



**UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA**



**ESTUDIO PROSPECTIVO DE UNA LENGUA  
ELECTRÓNICA PARA LA DETECCIÓN DE FENOLES Y  
GUAYACOLES EN VINO**

**Universitat Politècnica de València**

**Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural**

**Master Universitario en Enología**

**2015/2016**

**PAULA ANDRÉS GARCÍA**

**Tutor: Ana Isabel Jiménez Belenguer.**

**Cotutor: Francisco Javier Ibáñez Civera.**

**Director experimental: Luis Salvador Terrades Rocafull.**

**VALENCIA, SEPTIEMBRE DE 2016**

**Título:** Estudio prospectivo de una lengua electrónica para la detección de Fenoles y Guayacoles en vino.

**Title:** Prospective study of an e-tongue for detecting Phenols and Guaiacols in wine.

**Resumen:** Los fenoles volátiles 4-etilfenol, 4-etilguayacol, 4-vinilfenol y 4-vinilguayacol son uno de los problemas más importantes en la elaboración y crianza del vino actualmente. La levadura *Brettanomyces bruxellensis* transforma los vinilfenoles en etilfenoles, que producen un carácter fenólico en los vinos y modifican completamente su perfil sensorial de forma negativa. El umbral de percepción de estos compuestos tiene el límite de detección en 450 µg/L para la suma de 4-etilfenol y 4-etilguayacol. Sin embargo, una percepción odorante clara de la presencia de 4-etilfenol se encuentra a partir de 600 µg/L de este compuesto, ya que se vuelve un carácter dominante a esta concentración. Esta alteración aparece principalmente en vinos que ya han terminado la fermentación alcohólica y maloláctica, es decir, durante el proceso de almacenamiento y crianza de los mismos. Desde un punto de vista práctico, para controlar el crecimiento de *Brettanomyces* en una bodega y poder evitar alteraciones en los vinos rápidamente es fundamental disponer de métodos de detección en tiempo real. En este estudio se ha logrado un método que puede ayudar a detectar la proliferación de esta levadura en los depósitos y/o barricas de la bodega de forma temprana, utilizando para ello la espectroscopia de impedancia para medir los metabolitos que produce a través de una lengua electrónica.

**Abstract:** The volatile phenols 4-ethylphenol, 4-ethylguaiacol, 4-vinylphenol and 4-vinylguaiacol are one of the most important problems in the production and aging of wine actually. *Brettanomyces bruxellensis* yeast transforms vinylphenols in ethylphenols, which produce a phenolic character in wines and change completely their sensory profile in a negative way. The threshold of perception of these compounds is the detection limit 450 µg/L for the sum of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol. However, a clear perception of odorant presence of 4-ethylphenol is from 600 µg/L of this compound, as it becomes a dominant character at this concentration. This alteration occurs mainly in wines that have already completed the alcoholic and malolactic fermentation, ie during their storage and aging. From a practical standpoint, to control the growth of *Brettanomyces* in a winery and to avoid disruptions in wine is essential to have fast detection methods in real time. In this study we could achieve a method that can help to detect early the proliferation of this yeast in wine deposits or barrels in a winery, using impedance spectroscopy to measure the metabolites produced by this yeast via an electronic tongue.

**Palabras clave:** Brettanomyces, Dekkera, lengua electrónica, etilfenoles, vinilfenoles, fenoles volátiles, vino, bodega.

**Keywords:** Brettanomyces, Dekkera, e-tongue, ethylphenols, vinylphenols, volatile phenols, wine, winery.

**Alumna:** Dña. Paula Andrés García.

**Tutor académico:** Prof. Dña. Ana Isabel Jiménez Belenguer.

**Cotutor:** Prof. D. Francisco Javier Ibáñez Civera.

**Director experimental:** D. Luis Salvador Terrades Rocafull.

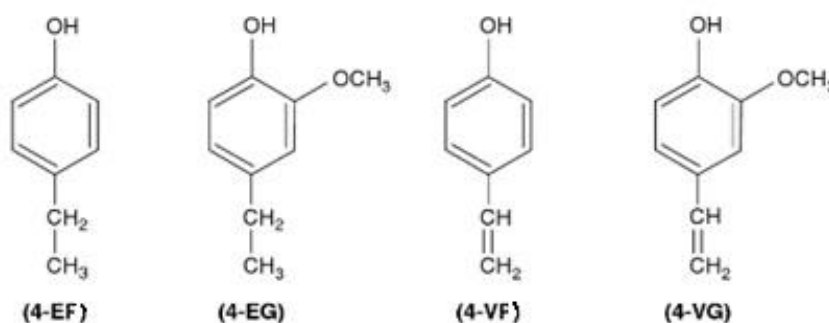
Valencia, septiembre de 2016.

# ÍNDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Objetivos	4
3. Materiales y métodos	
3.1. Material y reactivos	4
3.2. Preparación de las disoluciones	4
3.3. Medidas de impedancia	5
3.4. Tratamiento de los datos	6
4. Resultados y discusión	
4.1. Estudio en agua	7
4.2. Estudio en vino	8
4.3. Estudio de la impedancia	11
4.4. Estudio de la conductividad	15
5. Conclusiones	17
6. Agradecimientos	17
7. Referencias bibliográficas	18

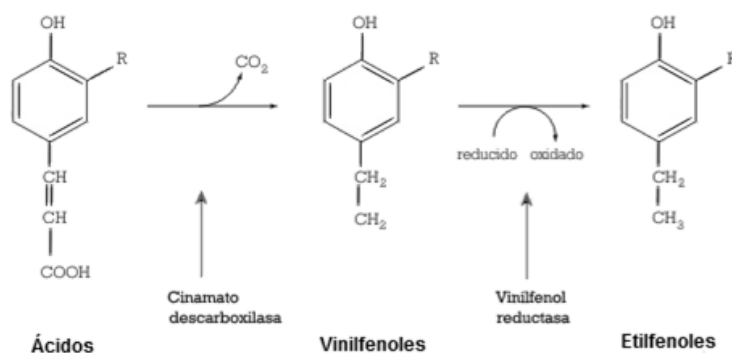
## 1. INTRODUCCIÓN

Los fenoles volátiles 4-etilfenol (4-EF), 4-etilguayacol (4-EG), y sus precursores 4-vinilfenol (4-VF) y 4-vinilguayacol (4-VG), cuyas estructuras químicas pueden observarse en la **figura 1**, son uno de los problemas más importantes en la elaboración y crianza de vinos.



**Figura 1.** Estructura de los fenoles volátiles presentes en el vino.

Los etilfenoles se producen como consecuencia de la actividad enzimática realizada de forma secuencial por dos enzimas producidas por las levaduras de contaminación pertenecientes al género *Brettanomyces* (o a su forma asexual *Dekkera*). Tal y como se ve en la **figura 2**, el primer paso es la descarboxilación de los ácidos hidroxicinámicos presentes en el vino a vinilfenoles (4-vinilfenol y 4-vinilguayacol) mediante la enzima cinamato descarboxilasa, y la posterior reducción de estos vinilfenoles a etilfenoles (4-etilfenol y 4-etilguayacol) por la acción de la vinilfenol reductasa (Steinke & Paulson, 1964).



**Figura 2.** Proceso de síntesis de etilfenoles a partir de ácidos cinámicos por *Brettanomyces* spp.

Los ácidos hidroxicinámicos son más abundantes en vinos tintos que en blancos debido al diferente proceso de elaboración: en el caso de los tintos, la fermentación del

mosto se realiza de forma conjunta con las partes sólidas de la uva, lo que provoca la cesión de estos ácidos debida a la maceración, ya que es en estas partes donde se encuentran. Por otra parte estos vinos también tienen un grado alcohólico más alto y una acidez más baja, lo que propicia además la aparición de esta alteración (Navascués López-Cordón, 2005).

Otros microorganismos, como las bacterias lácticas, pueden producir pequeñas trazas de etilfenoles, pero en proporciones muy bajas, que contribuyen a dar una complejidad aromática en los vinos. Estas bacterias, junto con determinadas especies de levaduras fermentativas, aumentan por otra parte la concentración de vinilfenoles, producidos como metabolitos secundarios de su actividad fermentativa. Esto supone un problema añadido ya que los vinilfenoles son utilizados posteriormente por *Brettanomyces/Dekkera* en la producción de etilfenoles tal y como observábamos en la **figura 2** (P. Chattonnet, Dubourdieu, & Boidron, 1995; Pascal Chattonnet, Viala, & Dubourdieu, 1997).

Cuando los etilfenoles se encuentran en grandes concentraciones por la actividad de *Brettanomyces*, producen un carácter fenólico en los vinos, modificando completamente su perfil sensorial. A estos compuestos se atribuyen diferentes aromas, que aparecen recogidos en la **tabla 1**. El umbral de percepción de estos compuestos tiene el límite de detección en 450 µg/L para la suma de 4-etilfenol y 4-etilguayacol. Sin embargo, una percepción odorante clara de la presencia de 4-etilfenol se encuentra a partir de 600 µg/L de este compuesto, ya que se vuelve un carácter dominante a esta concentración (Chattonnet, Dubordieu, & Boidron, 1993). Sensorialmente, somos capaces de detectar la contaminación, si bien cuando la detectamos, ya es tarde para la recuperación del vino.

4-etilfenol	4-etilguayacol	4-vinilfenol	4-vinilguayacol
440 µg/L	47 µg/L	180 µg/L	130 µg/L
Sudor de caballo, establo, cuero	Madera quemada, especias	Medicina, farmacéutico	Clavel

**Tabla 1.** Tabla con los umbrales de percepción y los prescriptores aromáticos de los fenoles volátiles.

Tanto *Brettanomyces* como *Dekkera* se encuentran de forma extendida en todas las zonas de vinificación y crianza de una bodega (suelo, depósitos, mangueras, barricas, etc.), pero a unos niveles de población controlados y generalmente bajos (Costantini et al., 2007). Para que la alteración se desarrolle no se precisa un número elevado de

células, ya que una cantidad de 1000 células/mL sería suficiente para que la calidad organoléptica del vino desaparezca (González & Navascués López-Cordón, 2006).

El carácter Brett aparece principalmente en vinos que ya han terminado la fermentación alcohólica y maloláctica, es decir, durante el proceso de almacenamiento y crianza de los mismos. Esto se debe a la escasa competencia con otros microorganismos, que cesan su actividad en el vino ya terminado y permiten el establecimiento de *Brettanomyces bruxellensis* (Silva, Cardoso, & Gerós, 2004). Esta especie tiene un crecimiento lento y unos requerimientos muy bajos de sustrato para su desarrollo. Debido a su baja actividad fermentativa utiliza trazas de azúcares residuales como fuente de carbono (sobre 300 mg/L de glucosa y fructosa) para formar etilfenoles perceptibles, por lo que este problema podría presentarse en cualquier vino seco. Además, esta levadura presenta una alta resistencia a la acidez, el sulfuroso y el alcohol (Chattonet, 2004).

Así pues, desde un punto de vista práctico, para controlar el crecimiento de *Brettanomyces/Dekkera* en una bodega y poder evitar alteraciones en los vinos rápidamente es fundamental disponer de métodos de detección en tiempo real. Por desgracia, la mayoría de técnicas actuales para su detección en bodegas requieren mucho tiempo y son de naturaleza destructiva. Podemos citar en este sentido, los métodos de detección en bodegas basados en análisis microbiológicos mediante cultivos diferenciales y selectivos para *Brettanomyces* en medios sólidos. Sin embargo, estas técnicas presentan un problema temporal, ya que la levadura tarda entre 7 y 10 días en formar colonias, lo que implica un largo tiempo de espera para poder hacer un recuento fiable de las poblaciones. Otro método muy usado son los kits comerciales, basados en cultivos también específicos en medio líquido, pero el tiempo de espera es más largo todavía que en los anteriores y la sensibilidad de detección que tienen es menor (Suárez-Lepe et al., 2008). Una buena forma de sustitución de estos métodos para los análisis de vinos son las lenguas y narices electrónicas. Estos aparatos utilizan uno o varios electrodos que se introducen en una disolución a analizar y mediante conjunto de sensores internos dan una respuesta de las especies químicas que hay en el medio, mediante un procesamiento quimiométrico incorporado que permite interpretar esas señales químicas y extraer los correspondientes datos (Cetó, 2012).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo de este estudio es estudiar de forma prospectiva la posible aplicación de la espectroscopia de impedancia para detectar la proliferación de *Brettanomyces/Dekkera* en los depósitos y/o barricas vino de una bodega de forma temprana, inmediata y no destructiva, mediante el análisis de los metabolitos que este hongo produce.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Material y reactivos**

Los fenoles volátiles utilizados para el estudio, 4-etilfenol, 4-etilguayacol, 4-vinilfenol y 2-metoxi-4-vinilfenol (4-vinilguayacol), fueron obtenidos de Sigma-Aldrich Co. ( $\geq 98\%$  FG), y utilizados sin una purificación adicional.

### **3.2. Preparación de las disoluciones**

Para la preparación de las disoluciones patrón se utilizó agua desionizada y alcohol con un 13,5% v/v de pureza alcohólica (se ajustó al contenido en grado de alcohol más común en vinos tintos de la Denominación de Origen Valencia). Para la preparación de las disoluciones con vino, se usó un tinto joven procedente de la Sociedad Cooperativa La Viña. El vino utilizado procede de la variedad tempranillo, tiene un grado alcohólico de 13,5% y está envasado en el formato de bag in box, que evita oxidaciones y variaciones en el mismo gracias a su modo de apertura y cierre hermético. Todo el vino procede de un mismo lote de envasado, para asegurar la máxima homogeneidad posible del producto.

Todas las muestras fueron preparadas disolviendo una cantidad conocida del fenol correspondiente en el solvente (agua + etanol o vino), dejándose en agitación magnética continua durante 30 minutos para obtener una correcta homogeneidad. Una vez preparadas, las muestras se introdujeron en tubos Falcon de 50 ml para su medida.

En un principio, en las disoluciones con agua y etanol como disolventes, se añadió cloruro potásico (Panreac AppliChem) como electrolito en diferentes concentraciones, debido a la falta de conductividad observada en el medio. Con esto se vieron cambios en la impedancia al añadir los compuestos. Sin embargo, esta adición de electrolitos no fue necesaria en el estudio final de las disoluciones con vino, debido a sus propiedades.

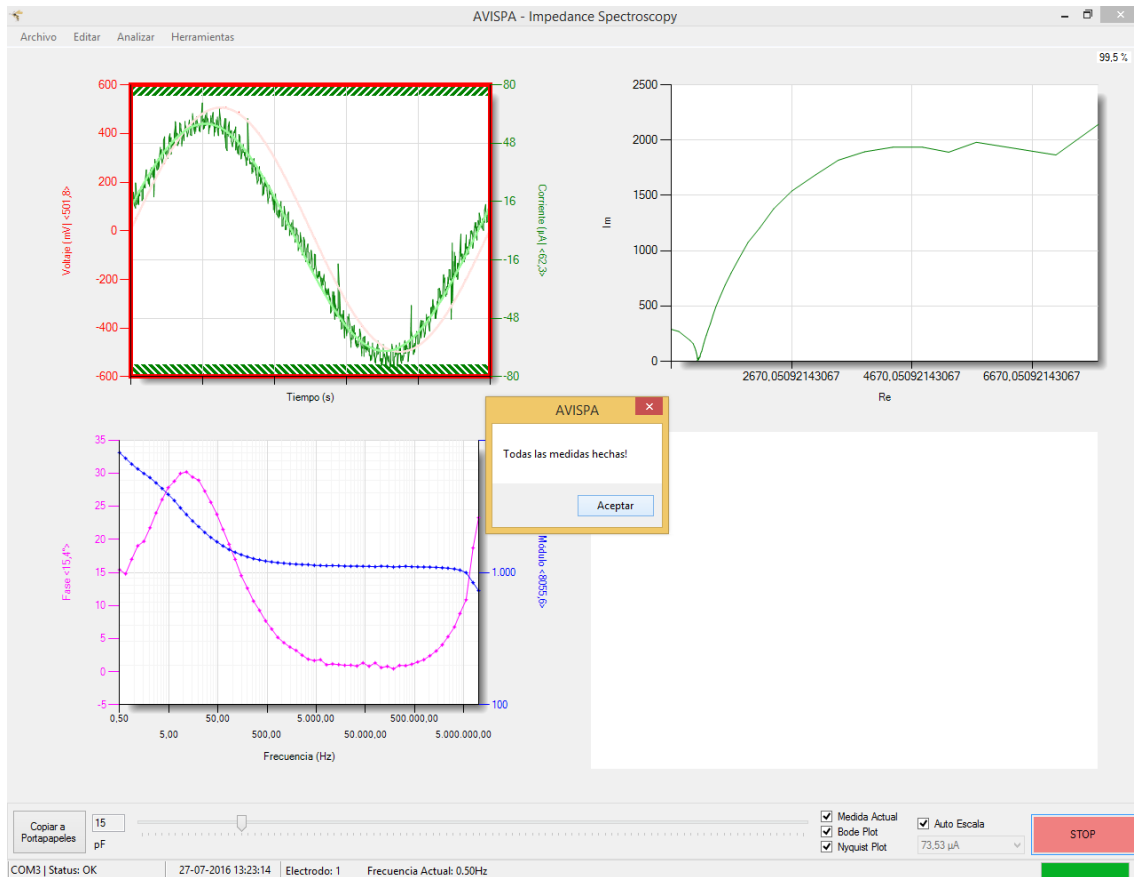
### 3.3. Medidas de impedancia

Las medidas se realizaron por el método de espectroscopía de impedancia en una lengua electrónica, usando para ello el sistema Advanced Voltammetry Impedance Spectroscopy Potentiometry Analyzer (AVISPA), cedido por el departamento de Ingeniería Electrónica de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño (ETSID, UPV). Este aparato lleva conectado un soporte formado por dos electrodos de acero inoxidable, de 3.29-3.32 mm de longitud, 2.18-2.16 mm de diámetro y con 5.9 mm de espacio entre ellos. Para realizar la medida se introdujeron directamente los electrodos en la disolución, cuidando de no producir contacto entre las paredes del tubo y los electrodos, para evitar interferencias en la señal emitida por la lengua electrónica. Posteriormente se generaba la medida con el software incorporado del sistema.

El orden de introducción de las muestras para su medida fue siempre de menor a mayor concentración de electrolitos y/o fenoles. Entre cada medida, se realizó una limpieza de los electrodos con etanol puro, seguida de un lavado con agua destilada.

En cuanto a la configuración de la AVISPA, se utilizaron los siguientes parámetros: voltaje de 0 a 500 mV, realizando 2 ciclos preliminares y en un rango de frecuencias de 10 MHz a 0,5 Hz, tomándose 60 medidas en cada rango. Todas las medidas fueron realizadas por triplicado mediante repeticiones de las mismas, y con las muestras a temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Tras cada medida, los datos registrados por la AVISPA, son tratados por el software residente de la misma, dando unos valores expresados en módulo y fase (**figura 3**).





**Figura 3.** Tratamiento y expresión de los datos por el software de la AVISPA.

En la **figura 3** puede verse el comportamiento de la AVISPA cuando se genera una medida. Esta figura se subdivide a su vez, en 3 imágenes; abajo a la izquierda se observa cómo se enfrentan tanto el módulo (azul) en ohmios como la fase (rosa) en grados frente a la frecuencia en hercios en cada medida, que posteriormente se estudian por separado. Por otra parte, en la imagen de arriba a la izquierda pueden verse la corriente (verde) medida en micro amperios y el voltaje (rojo) en mili voltios a tiempo real, en segundos. La última imagen de la derecha representa los valores de la componente real (Re) y la imaginaria (Im), que forman la medida de la impedancia, lo cual se estudiará más adelante con el tratamiento y transformación de los datos.

### 3.4. Tratamiento de los datos

Los valores obtenidos por el programa, que se generan en un archivo csv., se separan en datos de módulo y fase, ambos por cada una de las frecuencias del rango estipulado. Posteriormente, estos valores son tratados para obtener la parte real o resistencia ( $R$ ) de la impedancia ( $Z$ ) que se mide en ohmios, y su parte imaginaria o reactancia ( $X$ ):

$$Z = R + jX \quad (1)$$

A partir de los valores  $R$  y  $X$ , se obtienen los valores de  $\varepsilon'$  (constante dieléctrica o permitividad) y  $\varepsilon''$ , (factor de pérdidas), los cuales son necesarios junto con la constante eléctrica del vacío ( $\varepsilon_0$ ) y el campo eléctrico ( $E$ ) para el cálculo de la acumulación de energía por la radiación en el medio según la Ley de Gauss:

$$\bar{D} = (\varepsilon' - j\varepsilon'')\varepsilon_0 \cdot E \quad (2)$$

Este electromagnetismo se mide a través del campo de desplazamiento eléctrico ( $\bar{D}$ ) en culombios por metro cuadrado (C/m<sup>2</sup>).

Todas estas constantes son necesarias para el procesamiento junto con la conductividad del vino ( $\sigma$ ), que mediremos en siemens por metro (S/m).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

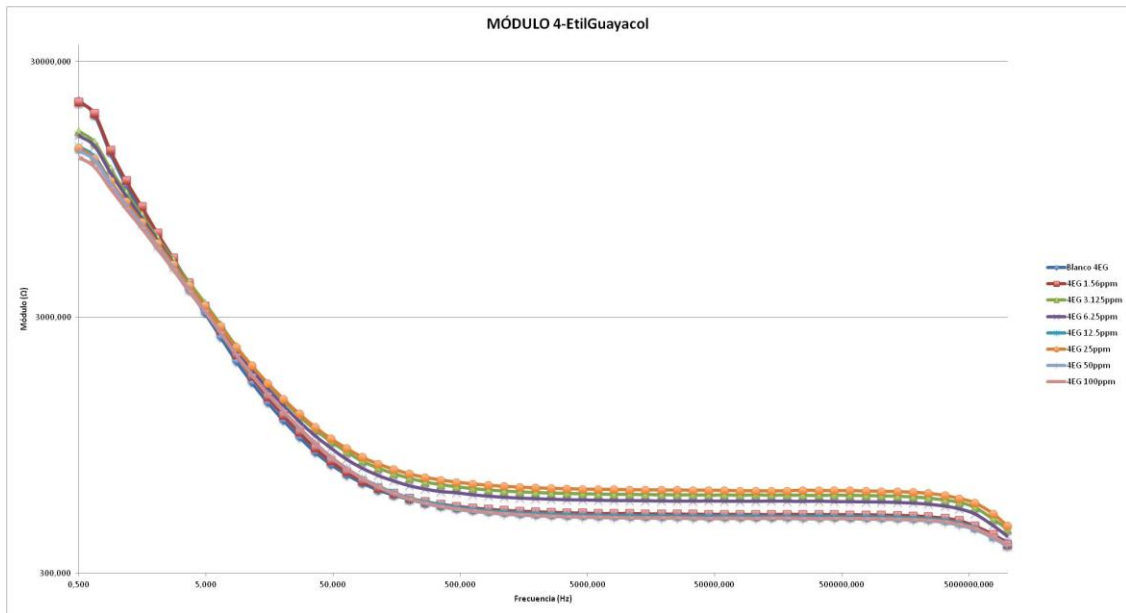
### **4.1. Estudio en mezclas agua/etanol**

Las primeras pruebas se realizaron en un medio de agua destilada al 13,5% de etanol. En estas condiciones no podían observarse los resultados con claridad debido a la falta de conductividad de la disolución, por lo que se procedió a la adición de diferentes concentraciones de cloruro potásico. Esto permitió observar cambios en la respuesta en función de las cantidades de sal añadidas, que van desde 10<sup>-5</sup> M hasta 10<sup>-3</sup> M. Las cantidades de etilfenoles añadidas van desde 4 ppm hasta 1000 ppm, realizando las diluciones en tercios. Los resultados presentaban una gran aleatoriedad, por lo que se concluyó que a pesar de que la sal fuese necesaria para poder medir en un medio como el agua/etanol, su presencia en determinadas cantidades puede influir en la medición de los datos de tal forma que no permite observar con claridad su comportamiento.

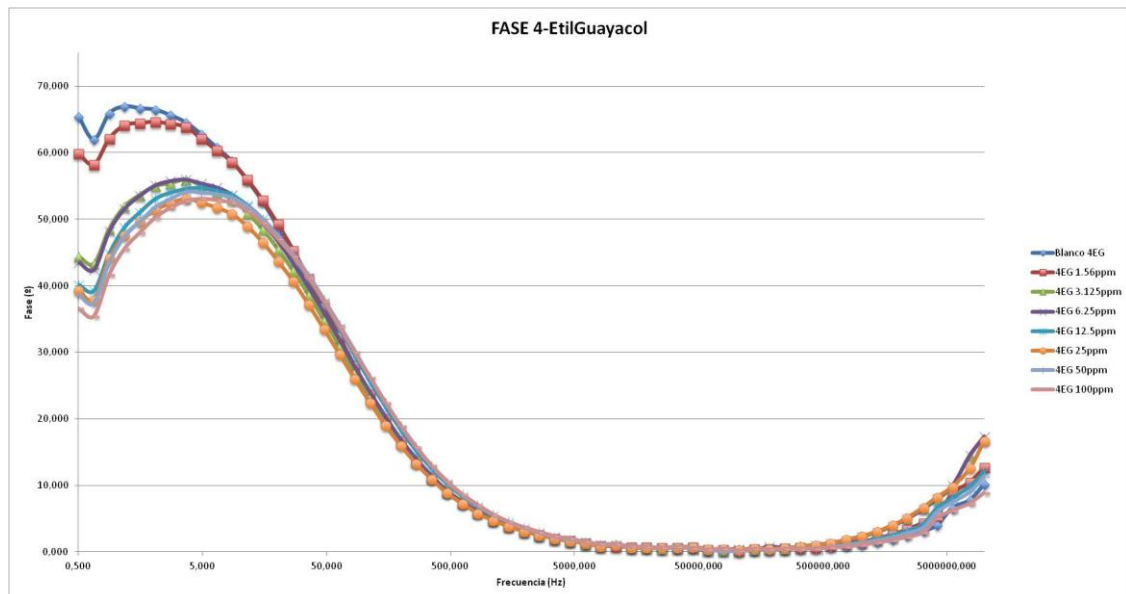
### **4.2. Estudio en vino**

A diferencia de las anteriores, el vino presenta suficiente conductividad (2,35  $\mu$ S/cm) para poder trabajar con el equipo de impedancia, por lo que en estas condiciones no era necesaria la adición de sales y se realizaron las mediciones de forma directa. Con la finalidad de determinar el rango de trabajo, se hizo un primer barrido desde 4 hasta 1000 ppm de los 4 fenoles (4-EG, 4-EF, 4-VG y 4-VF) realizando un calibrado diferente para cada compuesto. Con esto se vio una saturación del sensor alrededor de 100 ppm, por lo que a partir de esta cantidad no podían distinguirse concentraciones. Así pues, el estudio se centró para estos compuestos en un rango de concentraciones que va de 4 a 100 ppm.

Las **figuras 4 y 5** nos muestran el espectro correspondiente al vino con 4-etilguayacol a distintas concentraciones y frecuencias. Se observó una separación por concentraciones del compuesto en las frecuencias bajas de la fase (**figura 5**) mejor que en el módulo (**figura 4**). Se puede apreciar en la **figura 5** que los compuestos empiezan a solaparse debido a la saturación del sensor antes mencionada en un punto cercano a las 25 ppm.



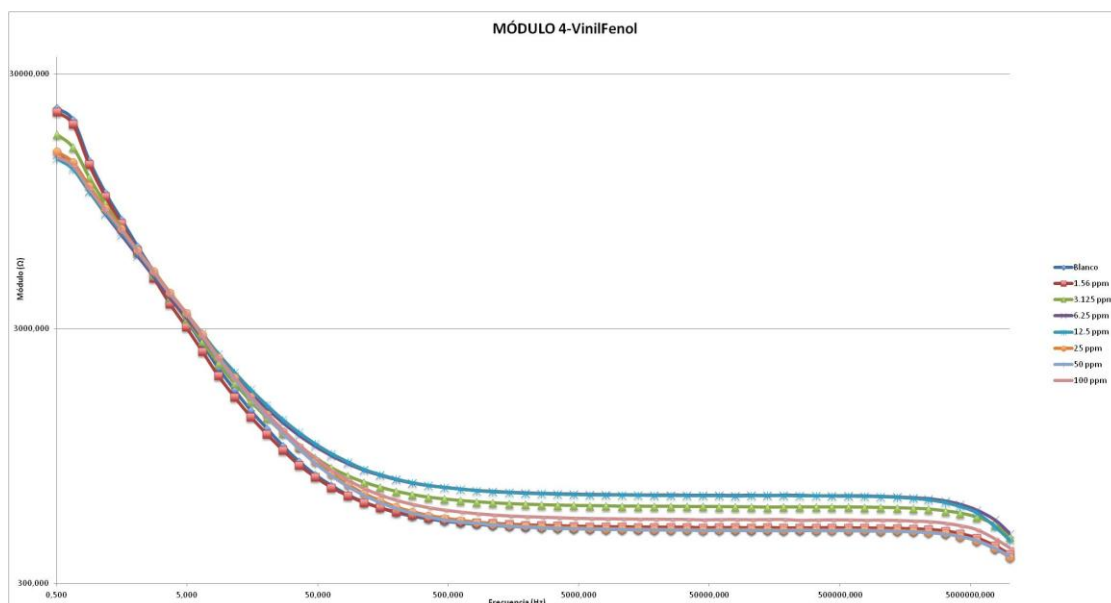
**Figura 4.** Módulo de 4-etilguayacol en vino.



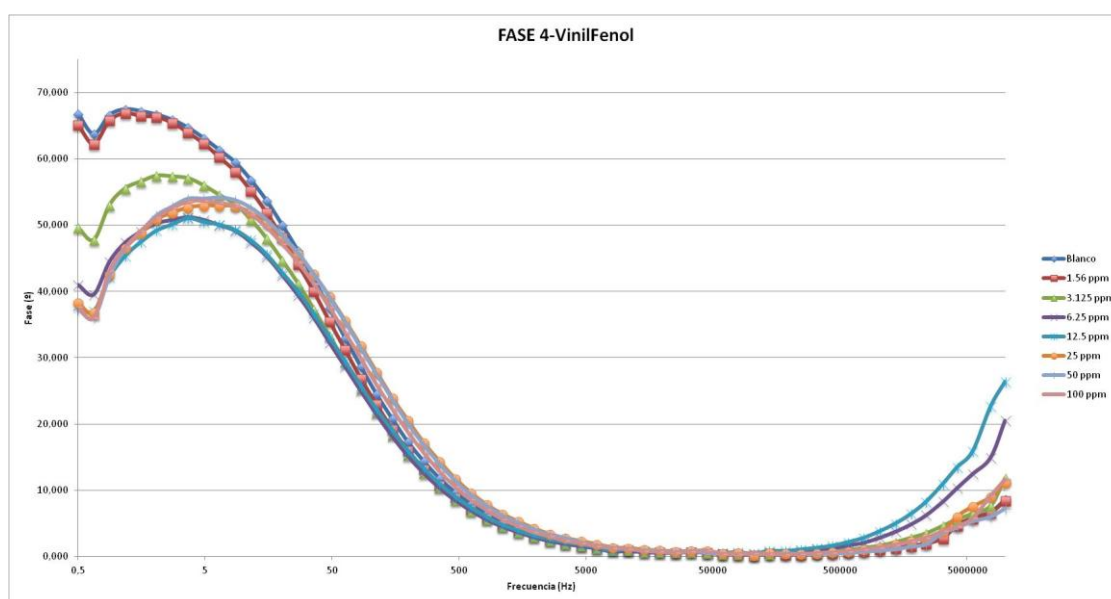
**Figura 5.** Fase de 4-etilguayacol en vino.

En el caso del 4-vinilfenol, al igual que en el de 4-etilguayacol, la separación es visiblemente más evidente en las frecuencias más bajas de la fase (**figura 7**) donde

además se pudo ver que el límite de detección es más cercano al blanco, y el de saturación más bajo también (aproximadamente 6 ppm) y un solapamiento en el módulo (**figura 6**).

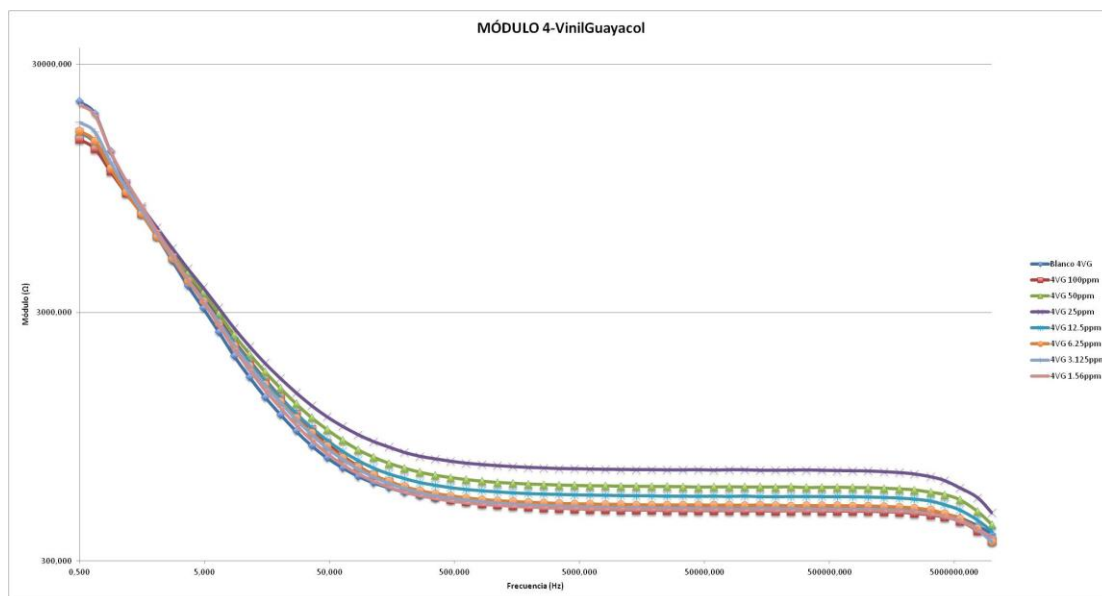


**Figura 6.** Módulo de 4-vinilfenol en vino.

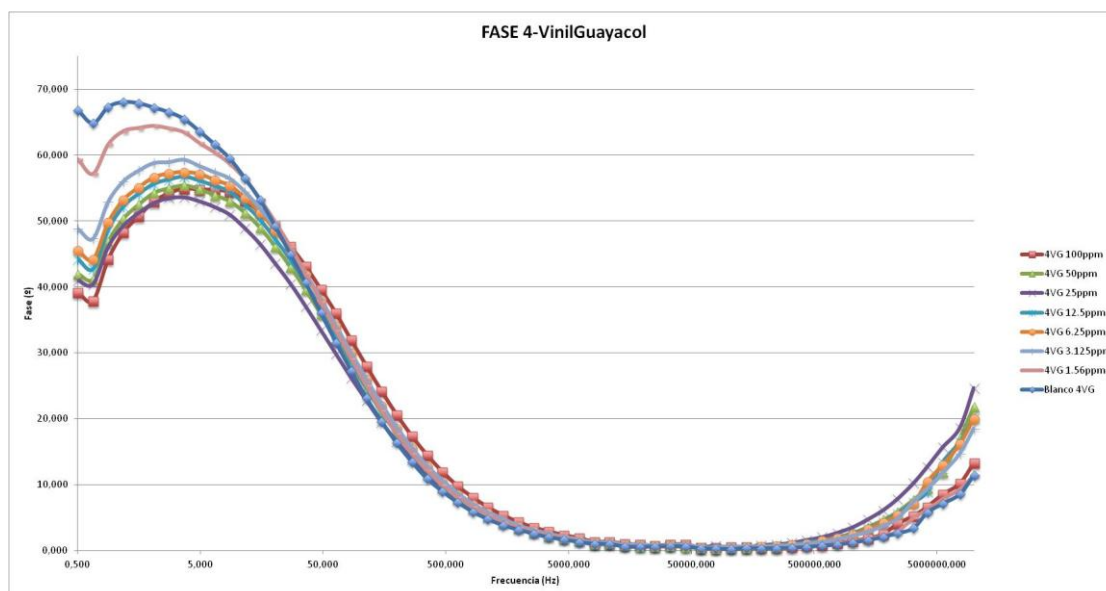


**Figura 7.** Fase de 4-vinilfenol en vino.

En el caso del 4-vinilguayacol parece que se repite el mismo proceso que con los demás compuestos: no hay una respuesta definida en el módulo (**figura 8**) pero sí en las frecuencias bajas de la fase (**figura 9**), donde se evidenció una separación del blanco con respecto a las bajas concentraciones del compuesto.



**Figura 8.** Módulo de 4-vinilguayacol en vino.



**Figura 9.** Fase de 4-vinilguayacol en vino.

En el módulo de 4-etilfenol (**figura 10**) se observó un solapamiento general excepto en bajas frecuencias (de 0,5 a 50 Hz) donde se apreció una diferencia entre el vino en blanco y el vino con presencia del fenol. Lo mismo sucede en el caso de la fase (**figura 11**), a estas mismas frecuencias hay una importante separación entre el blanco y una cantidad de compuesto de 1,56 ppm. Aunque a concentraciones más elevadas se produzca un solapamiento, esto no nos influye ya que el interés es detectar las mínimas concentraciones posibles de etilfenoles con respecto al vino en blanco. Visto esto podría asumirse que es posible disminuir un poco más esa cantidad mínima hasta un valor más bajo para el límite de detección.

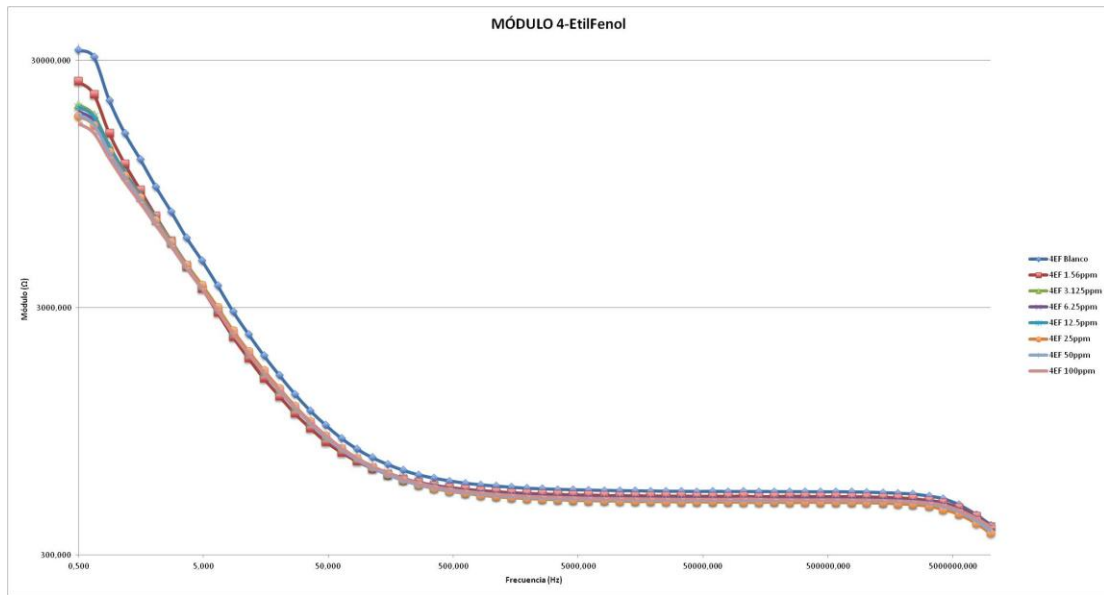


Figura 10. Módulo de 4-etilfenol en vino.

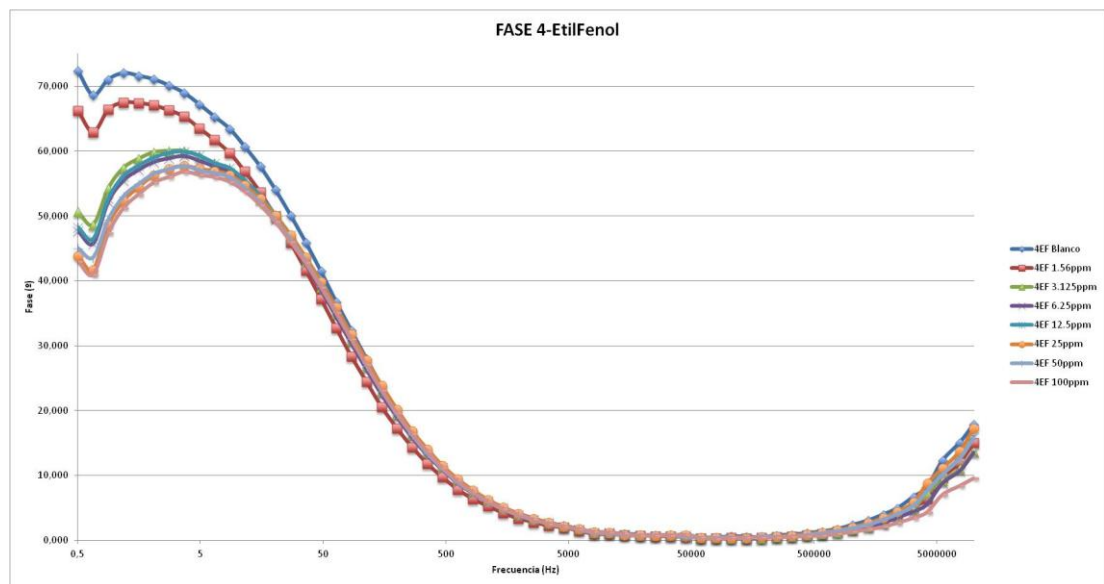
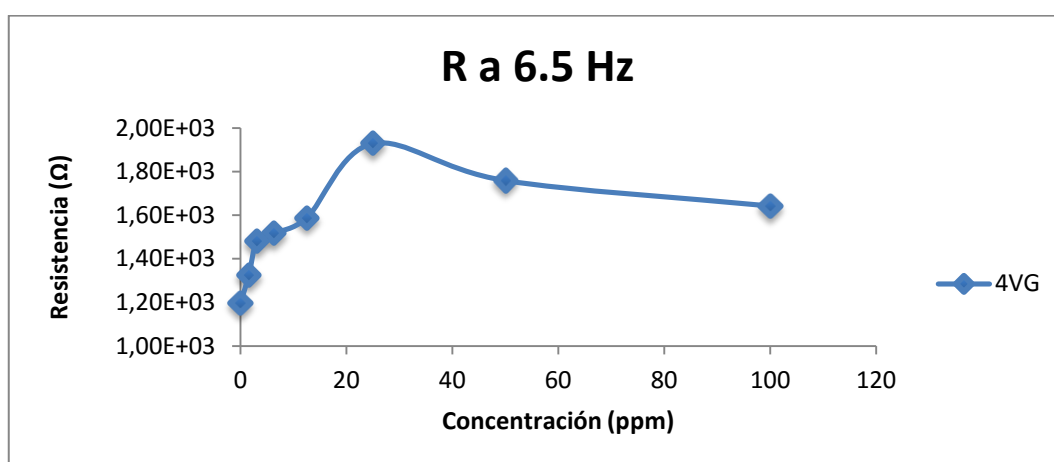


Figura 11. Fase de 4-etilfenol en vino.

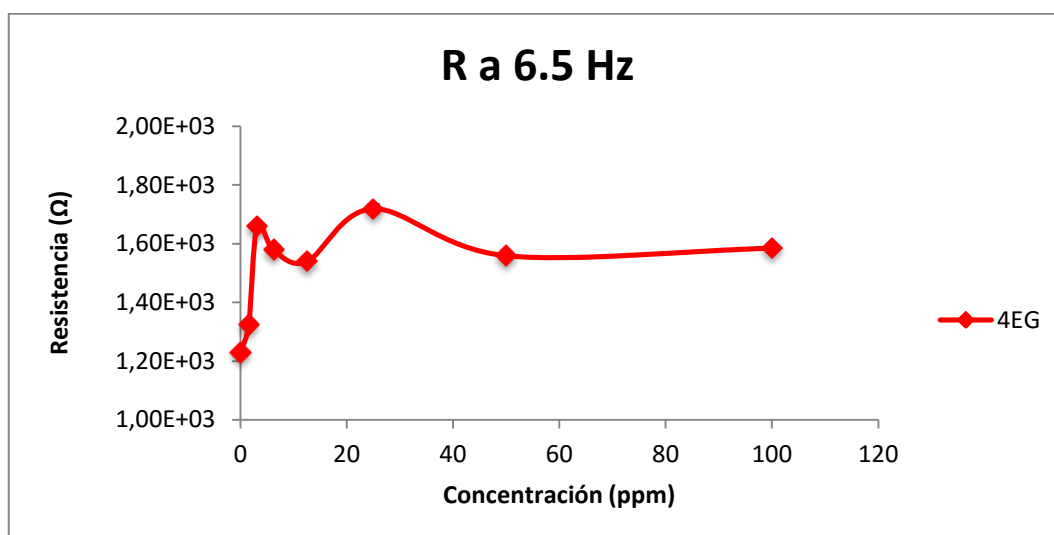
### 4.3. Estudio de la impedancia

Una vez visto este comportamiento primario de los datos medidos en módulo y fase, se pasó a ver su evolución después de realizar la transformación de los datos obtenidos. Después de ver que hay una mayor visibilidad de separación de concentraciones en bajas frecuencias en ambas partes, se eligió como frecuencia fija 6,5 Hz para observar en profundidad los datos de las componentes reales ( $R$ ) e imaginarias ( $X$ ), según su concentración en vino en cada uno de los compuestos estudiados.

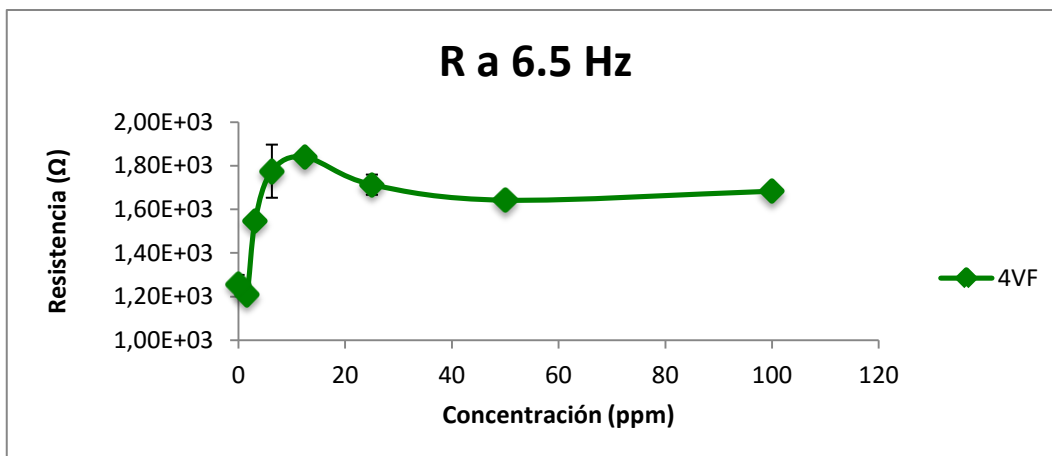
En el caso de la componente real ( $R$ ) del 4-vinilguayacol puede observarse en la **figura 12**, un aumento hasta 25 ppm. Es en este compuesto en el que se ve una mejor discriminación, ya que en los demás es más baja. Siguiendo con las resistencias ( $R$ ), el 4-vinilfenol aumenta hasta 12,5 ppm (**figura 14**), a pesar de un solapamiento entre blanco y 1,56 ppm. En el caso del 4-etilguayacol sólo puede verse un aumento de  $R$  hasta 3,25 ppm (**figura 13**), y en el caso del 4-etilfenol es difícil discriminar cambios de concentración por el solapamiento que se produce a bajas concentraciones (**figura 15**).



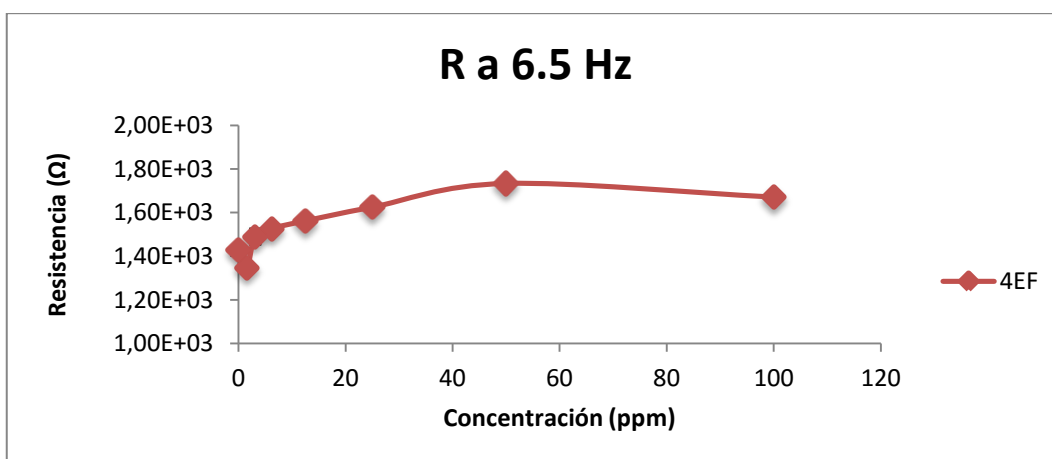
**Figura 12.** Medidas a 6.5 Hz de la componente real ( $R$ ) en función de la concentración del 4-vinilguayacol.



**Figura 13.** Medidas a 6.5 Hz de la componente real ( $R$ ) en función de la concentración del 4-etilguayacol.



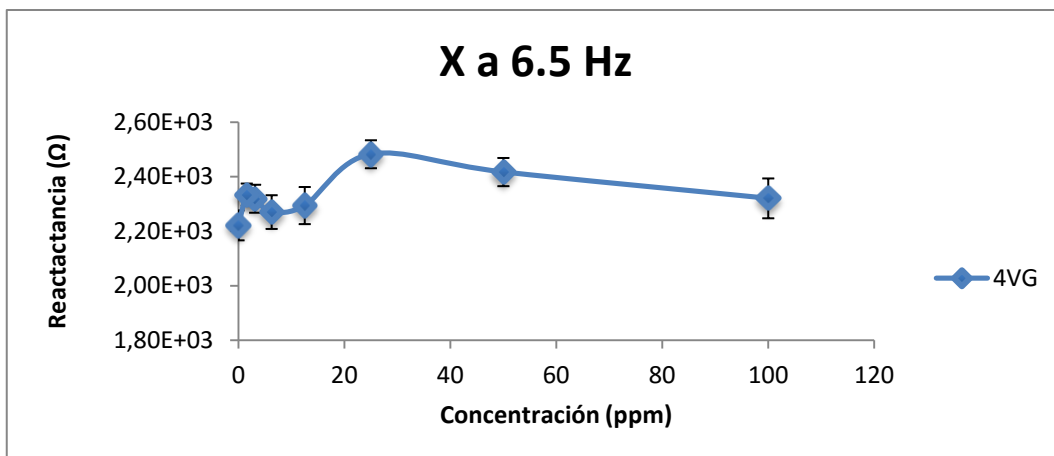
**Figura 14.** Medidas a 6.5 Hz de la componente real ( $R$ ) en función de la concentración del 4-vinilfenol.



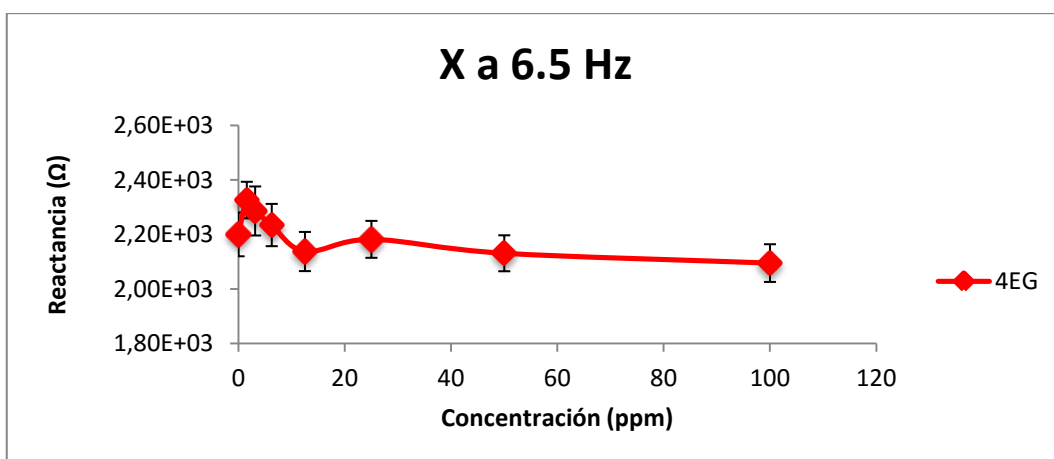
**Figura 15.** Medidas a 6.5 Hz de la componente real ( $R$ ) en función de la concentración del 4-etilfenol.

En el caso de la componente imaginaria ( $X$ ) los resultados son menos visibles en todos los compuestos (**figuras 17-19**) excepto en el caso del 4-vinilguayacol (**figura 16**). A pesar de que puede observarse mejor en la resistencia, también podemos ver aquí una separación hasta 25 ppm, aunque más sutil.

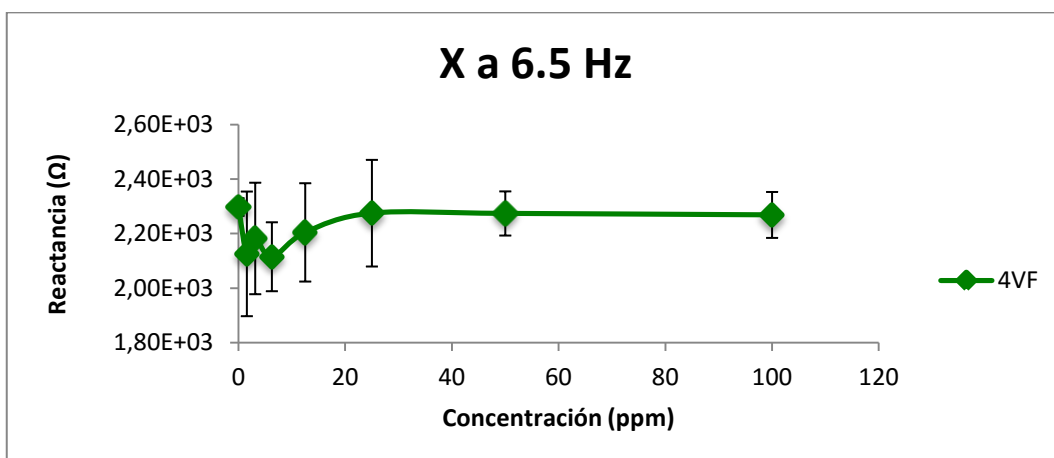




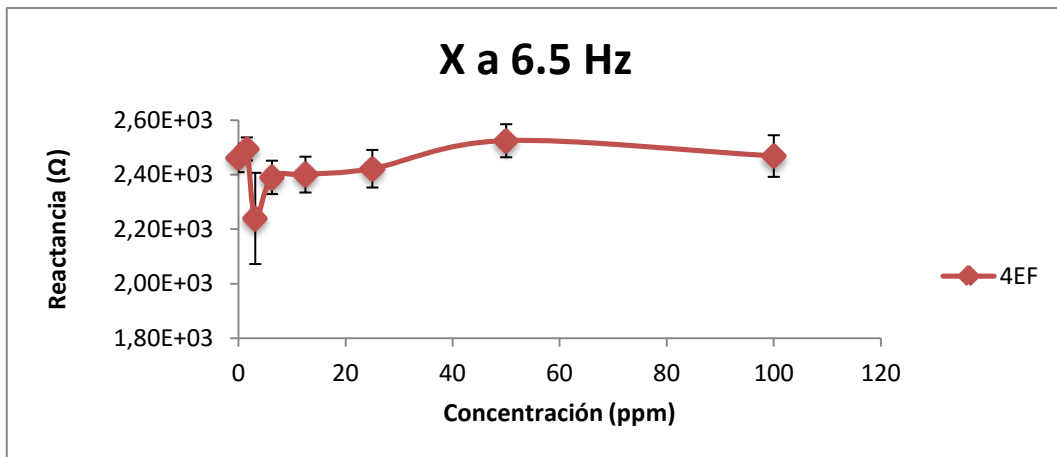
**Figura 16.** Medidas a 6 Hz de la componente imaginaria (X) en función de la concentración del 4-vinilguayacol.



**Figura 17.** Medidas a 6 Hz de la componente imaginaria (X) en función de la concentración del 4-etilguayacol.



**Figura 18.** Medidas a 6 Hz de la componente imaginaria (X) en función de la concentración del 4-vinilfenol.



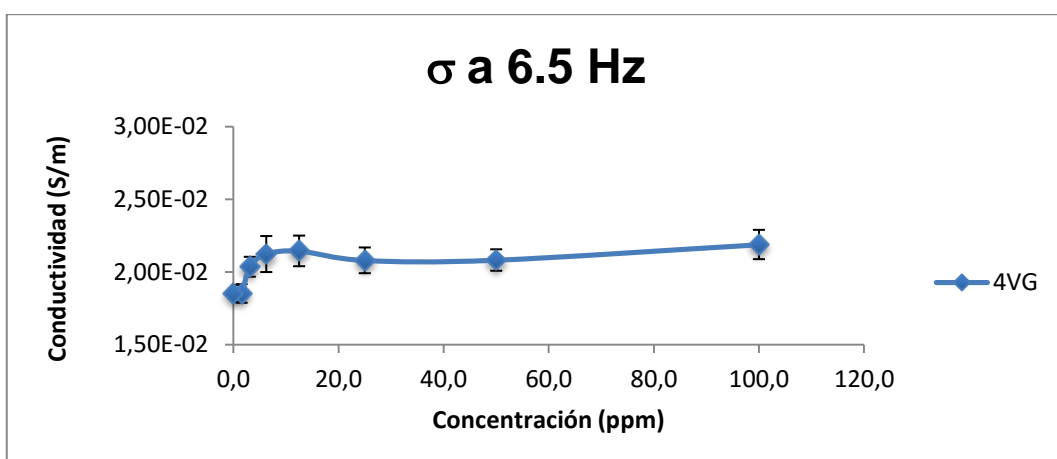
**Figura 19.** Medidas a 6 Hz de la componente imaginaria ( $X$ ) en función de la concentración del 4-etilfenol.

Estos resultados muestran que, al menos en la componente real ( $R$ ) del 4-vinilguayacol, es posible detectar bien los cambios de concentración al menos hasta 25 ppm, y de forma más leve también en la componente imaginaria ( $X$ ).

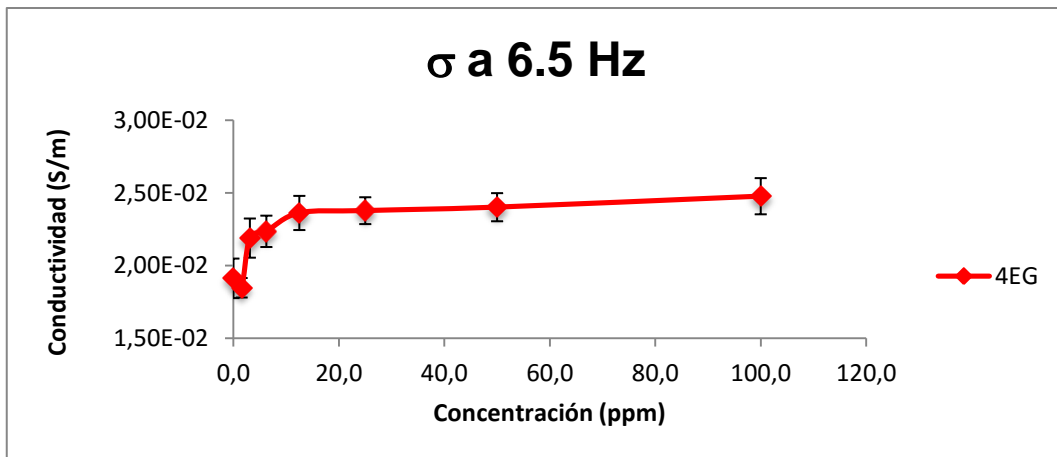
#### 4.4. Estudio de la conductividad

Se realizó además una limpieza de los datos obtenidos hasta el momento para eliminar el ruido, centrándonos la conductividad eléctrica ( $\sigma$ ) en la misma frecuencia, a 6 hercios. Esta se calcula a partir de los valores de la frecuencia ( $\omega$ ) y la constante dieléctrica ( $\epsilon''$ ), y se mide en siemens por metro (S/m):

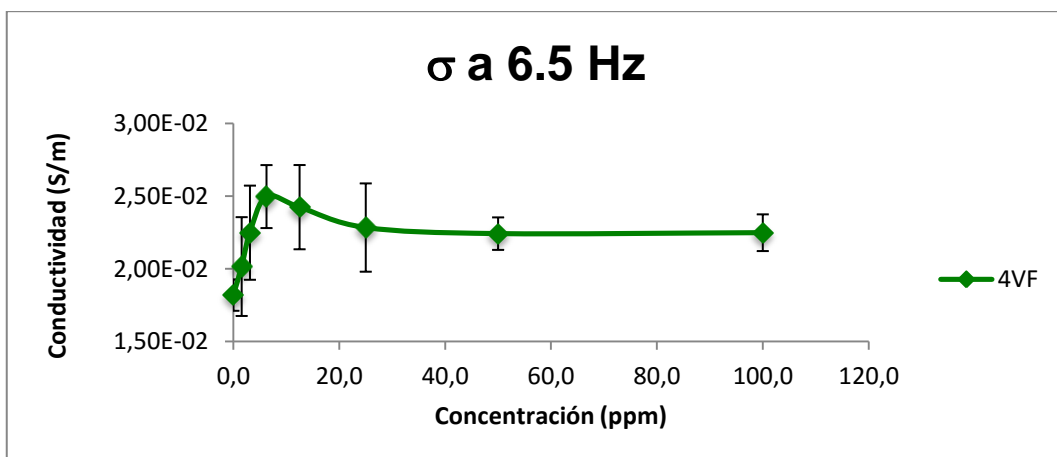
$$\sigma = \epsilon'' \cdot 2\pi \cdot w$$



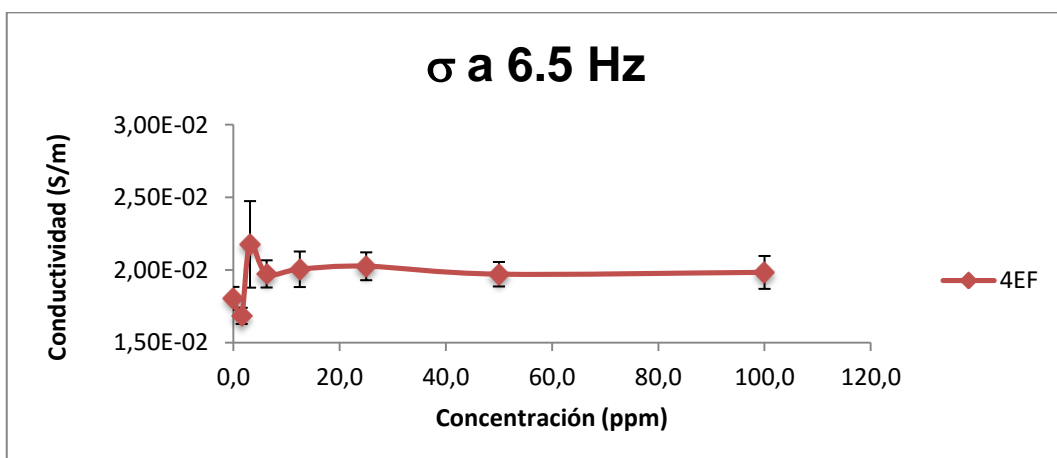
**Figura 20.** Medidas a 6 Hz de la conductividad en función de la concentración del 4-vinilguayacol.



**Figura 21.** Medidas a 6 Hz de la conductividad en función de la concentración del 4-etilguayacol.



**Figura 22.** Medidas a 6 Hz de la conductividad en función de la concentración del 4-vinilfenol.



**Figura 23.** Medidas a 6 Hz de la conductividad en función de la concentración del 4-etilfenol.

Fijándonos en la conductividad del 4-vinilguayacol (**figura 20**) podemos ver unos resultados prometedores hasta 12,5 ppm, y en el caso del 4-vinilfenol (**figura 22**) y el 4-etilguayacol (**figura 21**) hasta 6,25 ppm, aunque en este último se produce un ligero solapamiento entre el blanco y 1,56 ppm. En el caso del 4-etilfenol no se ven resultados concluyentes (**figura 23**).

## 5. CONCLUSIONES

En esta primera fase de estudio de las propiedades eléctricas de metabolitos de *Brettanomyces/Dekkera*, se presentan resultados que permiten una determinación de sus concentraciones de forma gradual. En concreto, el 4-vinilguayacol es el compuesto que presenta unos resultados más esperanzadores. Siendo como es, un precursor necesario para la síntesis de etilfenoles (4-etilguayacol y 4-etilfenol) por parte de *Brettanomyces*, es un buen punto de partida.

Es posible detectar la presencia de los metabolitos producidos por *Brettanomyces* en concentraciones muy bajas (ppm). Si bien el límite de detección hasta el momento de etilfenoles en espacios de cabeza es más bajo (ppb), debemos tener en cuenta que con este método se detecta directamente en una disolución, por lo que puede considerarse una vía alternativa aceptable. Esto puede mejorar con ayuda de una tecnología ya existente, conocida como LabOnChip, la cual podría bajar el límite de detección, antes mencionado, del sensor.

La espectroscopía de impedancia es una forma novedosa de abordar la detección de sustancias particulares en una matriz. Es barata, sencilla y fácil de implementar en aparatos de medida. El conjunto de sus características, puede ser de gran interés para la industria del vino. En especial para la detección temprana de *Brettanomyces/Dekkera*, y paliar en la medida de lo posible, las pérdidas debidas a su proliferación. Si bien es cierto, hacen falta estudios complementarios antes de valorar la idoneidad del método.

## 6. AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me han ayudado a hacer posible el desarrollo de este proyecto, especialmente al director del mismo, Salvador Terrades, y a José Vicente Ros (IIAD, UPV) por haberme dado la oportunidad de trabajar con él. También quisiera agradecer a la Cooperativa Vinícola La Viña (La Font de la Figuera, Valencia) así como al departamento de Ingeniería Electrónica (ETSID, UPV) el material cedido para hacer los ensayos, sin el cual no hubiera sido posible realizar este trabajo.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Uscanga, M. G., Délia, M. L., & Strehaiano, P. (2003). *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61(2), 157–62.
- Cetó, X., Gutiérrez, J. M., Gutiérrez, M., Céspedes, F., Capdevila, J., Mínguez, S., Jiménez-Jorquera, C. & del Valle, M. (2012). Determination of total polyphenol index in wines employing a voltammetric electronic tongue. *Analytica Chimica Acta*, 732(1), 172-179.
- Chattonet, P. (2004). La contaminación de los vinos por *Brettanomyces* durante vinificación y crianza: Incidencia, Detección y Medios de lucha. In *Anisoles y Brettanomyces: causas, efectos y mecanismos de control*. (pp. 87–96). Madrid: Fundación para la Cultura del Vino.
- Chattonet, P., Dubordieu, D., & Boidron, J. N. (1993). Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur la teneur en acide acétique et en éthyphénols. *Journal International Des Sciences de La Vigne et Du Vin*, 17(v. 26-27), 277–298.
- Chattonet, P., Dubourdiou, D., & Boidron, J. N. (1995). The Influence of *Brettanomyces/Dekkera* sp. Yeasts and Lactic Acid Bacteria on the Ethylphenol Content of Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(4), 463–468.
- Chattonet, P., Viala, C., & Dubourdiou, D. (1997). Influence of Polyphenolic Components of Red Wines on the Microbial Synthesis of Volatile Phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(4), 443–448.
- Costantini, a., Cravero, M. C., Cersosimo, M., Pazo-Alvarez, M. C., Prete, V. Del, Bonello, F., & Garcia-Moruno, E. (2007). Deteccion de *Brettanomyces* y correlacion con las repercusiones sensoriales. *International Symposium Microbiology and Food Safety of Wine "Microsafetywine"*. Villafranca Del Penedés, Spain, 20-21 Novermber 2007., 1–11.
- González, U., & Navascués López-Cordón, E. (2006). Contaminación por *Brettanomyces* en vinos españoles: Incidencias y causas mas frecuentes. In Gobierno de la Rioja & Consejería de Agricultura Ganadería y Desarrollo Rural (Eds.), *V Foro Internacional del vino*. Logroño: Gobierno de la Rioja.

- Navascués López-Cordón, E. (2005). *Brettanomyces/Dekkera*, control y detección en bodega. In *Ponencias Del V Curso De Verano Viticultura Y Enología En La C.O. Ribera Del Duero* (Vol. 1, pp. 21–28). Burgos: Consejo Regulador de la Denominación de Origen Ribera del Duero.
- Silva, P., Cardoso, H., & Gerós, H. (2004). Studies on the wine spoilage capacity of *Brettanomyces/Dekkera* spp. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55(1), 65–72.
- Steinke, R. D., & Paulson, M. C. (1964). The Production of Steam-Volatile Phenols during the Cooking of Alcoholic Fermentation of Grain. *Agricultural and Food Chemistry*, 12(4), 381–387.
- Suárez-Lepe, J. A., Benito, S., Palomero, F., Morata, A., Calderón, F., & Estrella, I. (2008). Detección de *Dekkera /Brettanomyces* en vinos tintos. In OIV (Ed.), *XXXIth World Congress of Vine and Wine* (pp. 1–8). Verona.