

**Efecto de raleo de racimo y el sitio del viñedo
en las características de vinos espumantes
producidos a partir de la variedad italiana
Ribolla Gialla.**

Erik Fernando Estrada Zepeda

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Honduras
Noviembre, 2018

ZAMORANO
CARRERA DE AGROINDUSTRIA ALIMENTARIA

**Efecto de raleo de racimo y el sitio del viñedo
en las características de vinos espumantes
producidos a partir de la variedad italiana
Ribolla Gialla.**

Proyecto especial de graduación presentado como requisito parcial para optar
al título de Ingeniero en Agroindustria Alimentaria en el
Grado Académico de Licenciatura

Presentado por

Erik Fernando Estrada Zepeda

Zamorano, Honduras
Noviembre, 2018

Efecto de raleo de racimo y el sitio del viñedo en las características de vinos espumantes producidos a partir de la variedad italiana Ribolla Gialla.

Erik Fernando Estrada Zepeda

Resumen. El raleo de racimo es una práctica implementada en los viñedos, la cual consiste en su remoción con el fin de obtener mejor calidad de vinos. El objetivo de la investigación fue evaluar el raleo de racimo (20%) en dos regiones del norte de Italia (Corno di Rosazzo y Casarsa della Delizia) durante la elaboración de vinos de la variedad Ribolla Gialla. Un Diseño Completamente al Azar fue implementado para evaluar vinos base y espumante. Análisis químicos (pH, acidez, grado alcohólico y azúcares residuales) fueron realizados. Adicionalmente, una extracción de fase sólida de volátiles ligados y libres (terpenos y norisoprenoides) fue llevada a cabo para la identificación y cuantificación usando cromatografía de gases (CGEM). Los datos obtenidos fueron analizados con un ANOVA bidireccional. Se realizó una separación de medias ajustadas a través del método LSmeans. No se encontraron diferencias significativas para análisis químicos en vinos base ni para compuestos aromáticos en vinos espumantes. Se encontró diferencia significativa en acidez titulable y azúcar residual para vinos espumantes y en algunos compuestos aromáticos para vino base ($P < 0.05$). La interacción entre sitio y tratamiento no fue significativa en la fermentación secundaria. Evaluaciones adicionales son recomendadas para continuar con futuros estudios como ser color, turbidez, concentración de gases (CO_2) y análisis sensorial. Además, diversos protocolos de raleo de racimo y regiones deben de ser evaluadas en estudios futuros.

Palabras clave: Aroma, norisoprenoides, terpenos, vino, viticultura.

Abstract. Cluster thinning is a practice implemented in vineyards, which consists on the removal of floral or grape cluster in order to have better wine quality. The objective of this investigation was to evaluate cluster thinning (20%) in two regions of northern Italy (Corno di Rosazzo and Casarsa Della Delizia) during the elaboration of Ribolla Gialla wines. A Completely Randomized Design was implemented to evaluate base and sparkling wines. Chemical analyses (pH, titratable acidity, alcoholic strength and residual sugars) were performed. Additionally, solid phase extraction of free and bound volatile compounds (terpenes and norisoprenoids) was conducted prior to identification and quantification using GCMS. Data obtained was analyzed with a two way ANOVA. A separation of adjusted means with the LSmeans method was performed. No differences were observed in all analyses conducted in base wine regardless of cluster thinning or site or in volatile compounds for sparkling wine. Statistical difference was found in titratable acidity and residual sugars for sparkling wine, as well as some volatile compounds in base wine ($P < 0.05$). Interaction between site and treatment was not significant in this secondary fermentation. Additional evaluations are recommended to continue further studies such as color, turbidity, gas (CO_2) concentration and sensory analyses. Furthermore, different cluster thinning protocols and regions could be evaluated in future studies.

Key Words: Aroma, norisoprenoids, terpenes, viticulture, wine.

CONTENIDO

Portadilla	i
Página de firmas.....	ii
Resumen.....	iii
Contenido.....	iv
Índice de Cuadros y Anexos	v
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	3
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	7
4. CONCLUSIONES.....	13
5. RECOMENDACIONES.....	14
6. LITERATURA CITADA.....	15
7. ANEXOS	18

INDICE DE CUADROS Y ANEXOS

Cuadros	Página
1. Identificación de muestras	3
2. Efecto del sitio de viñedo y el raleo de racimo en análisis químicos en vino base .	8
3. Efecto del sitio de viñedo y el raleo de racimo en análisis químicos en vino espumante	9
4. Efecto del sitio de viñedo y el raleo de raacimo en compuestos aromáticos volátiles en vino base.....	11
5. Efecto del sitio de viñedo y el raleo de racimo en compuestos aromáticos volátiles en vino espumante	12

Anexos	Página
1. Extracción de fase solida para compuestos aromáticos.....	18
2. Tiempo de retención para compuestos aromáticos volatiles comunmente encontrados en vinos.	19

1. INTRODUCCIÓN

Ribolla Gialla es una variedad de uva (*Vitis vinifera* L.) que crece en la región de Friuli Venezia Giulia, del noreste de Italia y en las regiones cercanas de Eslovenia y Croacia se conoce comúnmente como Rebula. En la región italiana, el área de cultivo de esta variedad es bastante limitada, centrándose en dos áreas principales (Denominación de Origen): Friuli-Colli-Orientali-Ramandolo y Collio. Ribolla Gialla tiene la característica de tener una acidez naturalmente alta, por lo que es ideal para la producción de vino espumante. Ribolla Gialla ha sido considerado como uno de los mejores vinos italianos desde la época medieval, donde en un documento legal, fue descrito como el vino que estaba presente en las mesas de la nobleza de Venecia. Esta variedad se cultiva en viñedos en las laderas, mostrando aromas delicados, pero también en la llanura aluvial (D'Agata 2014).

El aroma es uno de los principales aspectos evaluados en el vino. Se puede alterar en diferentes partes del proceso, desde la forma en que se cultivó la uva hasta los diferentes métodos enológicos implementados a lo largo del proceso (Hernandez *et al.* 2014). Es bien sabido que las prácticas agronómicas implementadas en el viñedo tienen un efecto sobre la composición del vino, y entre ellas también el raleo del racimo. El raleo consiste en eliminar racimos en variedades de vino para obtener una mejor calidad de uva. El raleo del racimo aplicado en etapas tempranas (alrededor del envero) promueve la maduración de la uva, aumentando la cantidad de sólidos solubles totales (Wang *et al.* 2018). Los compuestos que tienen un efecto directo sobre el aroma se producen en diferentes segmentos del proceso y su concentración depende de las vías biosintéticas (Hernández *et al.* 2014). Además, estos compuestos volátiles son responsables de dar características aromáticas específicas al vino y también contribuyen a la percepción del sabor del vino (Black *et al.* 2015).

La composición volátil de los vinos espumantes es un aspecto de interés ya que se relaciona con las características sensoriales del vino que se refieren a la aceptabilidad del consumidor (Yuan y Qian 2016). El vino espumante tiene la característica principal de tener dióxido de carbono (CO₂) que se produce durante una fermentación secundaria que se puede obtener por los métodos *Charmat* y *Champenoise*. Dependiendo del método elegido, las características sensoriales pueden variar. La primera fermentación da como resultado el vino base que tiene la característica de ser un vino ácido. Luego, ocurre la segunda fermentación. En el método *Champenoise*, la segunda fermentación se realiza en botellas selladas, mientras que en el método *Charmat*, la fermentación se realiza en grandes recipientes de acero inoxidable, conocidos como autoclaves (Caliari *et al.* 2015).

El espectro aromático del vino es amplio, algunos de los componentes que tienen una gran importancia debido a su efecto final sobre el vino son los terpenos y norisoprenoides (Zoecklein *et al.* 1999). Cabe recalcar que la variedad Ribolla Gialla es una variedad no

aromática por lo que la concentración de terpenos libres es baja. De acuerdo a Black *et al.* (2015) los terpenos son una clase importante de productos naturales con una gama de funciones en las plantas. Estos son importantes metabolitos secundarios de plantas y son extremadamente diversos químicamente, con un gran número de compuestos individuales conocidos, estimados en más de 40,000 compuestos (Lukić *et al.* 2017). Los norisoprenoides en la uva implican una descomposición de los carotenoides producida por las enzimas (Dziadas y Jélen 2010). Los cambios en la concentración de estos compuestos podrían ayudar a encontrar técnicas y estrategias para mejorar el potencial de aroma de las uvas (Yuan y Qian 2016).

Los terpenos se pueden encontrar en las uvas como formas libres o unidas (glucósidos). Los terpenos glicosídicamente unidos son más abundantes en las uvas blancas que terpenos libres a diferencia de otras variedades de uva (Zoecklein *et al.* 1999). Los terpenos unidos tienen influencia en el sabor del vino ya que se liberan y permanece la forma aglicón. Durante la fermentación, ocurren varios cambios químicos. Los estudios han demostrado que la fermentación genera una disminución en los glucósidos, y un aumento en la cantidad de agliconas impactando significativamente en el sabor (Dziadas y Jeleń 2010). Cuando se produce la separación de glucósidos, los terpenos se vuelven volátiles libres, lo que influye en el aroma del vino (Zoecklein *et al.* 1999).

Este estudio se fundamentó en el efecto de raleo de racimo en la generación de compuestos aromáticos en vino de la variedad Ribolla Gialla. Los objetivos de este estudio incluyen:

- Evaluar el proceso fermentativo de vino base y espumante.
- Contrastar las características químicas de vinos de diferentes regiones.
- Cuantificar los compuestos volátiles aromáticos producidos después de las fermentaciones (primaria y secundaria).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del estudio.

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de bebidas alcohólicas del Departamento de Ciencias Agrícolas, Alimentarias y Ambientales de la Universidad de Udine, localizada en Udine, Italia.

Preparación de muestras.

La investigación se realizó con muestras obtenidas de dos viñedos diferentes ubicados en la región noroeste de Italia, Casarsa della Delizia (tierras bajas) y Corno di Rosazzo (cerros). Las muestras se identificaron en función del porcentaje de racimo eliminado de la planta, utilizando 0 y 20% de eliminación de racimo como tratamientos (Cuadro 1); teniendo tres repeticiones para cada tratamiento. El raleo de racimo se efectuó en etapas tempranas del desarrollo del fruto (cerca del envero).

Cuadro 1 Identificación de muestras

Muestra	Región	Descripción
UNT	Casarsa della Delizia	Control
DIR	Casarsa della Delizia	Raleo de racimo en 20%
UNT	Corno di Rosazzo	Control
DIR	Corno di Rosazzo	Raleo de racimo en 20%

Para la elaboración de vino base, se realizó una cosecha en ambas regiones, comenzando en Corno di Rosazzo el 17 de agosto, 2017 y en Casarsa della Delizia el 04 de septiembre, 2017. Se realizó análisis de grados Brix y acidez titulable a las uvas al momento de hacer la cosecha.

La metodología utilizada en la investigación para la preparación de la fermentación secundaria y el análisis de los compuestos aromáticos volátiles fue la misma utilizada por Comuzzo *et al.* (2018) en su estudio del efecto de pulsos eléctricos en dichos compuestos.

Preparación para fermentación secundaria.

Para comenzar con la adición de azúcar y levadura, el vino base se filtró para eliminar los posos del vino con microfiltración, utilizando una membrana con poros de 5 μm . Una vez filtrado, se añadió azúcar en una concentración de 18 g/L. El vino se dejó en el laboratorio durante aproximadamente 24 horas para aumentar la temperatura a 20 °C para la inoculación con levadura.

La inoculación se efectuó hidratando la levadura con agua a 40 °C a una concentración de 0.5 g/L. El vino base se transfirió a seis autoclaves de acero inoxidable con capacidad de 7 L para la fermentación con método Charmat. El tiempo transcurrido para la fermentación secundaria fue de dos meses debido a las condiciones de la bodega de almacenamiento, principalmente relacionado con temperaturas.

Filtración del vino.

Para comenzar los análisis del vino, se eliminó el dióxido de carbono de las muestras. Para eliminar el dióxido de carbono del vino, se usó una membrana con un grado de 90 g/m². La membrana se colocó en un embudo sobre un matraz Erlenmeyer y las muestras se filtraron.

Medición de pH.

La calibración del medidor de pH se realizó usando dos soluciones tampón con pH de 7 y 4. Una vez calibrado el instrumento, el electrodo de pH se enjuagó con agua destilada y se sumergió en la muestra hasta que el número en el medidor de pH permaneció constante. Antes de analizar una nueva muestra, el electrodo debió enjuagarse con agua y secarse con una toalla de papel.

Acidez titulable.

Se preparó hidróxido de sodio usando una ampolla de solución concentrada Fialavol. Para alcanzar la concentración de 0.1 M, la ampolla se disolvió en agua MilliQ hasta alcanzar un volumen de un litro. Se colocaron 15 ml de muestra filtrada (vino) en un vaso de precipitado. Se agregaron 5 gotas de azul de bromotimol. Se llenó una bureta (25 ml) con hidróxido de sodio 0.1 M para realizar la titulación. El hidróxido de sodio se añadió gradualmente a la muestra hasta alcanzar un color verde azulado oscuro. El resultado obtenido equivalente a la cantidad de hidróxido de sodio añadido, fue expresado en gramos por litro de ácido tartárico.

Medición de alcohol.

Para medir la cantidad de alcohol generado en el vino base y el vino espumante, se necesitaron 30 ml de cada muestra. El análisis se realizó utilizando Anton Paar AlcoLyzer. Una vez que el instrumento terminó de analizar, los resultados se registraron en la base de datos, expresados en porcentaje.

Medición de Azúcares residuales.

Para cuantificar la concentración de azúcares residuales se usaron dos reactivos. Solución Fehling A (CuSO₄, 69.278 g/L en agua MilliQ) y solución Fehling B (tartrato potásico sódico 346 g/L y NaOH 100 g/L en agua MilliQ). Para realizar el análisis, se preparó una mezcla de solución A, solución B y agua MilliQ en una proporción de 1:1:6 respectivamente en un vaso de precipitado. Se colocaron 5 ml de mezcla en tubos de ensayo de 10 ml y se añadieron 200 µl de muestra de vino. Los tubos con las muestras se colocaron en el horno durante una hora a 100 °C. Después de enfriar, se midió la absorbancia con una longitud de onda de 694 nm con el espectrofotómetro usando cubetas UV de longitud de trayectoria óptica de 10 mm. Los resultados se expresaron en g/L, en relación con una línea de calibración preparada con glucosa (Ecuación 1).

$$\frac{g}{L} \text{ de glucosa} = -34.14 * \text{Absorbancia} + 28.24 \quad [1]$$

La fórmula para calcular azúcares residuales se obtuvo midiendo diferentes soluciones con una concentración conocida de azúcar (1, 5, 10, 15 y 20 g/L) y haciendo un gráfico de Excel para encontrar la ecuación lineal y R² utilizando la absorbancia obtenida en el espectrofotómetro.

Extracción de compuestos volátiles.

Para lograr el análisis de los compuestos aromáticos, se realizó la extracción de compuestos aromáticos volátiles libres y glicosídicamente unidos. La extracción se realizó utilizando el método SPE (Solid Phase Extraction). Se añadieron 25 µl de 1-heptanol (493 µl /ml, en etanol al 96% v/v) como estándar interno a 100 ml de muestra de vino. La columna SPE Isolute C18 se acondicionó con 25 ml de metanol y luego con 25 ml de agua MilliQ a un flujo de 2 - 3 ml/min.

Cada muestra se vertió y se filtró desde la columna con un flujo de 2-3 ml/min, seguido de un enjuague de columna con 150 ml de agua MilliQ. Una vez enjuagados, se eluyeron los terpenos y norisoprenoides libres usando 25 ml de pentano-diclorometano (2:1 v/v) para la extracción. La elución de los compuestos volátiles ligados fue llevada a cabo de la siguiente manera; se depositaron 25 ml de metanol utilizando la misma columna una vez los compuestos libres fueron extraídos. Una vez que se extrajeron los volátiles, las muestras se deshidrataron con sulfato de sodio anhidro. En el caso de los compuestos libres, las muestras se concentraron con N₂ (gas) y se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Para los compuestos ligados, las muestras obtenidas se depositaron en tubos Falcon de 50 ml y se evaporó el metanol usando la centrífuga de vacío durante 6 horas hasta que se formó un sedimento pardusco. El sedimento se disolvió añadiendo 5 ml de tampón de citrato 0,2 M (pH 5) usando ultrasonidos. Una vez disuelto, se añadieron 200 µl de una solución que contenía enzimas con alta actividad de glucosidasa (25 g/L). Las muestras se incubaron durante 20 horas a 40 °C. Después de incubar, las muestras se transfirieron a un matraz de 10 ml y se llevaron al volumen con tampón de citrato y 25 µl de 1-heptanol (493 µg / ml, en etanol al 96% v/v). Las muestras se colocaron en tubos de ensayo de 25 ml y se agregaron 5 ml de NaCl al 30% (p/v). Las muestras se sometieron a tres extracciones con 2.5 ml de pentano-diclorometano (2: 1 v/v) cada una. Las fases orgánicas se deshidrataron con sulfato

de sodio anhidro, se concentraron con N₂ y se almacenaron a -20 °C hasta la inyección en GCMS.

Evaluación cromatográfica y espectrometría de masas (GCMS).

Con el fin de identificar y cuantificar los compuestos aromáticos volátiles encontrados en las muestras, se utilizó el análisis GCMS (Cromatografía gaseosa y espectrometría de masas). El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases GC-17A, acoplado con un espectrómetro de masas QP-5000 (ambos Shimadzu, Kyoto, Japón). La separación de GC se llevó a cabo en una columna capilar J & W DB-Wax (30 m × 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 μm de espesor de película) proporcionada por Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE. UU. Los espectros de masa de impacto electrónico se registraron a 70 eV y la identificación de compuestos volátiles se llevó a cabo mediante la comparación de sus espectros de masas y tiempos de retención con compuestos estándar, o por comparación del espectro de masas con los informados en las bibliotecas de espectro de masas Wiley 6 y NIST 107. Los índices de retención lineal también se calcularon sobre la base de los tiempos de retención de n-alcanos, y se compararon con los reportados en la literatura. La cantidad de muestra inyectada fue de 1 μl de una solución concentrada de 1 ml. Una vez que se realizaron las inyecciones, se utilizó el software GCMS Postrun Analysis (GCMS Solution Analysis Version 2.0. 1999-2001, Shimadzu) para identificación y cuantificación. El área de los picos se estableció en una hoja de cálculo de Excel donde se determinó la concentración del compuesto encontrado (Ecuación 2).

$$\frac{C_s}{A_s} = \frac{C_x}{A_x} \quad [2]$$

Análisis estadístico.

Se hizo una prueba de normalidad a los datos obtenidos, utilizando el valor de la media más o menos tres desviaciones estándares. Un ANOVA factorial completo fue utilizado para medir la interacción entre factores (sitio y tratamiento), además de una prueba Tukey con una probabilidad del 5%. Además, se realizó una separación de medias ajustadas mediante el método de LSmeans. Para el análisis de los datos se utilizó el programa SAS® (*Statistical Analysis System*) Versión 9.4.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los análisis químicos realizados en vino base y vino espumante fueron pH, acidez titulable (expresado en g/L de ácido tartárico), grado alcohólico y azúcares residuales. Al analizar los resultados obtenidos sobre el efecto del sitio, no se obtuvo diferencia significativa en ninguno de los análisis realizados para la región de Casarsa della Delizia y Corno di Rosazzo. Los valores del grado alcohólico fueron similares, donde 10.60% fue para Casarsa della Delizia y 10.67% para Corno di Rosazzo. En cuanto a acidez titulable, 7.53 y 6.48 g/L fueron obtenidos para la región de Corno di Rosazzo y Casarsa della Delizia respectivamente, aunque las diferencias no fueron significativas. Los valores de acidez titulable en vinos a partir de la variedad de Ribolla Gialla son altos, siendo una característica óptima para vinos espumantes (Cuadro 2).

Cuadro 2. Efecto del sitio del viñedo y el raleo de racimo en análisis químicos en vino base.

		pH	Acidez Titulable (g/L)	Grado Alcohólico (%vol)	Azúcar Residual (g/L)
Sitio (S)					
	Casarsa	3.13 ± 0.04	6.48 ± 0.88	10.6 ± 0.37	1.84 ± 0.43
	Corno	3.18 ± 0.05	7.53 ± 0.70	10.7 ± 0.53	1.65 ± 0.36
	Signo F	ns ¹	ns	ns	ns
Tratamiento (T)					
	UNT	3.17 ± 0.06	7.37 ± 0.54	10.5 ± 0.39	1.65 ± 0.36
	DIR	3.15 ± 0.05	6.63 ± 1.14	10.8 ± 0.47	1.84 ± 0.44
	Signo F	ns	ns	ns	ns
Interacción SxT					
	Signo F	ns	ns	ns	ns
CV (%)		1.37	9.48	4.63	26.03

Los datos representan la media aritmética ± la desviación estándar de tres repeticiones. ¹datos obtenidos a partir de un ANOVA bidireccional (ns, no significativo). UNT, sin tratar. DIR 20% de raleo de racimo.

Refiriéndose al raleo de racimo, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos. Al analizar de forma profunda los datos, existió una tendencia de baja acidez titulable y alto porcentaje de alcohol en el tratamiento DIR comparado al UNT. No existió

interacción entre los factores de sitio y tratamiento, por lo que el efecto de raleo de racimo se reportó como similar entre ambas regiones.

El azúcar residual es un parámetro utilizado para determinar el estado fermentativo del vino. De acuerdo a Dharmadhikari (2016) en vinos espumantes, el azúcar residual debe de oscilar entre el 0.2 y 0.3% dependiendo del pH. En vinos blancos, las azúcares residuales basadas en azúcares reductores tienen un límite máximo de 2 g/L (Butzke 2010). Al tener valores cercanos a cero, se dedujo que la fermentación fue efectuada de forma adecuada y el vino estaba listo para el consumo. De acuerdo a Alessandrini *et al.* (2018) el efecto de raleo aplicado a las uvas y el cultivo de las mismas en tierras bajas incrementó la concentración de sólidos solubles en el fruto. Al tener una mayor concentración en sólidos solubles, mayor cantidad de azúcares se encontraron disponibles para la fermentación.

La glucosa y fructosa fueron convertidas en etanol y dióxido de carbono como resultado de la fermentación. El etanol es de gran importancia en la industria vinícola ya que determina el cuerpo del vino y además tiene un efecto sobre el aroma y sabor del mismo (Zoecklein *et al.* 2013). El grado alcohólico del vino de mesa oscila entre 7 - 14% vol. dependiendo la dulzura del mismo. El ácido tartárico funcionó como indicador de la acidez titulable en el vino. El rango de ácido tartárico en vinos es muy variado dependiendo de la región, oscilando entre 2 - 6 g/L. Los resultados obtenidos coinciden con los de Bowen, Reynolds(2015b) donde se obtuvo una acidez titulable mayor en los controles que en los tratamientos con raleo ya que más racimos por viña retardaron el proceso de maduración, dando como resultado uvas con mayor acidez titulable. La acidez titulable está inversamente relacionada con el pH del vino. El pH en vinos tiene un rango normal de 2.9 a 3.9 (Yann 2016).

De acuerdo al efecto del sitio, no se identificó diferencia significativa para el grado alcohólico y pH, mientras que valores más altos para acidez titulable fueron encontrados para vinos espumantes en la región de Corno di Rosazzo (Cuadro 3). Las mismas diferencias fueron encontradas para el efecto de raleo de racimo. Igual a lo observado para vinos base, existió la tendencia de un mayor grado alcohólico y una baja acidez debido al efecto de raleo, y en vinos espumantes, el último también fue significativo. Los resultados coinciden con los del vino base, donde para vinos espumantes no existió una interacción significativa entre los sitios y los tratamientos.

Cuadro 3. Efecto del sitio del viñedo y el raleo de racimo en análisis químicos en vino espumante.

	pH	Acidez Titulable (g/L)	Grado Alcohólico (%vol.)	Azúcar Residual (g/L)
Sitio (S)				
Casarsa	3.21 ± 0.08	7.31 ± 0.61	11.5 ± 0.32	0.00 ± 0.00
Corno	3.14 ± 0.05	8.20 ± 0.56	11.6 ± 0.52	0.50 ± 0.42
Signo F	ns ¹	*	ns	*
Tratamiento (T)				
UNT	3.17 ± 0.09	8.00 ± 0.66	11.4 ± 0.32	0.20 ± 0.11
DIR	3.18 ± 0.05	7.51 ± 0.76	11.7 ± 0.49	0.30 ± 0.19
Signo F	ns	*	ns	ns
Interacción SxT				
Signo F	ns	ns	ns	ns
CV (%)	2.53	4.36	3.98	6.59

Los datos representan la media aritmética ± la desviación estándar de tres repeticiones.

¹datos obtenidos a partir de un ANOVA bidireccional (ns, no significativo). UNT, sin tratar. DIR 20% de raleo de racimo. *diferencia significativa (P<0.05)

Durante la segunda fermentación para la elaboración de vinos espumantes, el grado alcohólico aumentó ya que se adicionó azúcar y levaduras como parte del proceso, elevando la cantidad de etanol y dióxido de carbono en el sustrato. A pesar de que no se encontró diferencia estadística entre los diferentes tratamientos. Al someter el vino a un proceso de refermentación, los ácidos encontrados en el vino fueron disueltos en la solución (Bowen y Reynolds 2015a).

Los terpenos y norisoprenoides tuvieron una alta relevancia en el vino. Los terpenos y norisoprenoides encontrados en el vino base fueron 3-hidroxi-β-damascone y 3-oxo-α-ionol, en forma ligada glucosidicamente. Linalool, farnesol, geraniol, β-citronelol y β-damascenona fueron encontrados de forma libre (Cuadro 4). Se encontró diferencia significativa en el sitio para el compuesto geraniol, donde la concentración fue mayor en Casarsa della Delizia. La concentración de los demás compuestos no mostró diferencia significativa respecto a la región de cultivo. Las muestras de Casarsa della Delizia mostraron concentraciones más altas de compuestos aromáticos es casi todos los casos, así como las muestras con 20% de raleo de racimo. La interacción entre el sitio y el raleo no fue significativa, lo que indicó que el raleo de racimo afectó la concentración de compuestos aromáticos en una forma similar, en ambas regiones, con excepción en farnesol y β-citronelol donde la interacción si fue significativa.

Para la identificación de terpenos y norisoprenoides en el vino base y espumante, 27 compuestos fueron buscados, basados en los compuestos con mayor predominancia en

vinos espumantes. El compuesto encontrado en mayor proporción fue el 3-hydroxy- β -damascone como componente aromático ligado. El compuesto 3-hydroxy- β -damascone funciona como un precursor para la formación de diversos compuestos en forma libre durante la fermentación (Callejón *et al.* 2012).

Los compuestos aromáticos en forma glucosídicamente ligada comúnmente funcionan como precursores de compuestos aromáticos libres durante la fermentación. La fermentación secundaria conllevó a la producción de CO₂ para la formación de vino espumante. Los compuestos aromáticos volátiles cambiaron debido a la presencia de enzimas nativas y levaduras agregadas en el proceso. Luego de la fermentación secundaria, únicamente el compuesto 3-hidroxi- β -damascone fue encontrado en el vino espumante como compuesto ligado por su prevalencia en vinos espumantes (Dziadas, Jeleń 2010). Los compuestos aromáticos encontrados en forma libre fueron linalool, farnesol, geraniol, β -citronelol y β -damascenona (Cuadro 5).

De acuerdo al sitio y al tratamiento, no existió diferencia significativa entre los compuestos encontrados, con excepción de β -citronelol, que mostró una mayor concentración para la región de Casarsa della Delizia. Los vinos espumantes de Casarsa della Delizia tuvieron concentraciones menores de 3-hidroxi- β -damascone para compuestos ligados y todos los compuestos en forma libre se presentaron con mayor concentración para dicha región. Se observó que en el efecto de raleo de racimo, los valores de 3-hidroxi- β -damascone fueron menores, al igual que para la mayoría de los terpenos y norisoprenoides en forma libre. La disminución en concentración de los compuestos volátiles ligados pudo ser producto de las reacciones enzimáticas y acidas durante la fermentación, donde dichos compuestos fueron precursores de otros compuestos en forma libre (Fan *et al.* 2009).

De acuerdo a Zhang *et al.* (2016) los compuestos aromáticos son producidos en diversas etapas del crecimiento de la uva, al aplicar un raleo de racimo, la concentración de dichos compuestos incrementa. Este fenómeno se presentó para linalool únicamente. Los resultados obtenidos coinciden con los estipulados por Lukić *et al.* (2017) donde se mostró un incremento en los compuestos volátiles libres después de la segunda fermentación debido a la hidrólisis de los enlaces glucosídicos llevada a cabo por enzimas nativas y el efecto de las levaduras agregadas.

3-oxo- α -ionol no se reportó en las muestras de vino espumante. Este compuesto, al igual que la mayoría de los C₁₃ norisoprenoides, es encontrado comúnmente en la uva como producto de hidrólisis enzimática, sin embargo, la transformación de los norisoprenoides producto de enzimas en otros compuestos debe ser considerada como lo recomiendan Marais *et al.* (1992).

Previo a la prueba de normalidad aplicada, 13 compuestos fueron identificados. Para compuestos aromáticos ligados, 3-hidroxi- β -damascone, 3-oxo- α -ionol, nerol, geraniol y 3-gidroxi-7.8-dihidro- β -ionol fueron identificados; y trans nerolidol linalool, farnesol, geraniol, β -citronelol, β -damascenona, dl-limoneno y α -terpineol como compuestos aromáticos en forma libre.

Cuadro 4. Efecto del sitio del viñedo y el raleo de racimo en compuestos aromáticos volátiles en vino base.

		Terpenos y C ₁₃ -norisoprenoides ligados (µg/L)		Terpenos y C ₁₃ -norisoprenoides libres (µg/L)				
		3-hidroxi-β-Damascone	3-oxo-α-ionol	Linalool	Farnesol	Geraniol	β-Citronelol	β-Damascenona
Sitio (S)								
	Casarsa	11.9 ± 3.45	3.00 ± 3.30	3.66 ± 3.56	6.95 ± 1.56	10.4 ± 1.41	5.01 ± 4.33	9.85 ± 1.58
	Corno	11.1 ± 5.20	2.20 ± 2.56	1.57 ± 1.26	6.07 ± 6.05	0.01 ± 0.01	6.19 ± 2.88	6.57 ± 3.10
	Signo F	ns ¹	ns	ns	ns	*	ns	ns
Tratamiento (T)								
	UNT	11.0 ± 5.07	0.00 ± 0.00	2.56 ± 1.69	9.36 ± 2.67	4.91 ± 4.47	8.05 ± 2.48	8.63 ± 3.59
	DIR	12.0 ± 3.71	5.20 ± 1.25	2.67 ± 1.72	3.66 ± 3.59	5.43 ± 5.11	3.14 ± 2.74	7.79 ± 3.10
	Signo F	ns	*	ns	*	ns	*	ns
Interacción SxT								
	Signo F	ns	ns	ns	*	ns	*	ns
CV (%)		30.86	29.11	54.89	21.99	13.31	43.58	34.53

Los datos representan la media aritmética ± la desviación estándar de tres repeticiones. ¹datos obtenidos a partir de un ANOVA bidireccional (ns, no significativo, * diferencia significativa (P<0.05)). UNT, sin tratar. DIR 20% de raleo de racimo.

Cuadro 5. Efecto del sitio del viñedo y el raleo de racimo en compuestos aromáticos volátiles en vino espumante.

		Terpenos y C ₁₃ - norisoprenoides ligados (µg/L)	Terpenos y C ₁₃ -norisoprenoides libres (µg/L)				
		3-hidroxi-β- Damascone	Linalool	Farnesol	Geraniol	β-Citronelol	β-Damascenona
Sitio (S)							
	Casarsa	14.4 ± 2.61	2.87 ± 0.53	6.09 ± 2.23	6.00 ± 1.93	11.5 ± 1.39	8.83 ± 1.40
	Corno	17.1 ± 5.27	2.08 ± 0.97	4.37 ± 3.44	0.00 ± 0.00	4.41 ± 2.94	5.28 ± 3.15
	Signo F	ns ¹	ns	ns	ns	*	ns
Tratamiento (T)							
	UNT	17.2 ± 5.58	2.25 ± 0.82	6.94 ± 3.76	3.28 ± 2.58	8.13 ± 2.50	7.73 ± 3.33
	DIR	14.3 ± 3.99	2.69 ± 1.24	3.52 ± 2.37	2.72 ± 0.38	7.81 ± 1.25	6.38 ± 2.90
	Signo F	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Interacción SxT							
	Signo F	ns	ns	ns	ns	ns	ns
CV (%)		36.6	32.8	64.2	80.5	25.5	36.4

Los datos representan la media aritmética ± la desviación estándar de tres repeticiones. ¹datos obtenidos a partir de un ANOVA bidireccional (ns, no significativo, *Diferencia significativa(P<0.05)). UNT, sin tratar. DIR 20% de raleo de racimo.

4. CONCLUSIONES

- No se encontraron diferencias en las evaluaciones químicas del vino base, mientras que se observó una diferencia significativa en acidez titulable respecto a la región para vino espumante.
- El efecto de raleo de racimo en vinos base generó un aumento en 3-hidroxi- β -damascone (compuesto ligado) y una reducción en dos compuestos volátiles libres, dicho efecto no fue observado en vinos espumantes. A la vez, no se evidenciaron interacciones entre el sitio y el raleo de racimo para la mayoría de las evaluaciones realizadas exceptuando la concentración de dos compuestos aromáticos libres (farnesol y β -citronelol) en vino base.
- Se cuantificó un total de siete compuestos volátiles en vino base y seis compuestos volátiles en vino espumante. β -citronelol se redujo significativamente en las muestras de vino espumante de acuerdo a la región, donde se obtuvo mayor concentración para la región de Casarsa della Delizia.

5. RECOMENDACIONES

- Aplicar el estudio a la uva y el mosto para conocer la influencia del raleo de racimo en las diversas partes del procesamiento del vino espumante.
- Realizar análisis sensorial y catación del vino para determinar si existe diferencia perceptible por los consumidores y panelistas entrenados entre los tratamientos.
- Utilizar otros niveles de raleo en el cultivo para determinar su impacto sobre el vino espumante.
- Analizar la variable color y estudiar la relación que existe con los compuestos aromáticos.
- Aplicar el raleo de racimo en diversas etapas del desarrollo de la uva.
- Medir el efecto de otras regiones donde la variedad Ribolla Gialla es cultivada.
- Realizar un análisis independiente para el tratamiento y la región.

6. LITERATURA CITADA

Alessandrini M, Battista F, Panighel A, Flamini R, Tomasi D. 2018. Effect of pre-bloom leaf removal on grape aroma composition and wine sensory profile of Semillon cultivar. *J Sci Food Agric.* 98(5):1674–1684. eng.

Aubert C, Ambid C, Baumes R, Günata Z. 2003. Investigation of bound aroma constituents of yellow-fleshed nectarines (*Prunus persica* L. Cv. Springbright). changes in bound aroma profile during maturation. *J. Agric. Food Chem.* 51(21):6280–6286. eng. doi:10.1021/jf034613h.

Black CA, M. Parker, T.E. Siebert, D.L. Capone, I.L. Francis. 2015. Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. *Australian Journal of Grape and Wine Research.* 21:582–600.

Bowen AJ, Reynolds AG. 2015a. Aroma compounds in Ontario Vidal and Riesling icewines. I. Effects of harvest date. *Food Res Int.* 76(Pt 3):540–549. eng.

Bowen AJ, Reynolds AG. 2015b. Aroma compounds in Ontario Vidal and Riesling icewines. II. Effects of crop level. *Food Res Int.* 76(Pt 3):550–560. eng.

Bureau SM, Razungles AJ, Baumes RL. 2000. The aroma of Muscat of Frontignan grapes: Effect of the light environment of vine or bunch on volatiles and glycoconjugates. *J. Sci. Food Agric.* 80(14):2012–2020. doi:10.1002/1097-0010(200011)80:14<2012:AID-JSFA738>3.0.CO;2-X.

Butzke. 2010. Preventing Refermentation: Residual sugar and malic acid can cause fermentation in bottled wine. *Purdue Extension.* 56. <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/FS/FS-56-W.pdf>

Caliari V, Pretto Panceri C, Rosier JP, Marilde T. Bordignon-Luiz. 2015. Effect of the traditional, Charmat and Asti method production on the volatile composition of Moscato Giallo sparkling wines. *LWT - Food Science and Technology.* 61:393–400.

Callejón RM, Margulies B, Hirson GD, Ebeler SE. 2012. Dynamic changes in volatile compounds during fermentation of Cabernet Sauvignon Grapes with and without skins. *Am. J. Enol. Vitic.* 63(3):301–312. doi:10.5344/ajev.2012.12009.Liu B, Xu X-Q, Cai J.

Choi H-S. 2003. Character impact odorants of *Citrus hallabong* (*C. unshiu* Marcov x *C. sinensis* Osbeck) x *C. reticulata* Blanco cold-pressed peel oil. *J. Agric. Food Chem.* 51(9):2687–2692. eng. doi:10.1021/jf021069o.

Comuzzo P, Marconi M, Zanella G, Querzè M. 2018. Pulsed electric field processing of white grapes (cv. Garganega): effects on wine composition and volatile compounds. *Food Chemistry* 264:16–23. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.04.116.

Davies NW. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography A.* 503:1–24. doi:10.1016/S0021-9673(01)81487-4.

D'Agata I. 2014. Native wine grapes of Italy. University of California Press. Available at:https://books.google.it/books?id=y3_8AgAAQBAJ&pg=PA413&dq=Ribolla+Gialla+variety&hl=it&sa=X&ved=0ahUKEwj7j_S51cXZAhWpA8AKHVjMA2MQ6AEIMTAB#v=onepage&q=Ribolla%20Gialla%20variety&f=false

Dharmadhikari. 2016. Determining residual sugar using a hydrometer. Mountain Grove, MO: Missouri State Winery and Distillery Darr School of Agriculture. <https://ag.missouristate.edu/assets/MtnGrv/MS28MWFHUweb.pdf>.

Dziadas M, Henryk H, Jeleń. 2010. Analysis of terpenes in white wines using SPE-SPME-GC/MS approach. *Analytica Chimica Acta.* 677:43–49.

Hazzit M, Baaliouamer A, Faleiro ML, Miguel MG. 2006. Composition of the essential oils of thymus and origanum species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. *J. Agric. Food Chem.* 54(17):6314–6321. eng. doi:10.1021/jf0606104.

Humpf HU, Schreier P. 1991. Bound aroma compounds from the fruit and the leaves of blackberry (*Rubus laciniata* L.). *J. Agric. Food Chem.* 39(10):1830–1832. doi:10.1021/jf00010a028.

Ito Y, Sugimoto A, Kakuda T, Kubota K. 2002. Identification of potent odorants in chinese jasmine green tea scented with flowers of *Jasminum sambac*. *J. Agric. Food Chem.* 50(17):4878–4884. doi:10.1021/jf020282h.

Le Quere JL, Latrasse A. 1990. Composition of the essential oils of black currant buds (*Ribes nigrum* L.). *J. Agric. Food Chem.* 38(1):3–10. doi:10.1021/jf00091a001.

Hernandez-Orte P, Concejero B, Astrain J, Lacau B, Cacho J, Ferreira V. 2014. Influence of viticulture practices on grape aroma precursors and their relation with wine aroma. *J Sci Food Agric* 2015. 95(688-701).

Liu B, Xu X-Q, Cai J, Lan Y-B, Zhu B-Q, Wang J. 2015. The free and enzyme-released volatile compounds of distinctive *Vitis amurensis* var. Zuoshanyi grapes in China. *Eur Food Res Technol.* 240(5):985–997. doi:10.1007/s00217-014-2403-9

Lukić I, Lotti C, Vrhovsek U. 2017. Evolution of free and bound volatile aroma compounds and phenols during fermentation of *Muscat blanc* grape juice with and without skins. *Food Chemistry*. 232:25–35. eng. doi:10.1016/j.foodchem.2017.03.166

Marais J, van Wyk CJ, Rapp A. 1992. Effect of sunlight and shade on norisoprenoid levels in maturing weisser riesling and *Chenin blanc* Grapes and weisser riesling wines. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 13(1).

Tatsuka K, Suekane S, Sakai Y, Sumitani H. 1990. Volatile constituents of kiwi fruit flowers: Simultaneous distillation and extraction versus headspace sampling. *J. Agric. Food Chem.* 38(12):2176–2180. doi:10.1021/jf00102a015.

ThermoFisher. 2016. Wine analysis: from 'grapes to glass' – an analytical testing digest of the wine manufacturing process; [accessed 2018 May 30]. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/brochures/XX-72102-Wine-Analysis-XX72102-EN.pdf>.

Wang Y, He Y, Chen W, He F, Chen W, Cai X, Duan C, Wang J. 2018. Effects of cluster thinning on vine photosynthesis, berry ripeness and flavonoid composition of Cabernet Sauvignon. *Food Chemistry*. 248:101–110.

Yamaguchi K, Shibamoto T. 1981. Volatile constituents of green tea, Gyokuro (*Camellia sinensis* L. var Yabukita). *J. Agric. Food Chem.* 29(2):366–370. doi:10.1021/jf00104a035

Yann. 2016. International Organisation of Vine and Wine (OIV). In: International regulatory co-operation: The role of international organisations in fostering better rules of globalisation / OECD. Paris: OECD Publishing. p. 168–169 ; [accessed 2018 May 30].

Yuan F, Qian MC. 2016. Development of C13-norisoprenoids, carotenoids and other volatile compounds in *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot noir grapes. *Food Chemistry*. 192:633–641.

Zhang P, Fuentes S, Siebert T, Krstic M, Herderich M, Barlow EWR, Howell K. 2016. Terpene evolution during the development of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grapes. *Food Chemistry*. 204:463–474. Eng

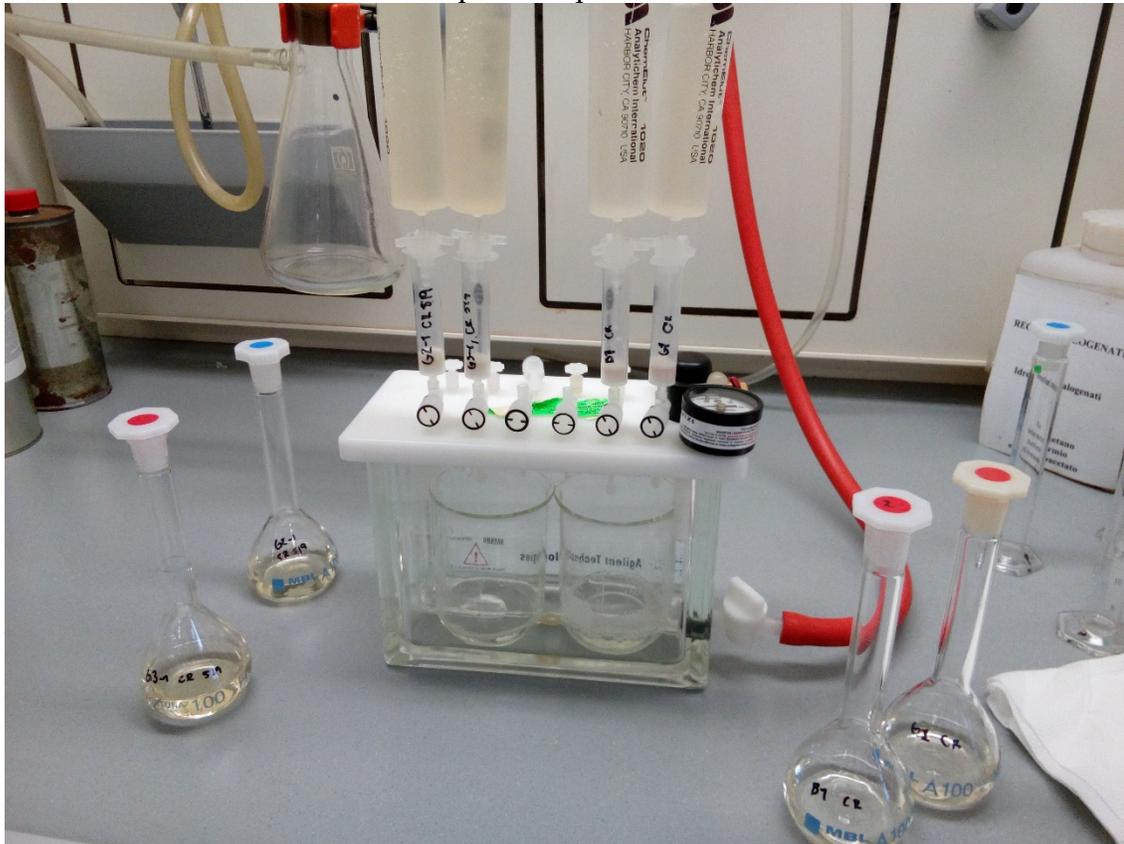
Zhao Y, Xu Y, Li J, Fan W, Jiang W. 2009. Profile of volatile compounds in 11 brandies by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J Food Sci.* 74(2):C90-9. eng. doi:10.1111/j.1750-3841.2008.01029.x.

Zoecklein BW, CH Hackney, SE Duncan, JE Marcy. 1999. Effect of fermentation, aging and thermal storage on total glycosides, phenol-free glycosides and volatile compounds of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 22:100–107.

Zoecklein B, Fugelsang KC, Gump BH, Nury FS. 2013. Wine analysis and production. [place unknown]: Springer US. ISBN: 9781475769678. <https://books.google.hn/books?id=yQLyBwAAQBAJ>

7. ANEXOS

Anexo 1. Extracción de fase sólida para compuestos aromáticos.



Anexo 2. Tiempo de retención para compuestos aromáticos volátiles comunmente encontrados en vinos.

	Compound	R _f ¹	R _f (lit) ²	Reference
1	4-carene	7.692	1,128	(Le Quere, Latrasse 1990)
2	Dl-limonene	9.142	1,189	(Hazzit <i>et al.</i> 2006)
3	Cis-linalool oxide (furanic)	16.97	1,451	(Davies 1990)
4	1-heptanol	17.54	1,462	(Tatsuka <i>et al.</i> 1990)
5	Trans-linalool oxide (furan)	17.87	1,461	(Davies 1990)
6	Linalool	20.36	1,554	(Choi 2003)
7	Terpinene 4-ol	21.8	1,616	(Choi 2003)
8	Trans -ocimeneol	24.15	1,685	(Davies 1990)
9	α -terpineol	24.64	1,711	(Choi 2003)
10	β -citronellol	26.69	1,771	(Choi 2003)
11	α -ionone	27.39	1,805	(Yamaguchi, Shibamoto 1981)
12	Nerol	27.52	1,808	(Davies 1990)
13	β -damascenone	27.87	1,801	(Davies 1990)
14	Geraniol	28.86	1,842	(Davies 1990)
15	Unknown m/z 163 isomer 1 (3-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-propenal)	30.81	1,952	(Zhao <i>et al.</i> 2009)
16	Unknown m/z 163 isomer 2 (3-(2,6,6-Trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2-propenal)	31.15	1,952	(Zhao <i>et al.</i> 2009)
17	Trans-nerolidol	33.86	2,044	(Davies 1990)
18	β eudesmol	37.7	2,248	(Davies 1990)
19	1-hydroxylinalool	40.02	2,321	(Ito <i>et al.</i> 2002)
20	Geranic acid	40.56	2,353	(Selli <i>et al.</i> 2006)
21	Farnesol	41.02	2,371	(Choi 2003)
22	3-Hydroxy- β -damascone	44.63	2,563	(Aubert <i>et al.</i> 2003)
23	Trans,trans-2,6-Dimethyl-2,6-octadiene-1,8-diol (Z8-hydroxygeraniol)	45.48	2,614	(Aubert <i>et al.</i> 2003)
24	3-Oxo- α -ionol	46.574	2,629	(Bureau <i>et al.</i> 2000)
25	Dihydro- β -ionone	47.176	1,460	(Bureau <i>et al.</i> 2000)
26	3-Oxo-7,8-dihydro- α -ionol (blumenol C)	47.942	2,694	(Humpf, Schreier 1991)
27	3-Hydroxy-7,8-dihydro- β -ionol	48.918	2,681	(Aubert <i>et al.</i> 2003)

¹Retention time. ²Retention index according to literature.