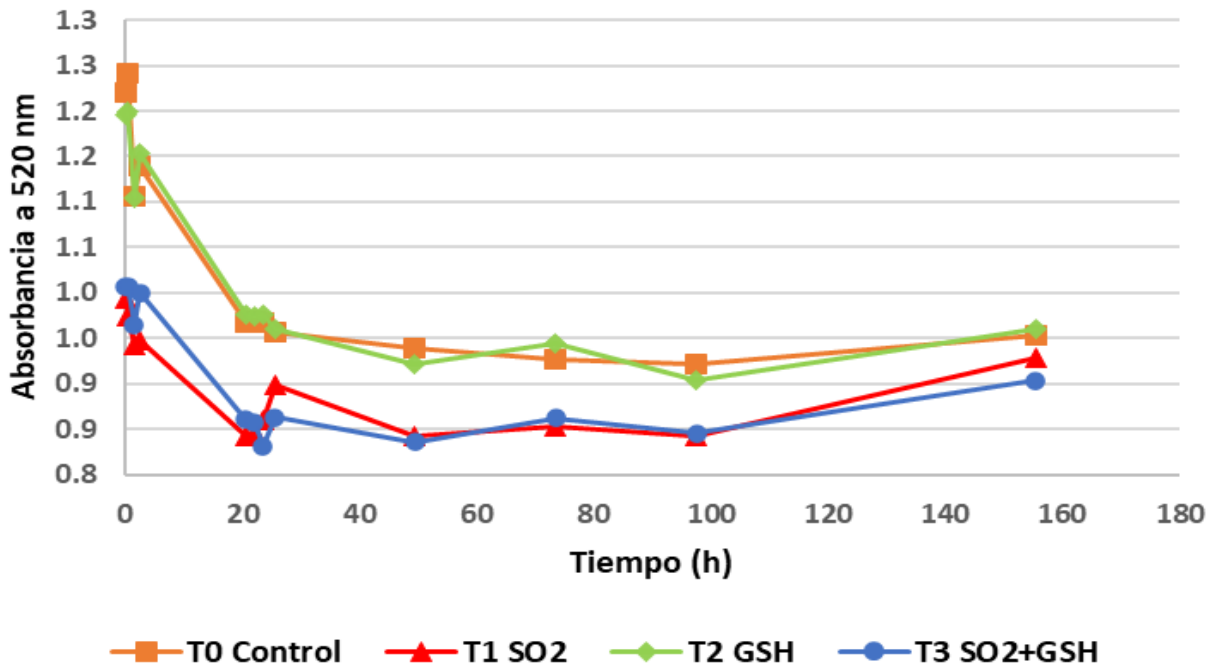


Figura 10: Evolución de la absorbancia en el tiempo al someter el mosto a una longitud de onda de 520 nm, donde: T0: Control sin adición de antioxidantes; T1: Mosto tratado con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; T2: Mosto tratado con 15 mg/L de GSH; T3: Mosto tratado con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y 15 mg/L de GSH.

Otra de las mediciones realizadas fue la absorbancia a 520 nanómetros (Figura 10), esto se realizó con el fin de conocer de manera indirecta la evolución de las antocianinas en el tiempo o coloración roja (Caravaca, 1999; Gambuti et al., 2015).

Se evidencia una notable diferencia, en donde los tratamientos T0 y T2, muestran una absorbancia mayor al inicio del ensayo de 1,3 y 1,2 respectivamente, con respecto a T3 y T1, los cuales estaban marcando una absorbancia de 1, esto probablemente producido por la decoloración provocada por el uso de SO_2 . Con el transcurso del tiempo las absorbancias fueron cambiando y al final del ensayo se registraron absorbancias más parecidas de entre 1 y 0,9 (Figura 10).

Con respecto al análisis de este gráfico, se evidencia una mayor coloración del jugo en los tratamientos que no contenían SO_2 (T0 y T2), contrario a lo que se aprecia en las mediciones directas de antocianinas en el jugo, en donde se evidenció que la mayor pérdida de antocianinas estuvo dada por estos dos tratamientos. Esto estaría explicado debido a que los sulfitos tienden a decolorar los compuestos antocianos debido a que se unen a estos haciéndolos incoloros (Zironi et al., 2009a) dando como resultado que, desde el inicio de las mediciones, los tratamientos T0 y T2 tengan una mayor coloración rojiza.

Sin duda es importante la realización de mayores estudios como este, que permitan encontrar alternativas al uso del SO₂ como antioxidante, con el fin de disminuir o suprimir su utilización en la enología ya que existe una percepción negativa por parte de la sociedad sobre el uso de los sulfitos, gatillada principalmente por los efectos negativos que puede tener sobre personas sensibles o alérgicas (Guerrero et al., 2015). Por lo tanto, resulta indispensable el estudio de conservantes como el GSH, ácido ascórbico, hidroxitirosol y los estilbenos, compuestos que se encuentran de forma natural en la uva y en el vino (Badea et al., 2017; Raposo Ortega, 2017).

5. CONCLUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio es posible concluir lo siguiente:

La aplicación combinada de 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y 15 mg/L de GSH sobre el mosto resultó ser más efectiva en limitar el progreso de las reacciones de oxidación enzimática de los compuestos evaluados en el ensayo, que la aplicación de GSH por sí solo, sin embargo, el uso de 70 mg/L de metabisulfito de sodio superó a los dos tratamientos antes mencionados, siendo el que logró la mayor protección ante la oxidación del mosto.

Se puede afirmar que el GSH no permitió la protección de los compuestos oxidables evaluados en el ensayo, ya que la disminución de polifenoles, catequina y antocianinas fue estadísticamente igual a la de los mostos que no contenían adición de antioxidantes.

Según lo anteriormente expuesto, se concluye que el SO_2 por sí solo permitió limitar la oxidación enzimática del mosto en mayor medida que al hacer uso de combinado de SO_2 y GSH. Sumado a esto, el GSH por sí solo no demostró protección alguna.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abramovič, H., Košmerl, T., Poklar ULrih, N., & Cigić, B. (2015). Contribution of SO₂ to antioxidant potential of white wine. *Food Chemistry*, 174, 147–153.
- Alimentar, S., Favero, D. M., Da, C., Gomes Ribeiro, S., & Dantas De Aquino, A. (2011). Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. *Segurança Alimentar e Nutricional*, 18(1), 11–20.
- Arriola, A., & Tapia, M. L. (2017). Análisis de oxidaciones controladas en mostos y vinos. Diplomatura de posgrado en procesos enológicos. San Rafael, Mendoza, Universidad Nacional de Cuyo.
- Badea, G. A., Tudor, V., & Teodorescu, R. I. (2017). Effects of adding glutathione and ascorbic acid before the alcoholic fermentation of the musts on the sensory profile of the white wines. *Scientific Papers. Series B, Horticulture*, LXI(June), 185–194.
- Badea, G., & Antoce, A. (2015). Glutathione As a Possible Replacement of Sulfur Dioxide in Winemaking Technologies: a Review. *Scientific Papers-Series B, Horticulture*, 59, 123–140.
- Berradre R, M. N., Páez R., G. B., Ramones B., E. A., Mármol P., Z. M., & Ferrer J. R., M. (2007). Control de oxidación de vinos blancos obtenidos bajo condiciones tropicales. *Revista de La Facultad de Agronomía*, 24(1), 133–153.
- Caravaca, E. (1999). Aplicación de métodos espectroscópicos al estudio de las características cromáticas de los componentes polifenólicos presentes en vinos.
- Cárdenas, D. (2020). Análisis evolutivo de la industria vitivinícola en Chile. Seminario para optar al título de Ingeniero Comercial mencion Economía. Santiago, Chile. Facultad de Economía y Negocios. Universidad de Chile.
- Comuzzo, P., Battistutta, F., Vendrame, M., Páez, M. S., Luisi, G., & Zironi, R. (2015). Antioxidant properties of different products and additives in white wine. *Food Chemistry*, 168, 107–114.
- Ćurko, N., Ganić, K. K., Tomašević, M., Gracin, L., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2021). Effect of enological treatments on phenolic and sensory characteristics of red wine during aging: Micro-oxygenation, sulfur dioxide, iron with copper and gelatin fining. *Food Chemistry*, 339, 127848.
- Dal Cin. (2021). Longevidad de los vinos blancos: medidas a tomar durante el afinamiento para reducir los riesgos debidos al oxígeno. *Enología Del Siglo XXI*, ISSN 2605-5465, Nº. 5, 2021, Págs. 64-66, 5, 64–66.

- Danilewicz, J. C., Seccombe, J. T., & Whelan, J. (2008). Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfur Dioxide in Model Wine and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(2).
- Danilewicz, J. C., & Wallbridge, P. J. (2010). Further Studies on the Mechanism of Interaction of Polyphenols, Oxygen, and Sulfite in Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61(2).
- Delteil, D. (2000). Los diferentes roles del oxígeno. *Viticultura Enología Profesional*, 74, 35–45.
- Deshaies, S., Cazals, G., Enjalbal, C., Constantin, T., Garcia, F., Mouls, L., & Saucier, C. (2020). Red wine oxidation: Accelerated ageing tests, possible reaction mechanisms and application to syrah red wines. *Antioxidants*, 9(8), 1–15.
- Di, C. D., Piva, A., Martuscelli, M., Mastrocola, D., & Sacchetti, G. (s. f.). EFFECT OF SULFITES ON THE IN VITRO ANTIOXIDANT ACTIVITY OF WINES. En *Ital. J. Food Sci* (Vol. 27).
- Díaz, I., Castro, R. I., Ubeda, C., Loyola, R., & Laurie, V. F. (2021). Combined effects of sulfur dioxide, glutathione and light exposure on the conservation of bottled Sauvignon blanc. *Food Chemistry*, 356, 129689.
- du Toit, W. J., Marais, J., Pretorius, I. S., & du Toit, M. (2006). Oxygen in Must and Wine: A review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, 27(1).
- Enrique López, M. (2011). Potencial de péptidos y enzimas con capacidad antimicrobiana para el control de microorganismos alterantes de vino.
- Ferrer-Gallego, R., Puxeu, M., Nart, E., Martín, L., & Andorrà, I. (2017). Evaluation of Tempranillo and Albariño SO₂-free wines produced by different chemical alternatives and winemaking procedures. *Food Research International*, 102, 647–657.
- Gambutí, A., Han, G., Peterson, A. L., & Waterhouse, A. L. (2015). Sulfur dioxide and glutathione alter the outcome of microoxygenation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(4), 411–423.
- Gómez Plaza, M. E. (2016). Fundamentos de la microoxigenación de vinos tintos: factores influyentes y aplicaciones. *ACE: Revista de Enología*, ISSN-e 1697-4123, N°. 157, 2016, 157, 1.
- Guerrero, C. A. (2009). Inhibición de la actividad enzimática de la polifenol oxidasa extraída del banano (cavendish valery) mediante sistemas bifásicos acuosos con isoespintanol y ácido ascórbico. Trabajo de grado para optar al título de Magíster en Ciencia y Tecnología de Alimentos. Medellín, Colombia. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia.
- Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: A parameter review. En *Trends in Food Science and Technology* (Vol. 42, Issue 1, pp. 27–43). Elsevier Ltd.

- Guerrero, R. F., Cantos-Villar, E., Puertas, B., & Ortiz, V. (2015). Sulfuroso en la Elaboración de Vinos. Alternativas. En Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural, Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.
- Gutiérrez, S., & Ricagno, N. (2010). Comercialización de mosto de uva. Tesis de grado. Uruguay. Facultad de Ciencias Económicas y de Administración. Universidad de la República.
- Hernandez I, & Barbero F. (2008). Bacterias acéticas: técnicas de detección y eliminación.
- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., & Du Toit, W. J. (2013). Role of glutathione in winemaking: A review. En *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 61, Issue 2, pp. 269–277).
- Laurie, V. F., Álamo Sanza, M. del, & Nevares Domínguez, I. (2016). La microoxigenación silenciosa en bodegas de vinificación. *ACE: Revista de Enología*, ISSN-e 1697-4123, N°. 157, 2016, 157, 2.
- Laurie, V. F., & Peña Neira, Á. (2012). Oxígeno y vinos tintos. *ACE: Revista de Enología*, ISSN-e 1697-4123, N°. 131, 2012, 131, 3.
- Li, H., Guo, A., & Wang, H. (2008). Mechanisms of oxidative browning of wine. En *Food Chemistry* (Vol. 108, Issue 1, pp. 1–13). Elsevier.
- Makhotkina, O., Herbst-Johnstone, M., Logan, G., du Toit, W., & Kilmartin, P. A. (2013). Influence of sulfur dioxide additions at harvest on polyphenols, C6-compounds, and varietal thiols in sauvignon blanc. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(2), 203–213.
- Makhotkina, O., & Kilmartin, P. A. (2009). Uncovering the influence of antioxidants on polyphenol oxidation in wines using an electrochemical method: Cyclic voltammetry. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 633(1), 165–174.
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (ODEPA). (2020). Vinos.
- OIV. (2022). Actualidad de la coyuntura del sector vitivinícola mundial en 2021.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., & Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. En *Food Research International* (Vol. 44, Issue 5, pp. 1115–1126). Elsevier.
- Panero, L., Motta, S., Petrozziello, M., Guaita, M., & Bosso, A. (2015). Effect of SO₂, reduced glutathione and ellagitannins on the shelf life of bottled white wines. *European Food Research and Technology*, 240(2), 345–356.
- Ragan, D. L., & Troxler, S. (sin fecha). ¿Por qué los sulfitos se deben mencionar en las etiquetas? North Carolina Department of Agriculture and Consumer Services Food and Drug Protection Division.

- Raposo Ortega, R. M. (2017). Alternativas al anhídrido sulfuroso en la elaboración de vinos: antioxidantes de naturaleza fenólica procedentes de subproductos de la industria oleícola y enológica. Memoria presentada para optar al título de Doctor. Córdoba, España, Universidad de Córdoba.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications (Second Edition). John Wiley & Sons Ltd.
- SAG. (2021). Catastro Vitícola Nacional 2021.
- Simpson, R. F. (1982). The Australian Wine Research Institute. En *Vitis* (Vol. 21).
- Singleton, V. L. (1987). Oxygen with Phenols and Related Reactions in Musts, Wines, and Model Systems: Observations and Practical Implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38(1).
- Singleton, V. L., Salgues, M., Zaya, J., & Trousdale, E. (1985). Caftaric Acid Disappearance and Conversion to Products of Enzymic Oxidation in Grape Must and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36(1).
- Tarko, T., Duda-Chodak, A., Sroka, P., & Siuta, M. (2020). The Impact of Oxygen at Various Stages of Vinification on the Chemical Composition and the Antioxidant and Sensory Properties of White and Red Wines. En *International Journal of Food Science* (Vol. 2020). Hindawi Limited.
- Waterhouse, A. L., & Laurie, V. F. (2006). Oxidation of Wine Phenolics: A Critical Evaluation and Hypotheses. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3).
- Zironi, R., Comuzzo, P., Tat, L., & Scobioala, S. (2009a). GESTIÓN DEL SO₂ EN LA ENÓLOGIA DE BAJO IMPACTO AMBIENTAL.
- Zironi, R., Comuzzo, P., Tat, L., & Scobioala, S. (2009b). Oxígeno Y Vino. *Revista En Internet De Viticultura Y Enología Oxígeno Y Vino*, 1–5.

7. ANEXOS

1. Salidas programa estadístico Statgraphics 19

Pruebas de Múltiple Rangos para Acetaldehído por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T3	3	86.3333	X
T2	3	88.5	X
T1	3	112.9	X
T0	3	198.667	X

Pruebas de Múltiple Rangos para Polifenoles por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T3	3	9.03333	X
T1	3	9.36667	X
T2	3	12.7	X
T0	3	14.7333	X

Pruebas de Múltiple Rangos para Catequina por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T1	3	1.86667	X
T3	3	6.9	X
T2	3	11.2	X
T0	3	13.8667	X

Pruebas de Múltiple Rangos para Antocianinas por Tratamiento

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
T1	3	10.4333	X
T3	3	14.7667	X
T2	3	20.9667	X
T0	3	23.1667	X



Figura 1. Botellas Schott con 300 mL de mosto de mosto cada una. Cada botella con su respectivo tratamiento, T0: sin antioxidantes; T1: con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$; T2: con 15 mg/L de GSH; T3: con 70 mg/L de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ y 15 mg/L de GSH.



Figura 2. Medición de oxígeno disuelto con analizador NomaSense O₂.



Figura 3. Medición de °Brix al mosto utilizado en el ensayo.



Figura 4. Preparación de muestras en placa para analizar en espectrofotómetro Epoch.



Figura 5. Análisis de polifenoles, catequina, antocianinas y acetaldehído mediante el analizador automático Y15.