

## COMPREENDER E GERIR PROBLEMAS DE REDUÇÃO

Vicente Ferreira and Ernesto Franco-Luesma

Laboratory for Aroma Analysis and Enology (LAAE). Instituto Agroalimentario de Aragón (IA2).  
Universidad de Zaragoza

Vencedor do Prémio Internacional Oenoppia SIVE 2015

### Introdução

Os odores indesejáveis de redução não são raros na produção de vinho, particularmente no estágio em garrafa (1-5), e são responsáveis por uma grande parte dos vinhos com defeito, com consequências negativas na imagem da marca. Este problema é geralmente provocado pelo desenvolvimento do H<sub>2</sub>S e do metanotiol (MeSH) (4), embora um número diferente de outros compostos sulfurados voláteis (VSCs) tenham sido também identificados (1, 2).

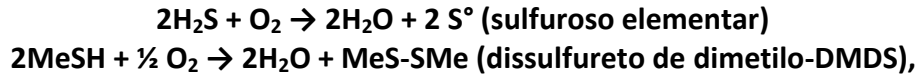
Uma terceira molécula importante, o sulfureto de dimetilo (DMS), também é frequentemente incluída no grupo dos problemas de redução. No entanto, o DMS difere fortemente do H<sub>2</sub>S e do MeSH, tanto ao nível dos efeitos sensoriais (6-8), como na sua origem química e suas propriedades (9), devendo ser considerado à parte.

É comum pensar que a fermentação alcoólica é a fonte mais importante dos odores de redução, e de facto o desenvolvimento dos odores característicos a H<sub>2</sub>S e MeSH, durante este passo chave no processo de vinificação, é por vezes claramente observado. O H<sub>2</sub>S pode ser formado diretamente pelas *Saccharomyces* a partir do enxofre elementar (10), dos sulfatos, ou mais facilmente do sulfito (11) geralmente adicionado como agente antioxidante e antimicrobiano. A formação é tipicamente mais forte em mostos com níveis mais baixos de azoto assimilável (11), embora os fatores determinantes para a sua síntese estejam longe de ser claramente compreendidos (12). Em caso de formação excessiva destes compostos, os enólogos controlam os seus níveis através de colagem com cobre, arejamento ou adição de borras (13-15).

As razões que explicam a acumulação destas moléculas durante o estágio em garrafa, mais frequentemente nos vinhos em que estes compostos foram previamente formados no decorrer da fermentação, não são claramente conhecidas (14). Várias hipóteses foram formuladas por cientistas ao longo dos anos, embora a maioria das quais não tenham sido demonstradas. Uma das hipóteses que recebeu maior credibilidade entre os enólogos refere que a origem destes compostos está relacionada com a redução dos dissulfuretos ou do enxofre elementar (16).

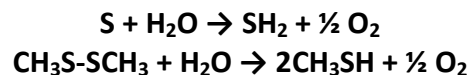
Esta é a hipótese com maior aceitabilidade, pois é consistente com a observação de que os VSCs reaparecem quando o vinho é armazenado sem qualquer contacto com o oxigénio; isto é, em condições de redução, e é a hipótese explícita ou implicitamente

aceite pelos manuais de enologia (17, 18) e pelos consultores de vinho (19). A ideia por trás desta hipótese reside na utilização indevida do oxigénio nas etapas precedentes da vinificação. Durante estas etapas, quando o O<sub>2</sub> entra em contacto com o vinho contendo H<sub>2</sub>S e MeSH, o que se pensa que acontece é a seguinte reação:



Tanto o enxofre elementar como os dissulfuretos são produtos genuínos de oxidação. Alguns autores sugerem mesmo que a produção de dissulfureto é reforçada quando a colagem cúprica é efetuada demasiado cedo, após um processo de arejamento, uma vez que este atua como catalisador (19).

Assim, e segundo esta teoria, este enxofre e os dissulfuretos serão reduzidos mais tarde. A redução é a reação química oposta à oxidação. Se algo é oxidado, há a perda de eletrões (geralmente porque o O<sub>2</sub> os captura). Contrariamente, na redução há captura de eletrões. Embora a parte que captura os eletrões não esteja totalmente clarificada, a verdade é que a formação do H<sub>2</sub>S a partir do enxofre elementar, ou do MeSH a partir do dissulfureto, é um processo genuíno de redução:



e como o H<sub>2</sub>S e o MeSH são muito mais odoríferos que o enxofre elementar (inodoro) ou que os dissulfuretos (o limiar de perceção do odor do dissulfureto de dimetilo é 50 vezes maior do que o do MeSH), esta hipótese parece ajustar-se à experiência dos enólogos.

Mas tal não é verdade! Ou pelo menos, não é totalmente verdade! Como mostraram os nossos resultados...

### **1ª DESCOBERTA. O vinho contém H<sub>2</sub>S e MeSH sob as formas não-voláteis e inodoras**

Observamos que as concentrações de H<sub>2</sub>S e MeSH quantificadas no vinho são extremamente dependentes do método de análise utilizado. A maioria dos métodos quantificam as moléculas presentes no vapor acima dos vinhos. Este tipo de métodos dizem-nos quantas destas moléculas são voláteis, no entanto, se estas estiverem ligadas ou “ancoradas” (ligações não covalentes) a algo que não lhes permita passar ao estado de vapor, então estes métodos não as conseguirão detetar. Desenvolvemos um tipo de processo diferente onde muitas destas “ancoras” ou “ligações fracas” são quebradas, tornando possível a deteção das moléculas na forma ligada. Combinando os dois tipos de métodos, é possível quantificar formas livres (voláteis e odoríferas) de H<sub>2</sub>S, MeSH e outros mercaptanos, e formas ligadas (não-voláteis e inodoras) (20).

Os nossos resultados mostram que a maioria dos vinhos engarrafados “mais normais” (não particularmente oxidados ou reduzidos) contém grandes proporções de H<sub>2</sub>S e MeSH

nestas formas ligadas. Em média, observamos que 94% e 47% de H<sub>2</sub>S e MeSH se encontram sob as formas ligadas, como é resumido na Tabela 1.

**Tabela 1:** Média, frações máximas e mínimas (em %) de H<sub>2</sub>S, MeSH e DMS sob as formas ligadas em vinhos engarrafados.

Molécula	Média	Máximo	Mínimo
H <sub>2</sub> S	94% (vinhos tintos) 92 % (brancos e rosés)	99,9%	76% (tintos) 83% (brancos e rosés)
MeSH	62% (vinhos tintos) 31% (brancos e rosés)	83% (tintos) 60% (brancos e rosés)	29% (tintos) 4% (brancos e rosés)
DMS	Não está presente nas formas ligadas		

**2ª DESCOBERTA. Cada vinho tem uma capacidade específica para se ligar REVERSIVELMENTE ao H<sub>2</sub>S e aos mercaptanos**

Se o H<sub>2</sub>S e o MeSH livres são adicionados a diferentes vinhos, será facilmente observado que existem alguns vinhos nos quais estas moléculas permanecem voláteis, e portanto facilmente podem ser sentidas, embora existam outros vinhos, nos quais as moléculas estão fortemente ligadas, que não podem ser quantificadas (e portanto sentidas) como as formas livres. Ambos os modelos podem ser observados na Tabela 2. O vinho 2 segue o primeiro modelo e a recuperação das formas livres é bastante elevada, enquanto o vinho 3 segue o segundo modelo e mesmo as formas livres de H<sub>2</sub>S não são detetadas. No entanto, o método para as formas totais confirma que estas moléculas continuam presentes no vinho (recuperação de 92%), mesmo que após alguns dias elas sejam transformadas em qualquer outra coisa e a taxa de recuperação decresça.

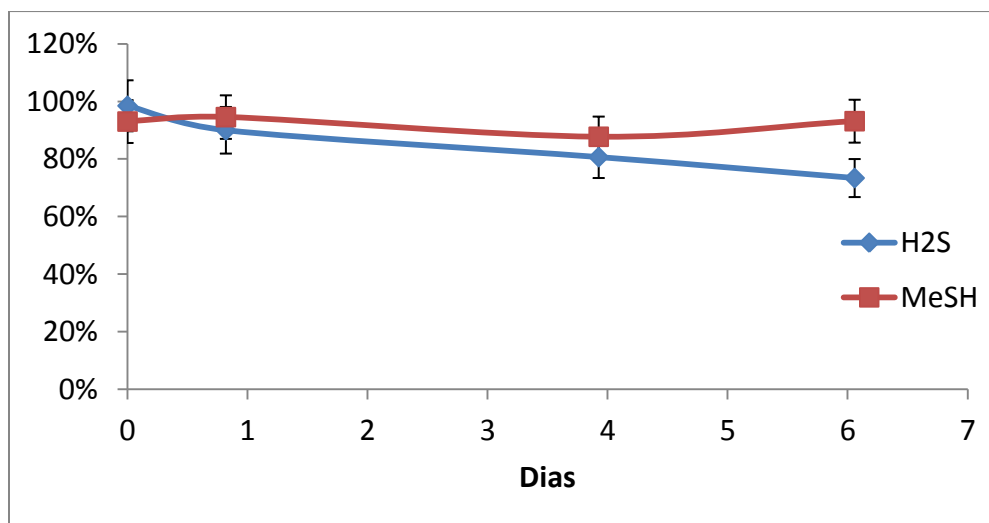
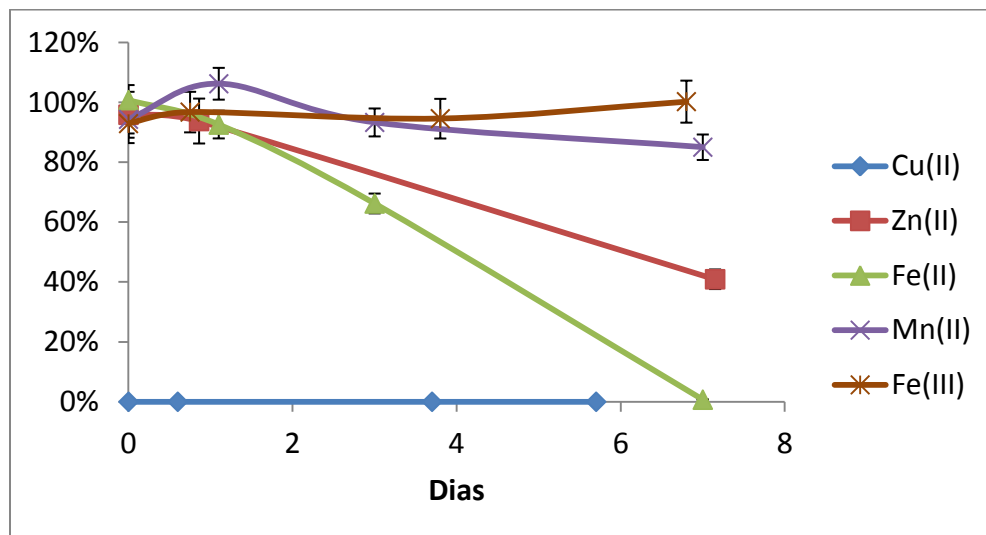
**Tabela 2:** Picos de recuperação de H<sub>2</sub>S e MeSH em dois vinhos diferentes. Uma recuperação de 100% significa que o sinal medido corresponde inteiramente à quantidade total do composto marcado (adaptado da referência (20)).

Recuperação (%)		H <sub>2</sub> S	Total	MeSH	Total
		Livre		Livre	
Vinho 2	Após adição do marcador	108%	105%	101%	100%
	2 dias depois	53%	103%	84%	100%
Vinho 3	Após adição de marcador	0,0%	92%	62%	100%
	2 dias depois	0,0%	20%	6,6%	95%

**3ª DESCOBERTA. H<sub>2</sub>S e mercaptanos não precipitam mas formam complexos estáveis, reversíveis e solúveis, com alguns cátions metálicos, nomeadamente o cobre**

O gráfico apresentado na Figura 1a (adaptado da referência (20)) indica claramente que alguns cátions são perfeitamente capazes de se ligarem ao H<sub>2</sub>S e ao MeSH livres, evitando a sua presença no espaço de cabeça (*headspace*) do vinho.

**Figura 1:** 1a) Recuperação do H<sub>2</sub>S LIVRE adicionado a uma amostra de vinho sintético contendo 0,5 mg/L de diferentes cátions metálicos; 1b) Recuperações de H<sub>2</sub>S total e de MeSH total adicionados a um vinho sintético contendo 0,5 mg/L de sulfato de cobre.



Como se pode observar na Figura 1a, e de acordo com a experiência em vinificação, um pouco de sulfato de cobre é suficiente para remover completamente o H<sub>2</sub>S do espaço cabeça (*headspace*). Os resultados para o MeSH (não mostrados) foram semelhantes. Iões ferrosos (Fe (II)) foram também capazes de se ligarem ao H<sub>2</sub>S, mas tal foi apenas visível

após alguns dias. O zinco também foi capaz de se ligar a pequenas quantidades de H<sub>2</sub>S, sendo necessário mais tempo. Nenhum destes resultados foi surpreendente.

O que é novo é o facto do H<sub>2</sub>S e do MeSH estarem de facto presentes no vinho sintético contendo cobre, mesmo que não seja possível a deteção destas moléculas no espaço de cabeça (Figura 1a). Além disso, aprendemos que o Cu (II) e o H<sub>2</sub>S precipitam como CuS. No entanto, a análise destas amostras contendo H<sub>2</sub>S, MeSH e sulfato de cobre com o método para formas totais, revelou que a maioria dos dois compostos continuaram em solução, como mostra a Figura 1b. É de salientar que não se observou qualquer precipitação de CuS. Confirmamos esta observação várias vezes, e podemos garantir que o CuS não precipita no vinho, em condições normais. Mesmo a níveis de H<sub>2</sub>S e de cobre tão elevados como a 1 e 2 mg/L, respetivamente, não ocorre precipitação, o que é essencialmente semelhante ao que alguns investigadores australianos têm demonstrado que acontece no vinho (13).

Esta terceira descoberta pode parecer chocante, uma vez que contradiz o que é ensinado nos manuais de química e de enologia (17). No entanto, existe uma explicação convincente, relacionada com a química de soluções muito diluídas. A níveis baixos nos quais o H<sub>2</sub>S e o Cu (II) são encontrados no vinho, o que é formado não é um sal sólido separado de CuS, mas uma série de “clusters” que contêm unidades básicas de Cu<sub>3</sub>S<sub>3</sub> (21). Estes *clusters* em solução são semelhantes a uma neblina ou fumo no ar. Podem permanecer como moléculas verdadeiramente insolúveis, ou podem atuar como coloides, ou mesmo como nanopartículas, mas não formam uma fase distinta. Este tipo de *clusters*, formados por um catião metálico e um sulfureto, são realmente omnipresentes na natureza e são, entre outros, responsáveis pelo facto dos sulfuretos sensíveis ao oxigénio poderem suportar mesmo águas oxigenadas (21-23). São também responsáveis pelo transporte aquoso de catiões metálicos supostamente insolúveis em diferentes ambientes (24), e alguns estudos revelam que, de facto, a formação de sulfuretos solúveis é uma estratégia inteligente, utilizada por algumas espécies para a desintoxicação de metais tóxicos (25).

O aspeto chave a compreender é que o H<sub>2</sub>S e o MeSH se ligam fortemente ao Cu (II), não para formar uma fase sólida distinta, mas para formar uma espécie solúvel ou sulfuretos coloidais que persistem no vinho, constituindo uma reserva dissimulada destes dois compostos de odor desagradável.

#### **4ª DESCOBERTA. O conteúdo do vinho em metais explica perfeitamente o conteúdo de H<sub>2</sub>S total no vinho**

Pode parecer estranho, mas fomos capazes de derivar alguns modelos matemáticos que preveem com exatidão o teor de H<sub>2</sub>S total no vinho, tendo apenas em conta o seu teor em catiões metálicos (mais alguns químicos são requeridos nos vinhos tintos). No caso dos vinhos brancos e rosés, encontramos a seguinte relação:

$$\text{Conteúdo H}_2\text{S total} = k_0 + k_1 C_{\text{Cu}} + k_2 C_{\text{Mn}} - k_3 C_{\text{Fe}} - k_4 C_{\text{Zn}}$$

Embora existam ainda alguns elementos na equação que não conseguimos explicar, é notável que esta sugira que o cobre presente no mosto em fermentação possa atuar como uma espécie de sistema de captura para o H<sub>2</sub>S, que de outra forma teria sido expelido do depósito de fermentação através do CO<sub>2</sub> libertado. Resultados semelhantes são obtidos para os vinhos tintos. O papel de outros catiões não é claro, mas deverá estar relacionado com alguma atividade catalítica das enzimas das leveduras.

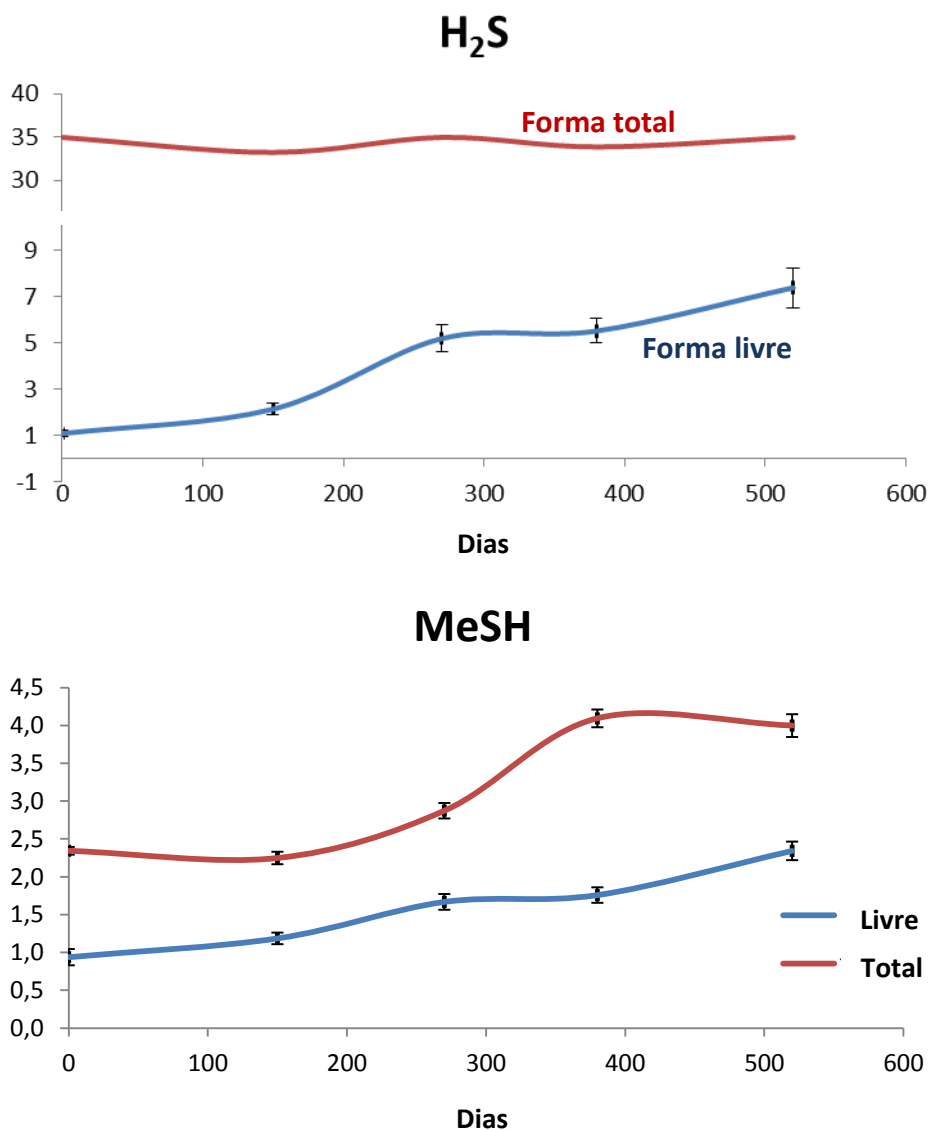
**5ª DESCOBERTA. Os aumentos do H<sub>2</sub>S livre observados durante o armazenamento do vinho em condições de anoxia são geralmente devidos à libertação de formas complexas. No caso do MeSH, a nova formação é mais relevante (> 50%)**

Isto pode ser claramente observado na Figura 2a, que resume o que acontece com os níveis de H<sub>2</sub>S livre e total nos vinhos tintos armazenados sob anoxia estrita (ausência de oxigénio), durante aproximadamente 18 meses. Como pode ser observado, os níveis das formas totais permanecem constantes ao longo de todo o período, já os níveis das formas livres aumentam lenta mas continuamente, indicando que os aumentos de H<sub>2</sub>S observados ao longo do armazenamento dos vinhos sob anoxia é principalmente uma consequência da clivagem das formas ligadas que são libertadas sob as formas livres. Os resultados sugerem que os vinhos tintos libertam cerca de 0,4 µg/L de H<sub>2</sub>S livre por mês em média. Os resultados para os vinhos brancos e rosés são semelhantes, embora nestes tipos de vinhos a quantidade libertada seja superior (cerca de 0,7 µg/L/mês). As diferenças entre os vinhos, no que diz respeito, por exemplo, à sua capacidade para acumular H<sub>2</sub>S livre ao longo do armazenamento sob anoxia, podem ser próximas de uma ordem de grandeza.

O comportamento do MeSH é um pouco diferente, como pode ser observado na Figura 2b. Neste caso, existe também um aumento contínuo das formas livres com o tempo de armazenamento. Em média, a acumulação desta molécula odorífera poderosa é de 0,08 µg/L/mês, o que é cerca de 1 µg/L/ano para os vinhos tintos. Em brancos e rosés, em média, o aumento desta molécula é de cerca de 1,7 µg/L/ano. As diferenças entre vinhos segundo a sua capacidade diferencial para acumular MeSH livre pode ser acima do fator 6.

Uma diferença interessante com o caso do H<sub>2</sub>S é que as formas totais do MeSH também experimentam um aumento notável, que não foi observado na figura 2a. As magnitudes destes aumentos nas formas totais são semelhantes às das formas livres. Isto significa que no presente caso, os dois fenómenos diferentes ocorrem. Por um lado, há uma libertação clara de MeSH livre a partir das formas ligadas, mas por outro lado, é evidente que todos os vinhos são capazes de formar esta molécula "de novo" a partir de um ou vários precursores. Os nossos dados sustentam a ideia de que o aminoácido metionina, que permanece no vinho após a fermentação, é um dos mais importantes precursores para a formação desta molécula (26).

**Figura 2:** Teores médios ( $\mu\text{g/L}$ ) das formas totais e livres de  $\text{H}_2\text{S}$  (2a) ou de MeSH (2b) de 13 vinhos tintos diferentes armazenados sob anoxia estrita durante 18 meses.



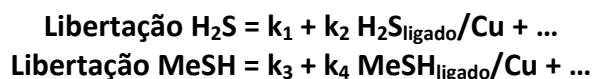
**6ª DESCOBERTA. Outras alterações importantes sugerem que a libertação do  $\text{H}_2\text{S}$  e do MeSH pode ser originada por clivagem complexa após redução do Cu (II)**

Outras duas importantes alterações químicas são observadas durante o armazenamento das amostras em anoxia: uma diminuição do potencial redox e aumentos importantes nas absorvâncias a 420 nm. Ambas as alterações parecem estar fortemente correlacionadas, de modo a que qualquer aumento na absorvância é acompanhado por uma diminuição do potencial redox, que se torna mais negativo (reductor).

Apesar do facto de existir alguma controvérsia no interior da comunidade científica sobre o verdadeiro significado do potencial redox (27), pensamos que a relação entre as duas variáveis é de causalidade; isto é, pensamos que o potencial redox diminui porque alguns

polifenóis do vinho experimentam de forma espontânea certas reações químicas, nas quais os eletrões são libertados (auto-oxidação). Estas reações envolvem a formação de formas mais condensadas de polifenóis que, por sua vez, implicam o aumento da absorvância a 420 nm (cor amarela). Isto é na maioria das vezes negligenciado: algumas reações de polifenóis condensados são de facto reações de auto-oxidação uma vez que envolvem a libertação de eletrões. Se O<sub>2</sub> está presente no meio, estes eletrões serão captados pelo O<sub>2</sub>. No entanto, quando os fenómenos ocorrem em anoxia estrita, estes eletrões irão aumentar a proporção Fe (II)/Fe (III) do vinho, tornando o seu potencial redox mais negativo. A hipótese é que em algum ponto do processo, a acumulação de eletrões seja suficiente para reduzir o Cu (II) a Cu<sup>0</sup>. Desta forma, quaisquer H<sub>2</sub>S de mercaptanos ligados ao Cu (II) podem ser libertados.

Esta hipótese ainda requer uma confirmação experimental direta, mas é consistente com os factos. Também é consistente com os modelos que foram obtidos para explicar a acumulação de H<sub>2</sub>S livre e MeSH, atribuídos à libertação das formas ligadas. Em todos os casos, os modelos mostram a seguinte estrutura:



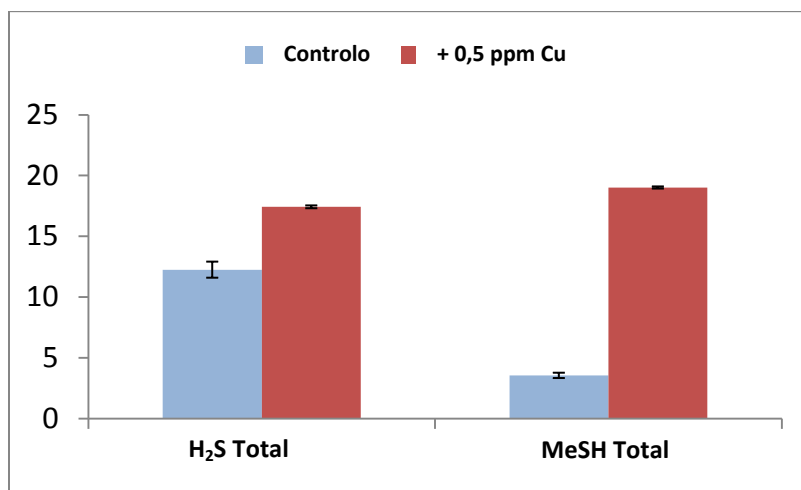
Os modelos mostram que a libertação é proporcional à reserva das formas ligadas aprisionadas no vinho, e inversamente proporcional à quantidade de cobre que o vinho apresenta. Isto é paradoxal, uma vez que na descoberta anterior foi observado que a quantidade de H<sub>2</sub>S contido nos vinhos foi proporcional aos níveis de cobre (4ª descoberta). O que acontece é que o cobre aprisiona tão fortemente H<sub>2</sub>S e mercaptanos o que torna a sua libertação mais difícil. Então, se o vinho apresenta mais cobre, também irá apresentar mais H<sub>2</sub>S, mas irá libertá-lo a uma taxa mais lenta.

Mas ainda há mais!

### **7ª DESCOBERTA: A formação "de novo" de H<sub>2</sub>S e de MeSH ocorre por intermédio da dessulfuração do cobre catalisada por aminoácidos-S**

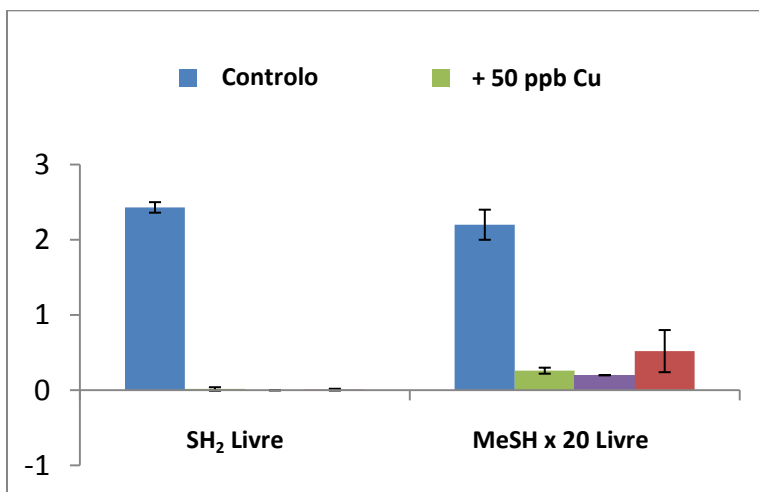
Numa descoberta anterior (5ª descoberta), a formação "de novo" do MeSH foi descrita como um processo normal no vinho. Este não foi o caso do H<sub>2</sub>S, para o qual a nova formação é observada apenas em alguns vinhos particulares e em algumas condições específicas de armazenamento. Os dados sugerem que a formação "de novo" do H<sub>2</sub>S é particularmente inibida nos vinhos tintos, mas que pode ser ativada nos brancos e rosés, sendo fortemente acelerada por temperaturas de armazenamento elevadas. Modelos explicativos como a formação do "de novo" atribuem ao cobre um papel importante. Este papel tem sido confirmado por modelos de trabalho com vinhos sintéticos, apresentando precursores de aminoácidos, cobre e alguns polifenóis, conforme é ilustrado na Figura 3.

**Figura 3:** Efeito da presença do cobre no teor total de  $H_2S$  e MeSH numa solução sintética contendo aminoácidos e fenóis do vinho e armazenada em anoxia estrita a  $50^{\circ}C$  (trabalho realizado por Ricardo López e Sandra González).



Estas observações levantam várias questões sobre a utilidade e os riscos das colagens com cobre. Com o objetivo de aprofundar este estudo, foi tratado um vinho tinto jovem afetado por odores desagradáveis, causados pela redução com três dosagens diferentes de cobre, incluindo um adjuvante de colagem com cobre comercial bem conhecido, especificamente concebido para este fim. Os resultados estão resumidos na Figura 4.

**Figura 4:** Colagem com cobre de um vinho tinto jovem afetado por odores desagradáveis de redução. Efeito dos tratamentos nos níveis das formas livres de  $H_2S$  e MeSH (trabalho realizado por Eduardo Vela e Purificación Hernández-Orte).

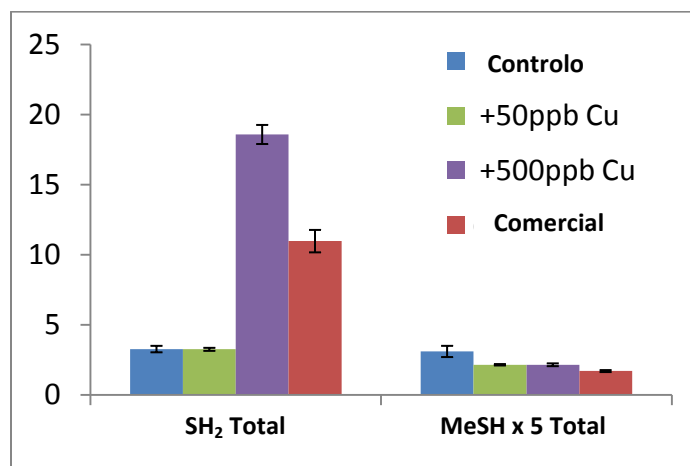


A análise das formas livres revelou a presença de pequenas quantidades de  $H_2S$  e MeSH no espaço de cabeça (*headspace*) do vinho problemático, e confirmou o efeito drástico

exercido pela utilização de qualquer forma de colagem com cobre nestes níveis das formas livres, conforme ilustrado na Figura 4.

A surpresa chegou quando analisamos as formas totais do vinho, após os diferentes tratamentos, com um período de duração de apenas 3 semanas. Estes resultados estão visíveis na Figura 5.

**Figura 5:** Colagem com cobre de um vinho tinto jovem afetado por odores desagradáveis de redução. Efeitos dos tratamentos nos níveis das formas totais de  $H_2S$  e MeSH (trabalho realizado por Eduardo Vela e Purificación Hernández-Orte).



Como mostra a figura, os níveis totais de  $H_2S$  aumentaram fortemente nas amostras tratadas com o adjuvante de colagem comercial (utilizado nas doses recomendadas pelos fornecedores), e no tratamento com elevados níveis de cobre. Os tratamentos não afetaram significativamente os níveis totais de MeSH. Os dois gráficos mostram claramente os benefícios e os potenciais riscos das colagens cúpricas. Por um lado, como mostra a Figura 4, há uma diminuição imediata dos níveis livres, de tal modo que os odores desagradáveis de redução não são percebidos. Por outro lado, como mostram a Figura 5 e a Figura 3, o  $H_2S$  e MeSH não foram realmente removidos do vinho, mas antes mascarados como formas ligadas; pior, as capacidades catalíticas do vinho para produzir de novo o  $H_2S$  e eventualmente o MeSH podem ter sido promovidas. Estes resultados sugerem que os efeitos da colagem cúprica são um pouco como a “roleta russa”.

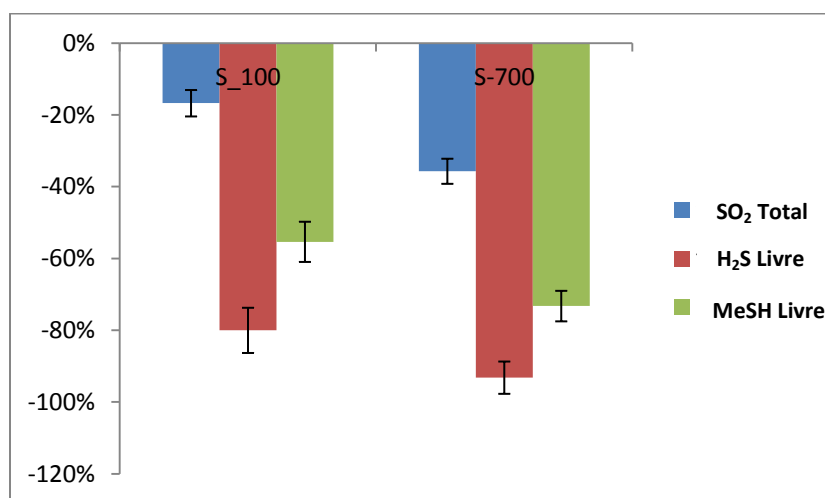
### 8ª DESCOBERTA. Nem todo o oxigénio é igualmente eficiente na remoção do $H_2S$ e dos mercaptanos

De facto, apenas o oxigénio aplicado em doses relativamente baixas e durante períodos de tempo alargados, como as típicas micro-oxigenações prolongadas, são realmente eficientes na remoção do  $H_2S$  e dos mercaptanos. Alguns ensaios preliminares indicam que dosagens de  $O_2$  a 7mg  $O_2/L/mês$  durante um período de 6 meses são necessárias para remover completamente as formas totais de  $H_2S$  e de MeSH dos vinhos tintos (26). Mesmo assim, o MeSH não será completamente eliminado, uma vez que poderá ser

formado continuamente se os sistemas precursores estiverem particularmente ativos. As razões porque são necessários longos períodos de oxigenação, são devidas ao facto de que os complexos formados por H<sub>2</sub>S e MeSH com os metais, nomeadamente com o Cu<sup>2+</sup> mas também com Fe<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> (20), os protegem da ação do O<sub>2</sub>. Como foi anteriormente mencionado, este mecanismo não é unicamente operacional nos vinhos, mas também nos sistemas ambientais (21, 23). As formas complexas não reagem, apenas as formas livres o fazem. E como a maioria das formas do H<sub>2</sub>S e do MeSH são complexas, a eliminação destas pelo oxigénio demora bastante tempo. Apenas pequenas quantidades de O<sub>2</sub> são realmente necessárias; o O<sub>2</sub> incorporado no vinho no processo de arejamento, como a trasfega, provem principalmente do SO<sub>2</sub> libertado pelo vinho oxidado e dos polifenóis do vinho.

Quanto ao papel dos vedantes, não fomos capazes de observar diferenças significativas entre vedantes com diferentes permeabilidades em relação aos níveis de mercaptanos livres ou totais no vinho, embora ainda não tenham sido estudado períodos superiores a 1 ano. É claro que é necessária alguma permeabilidade mínima, e todos os vinhos armazenados em anoxia estrita acumulam H<sub>2</sub>S livre e MeSH. A boa notícia é que os vedantes com algumas diferenças de permeabilidade parecem ser igualmente capazes de manter níveis baixos das formas livres, como mostra a Figura 6.

**Figura 6:** Efeito da permeabilidade do vedante ao O<sub>2</sub> nos níveis de SO<sub>2</sub> total, H<sub>2</sub>S livre e MeSH livre de vinhos armazenados durante um ano com dois tipos de vedantes. Os dados são expressos como a fração (em %), sendo estabelecida a comparação do vinho controlo com o mesmo vinho armazenado em anoxia estrita.



Os níveis de H<sub>2</sub>S total e MeSH não foram afetados pelo oxigénio introduzido através do vedante, sugerindo que o O<sub>2</sub> incorporado através do vedante pode ser suficiente para manter os VSCs livres a níveis baixos, mas não para eliminar as formas ligadas.

## Conclusões

O SH<sub>2</sub> e o MeSH são subprodutos naturais da fermentação e são igualmente subprodutos naturais da degradação de polifenóis metálicos catalisados por aminoácidos de enxofre. Além disso, o SH<sub>2</sub> e o MeSH acumulam-se no vinho formando complexos estáveis com catiões metálicos, nomeadamente com Cu (II), o que significa que as operações de colagem com cobre tradicionais não os removem, apenas ocultam estas moléculas e podem aumentar a capacidade catalítica do vinho para formar mais destes odores indesejáveis. Uma vez formados os complexos, as operações de arejamento tornam-se inúteis na remoção destes compostos. Formas ligadas serão lentamente libertadas quando o vinho é armazenado em anoxia, possivelmente porque nessas condições o Cu (II) é reduzido a Cu<sup>o</sup>. A taxa à qual as moléculas livres são libertadas é proporcional à quantidade de formas ligadas, e inversamente proporcional ao teor de cobre. As ferramentas atualmente mais eficazes para lidar com este problema são a prevenção, a micro-oxigenação prolongada e evitar a utilização de vedantes completamente estanques. Não obstante esta descoberta, a nova compreensão do problema, a capacidade de realizar um diagnóstico correto do problema e o desenvolvimento de ensaios analíticos para avaliar antecipadamente a tendência do vinho a desenvolver odores desagradáveis de redução irão permitir soluções mais seguras e satisfatórias.

## Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Ministério Espanhol da Economia e Competitividade (Projetos AGL2010-230183 e AGL2014-59840). O F. E. recebeu uma subvenção do Governo de Aragón. O financiamento da Diputación General de Aragón (T53) e Fondo Social Europeo foi reconhecido.

## Referências

1. Park, S. K.; Boulton, R. B.; Bartra, E.; Noble, A. C., Incidence of volatile sulfur-compounds in California wines. A preliminary survey. *American Journal of Enology and Viticulture* **1994**, *45*, 341-344.
2. Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J., Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. *Journal of Chromatography A* **2000**, *881*, 569-581.
3. Ugliano, M.; Dieval, J. B.; Siebert, T. E.; Kwiatkowski, M.; Aagaard, O.; Vidal, S.; Waters, E. J., Oxygen Consumption and Development of Volatile Sulfur Compounds during Bottle Aging of Two Shiraz Wines. Influence of Pre- and Postbottling Controlled Oxygen Exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 8561-8570.
4. Ugliano, M.; Kwiatkowski, M.; Vidal, S.; Capone, D.; Siebert, T.; Dieval, J. B.; Aagaard, O.; Waters, E. J., Evolution of 3-Mercaptohexanol, Hydrogen Sulfide, and Methyl Mercaptan during Bottle Storage of Sauvignon blanc Wines. Effect of Glutathione, Copper, Oxygen Exposure, and Closure-Derived Oxygen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 2564-2572.
5. Siebert, T. E.; Solomon, M. R.; Pollnitz, A. P.; Jeffery, D. W., Selective Determination of Volatile Sulfur Compounds in Wine by Gas Chromatography with Sulfur Chemiluminescence Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 9454-9462.

6. Segurel, M. A.; Razungles, A. J.; Riou, C.; Salles, M.; Baumes, R. L., Contribution of dimethyl sulfide to the aroma of Syrah and Grenache Noir wines and estimation of its potential in grapes of these varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 7084-7093.
7. Escudero, A.; Campo, E.; Farina, L.; Cacho, J.; Ferreira, V., Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 4501-4510.
8. Lytra, G.; Tempere, S.; Zhang, S.; Marchand, S.; de Revel, G.; Barbe, J.-C., Olfactory impact of dimethyl sulfide on red wine fruity esters aroma expression in model solution. *Journal International Des Sciences De La Vigne Et Du Vin* **2014**, *48*, 75-85.
9. Segurel, M. A.; Razungles, A. J.; Riou, C.; Trigueiro, M. G. L.; Baumes, R. L., Ability of possible DMS precursors to release DMS during wine aging and in the conditions of heat-alkaline treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 2637-2645.
10. Schutz, M.; Kunkee, R. E., Formation of hydrogen-sulfide from elemental sulfur during fermentation by wine yeast. *American Journal of Enology and Viticulture* **1977**, *28*, 137-144.
11. Jiranek, V.; Langridge, P.; Henschke, P. A., Regulation of hydrogen-sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces-cerevisiae* strains by assimilable nitrogen *Applied and Environmental Microbiology* **1995**, *61*, 461-467.
12. Ugliano, M.; Fedrizzi, B.; Siebert, T.; Travis, B.; Magno, F.; Versini, G.; Henschke, P. A., Effect of Nitrogen Supplementation and *Saccharomyces* Species on Hydrogen Sulfide and Other Volatile Sulfur Compounds in Shiraz Fermentation and Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 4948-4955.
13. Clark, A. C.; Grant-Preece, P.; Cleghorn, N.; Scollary, G. R., Copper(II) addition to white wines containing hydrogen sulfide: residual copper concentration and activity. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2015**, *21*, 30-39.
14. Ugliano, M.; Kwiatkowski, M. J.; Travis, B.; Francis, I. L.; Waters, E. J.; Herderich, M. J.; Pretorius, I. S., Post-bottling management of oxygen to reduce off-flavour formation and optimise wine style. *Australian & New Zealand Wine Industry Journal* **2009**, *24*, 24-28.
15. Viviers, M. Z.; Smith, M. E.; Wilkes, E.; Smith, P., Effects of Five Metals on the Evolution of Hydrogen Sulfide, Methanethiol, and Dimethyl Sulfide during Anaerobic Storage of Chardonnay and Shiraz Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 12385-12396.
16. Bobet, R. A.; Noble, A. C.; Boulton, R. B., Kinetics of the ethanethiol and diethyl disulfide interconversion in wine-like solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1990**, *38*, 449-452.
17. Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D., *Handbook of enology. Vol 2. The chemistry of wine stabilization and treatments*. New York ed.; Wiley & Sons: 2000.
18. B.W., Z. Vol. 18, 1. Control of hydrogen sulfide and mercaptans in wine.
19. Stavin Press, settle and rack wine.
20. Franco-Luesma, E.; Ferreira, V., Quantitative analysis of free and bonded forms of volatile sulfur compounds in wine. Basic methodologies and evidences showing the existence of reversible cation-complexed forms. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1359*, 8-15.
21. Sukola, K.; Wang, F. Y.; Tessier, A., Metal-sulfide species in oxic waters. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *528*, 183-195.
22. Bowles, K. C.; Ernste, M. J.; Kramer, J. R., Trace sulfide determination in oxic freshwaters. *Analytica Chimica Acta* **2003**, *477*, 113-124.
23. Rozan, T. F.; Lassman, M. E.; Ridge, D. P.; Luther, G. W., Evidence for iron, copper and zinc complexation as multinuclear sulphide clusters in oxic rivers. *Nature* **2000**, *406*, 879-882.

24. Luther, G. W.; Rickard, D. T., Metal sulfide cluster complexes and their biogeochemical importance in the environment (vol 7, pg 389, 2005). *Journal of Nanoparticle Research* **2005**, *7*, 713-733.
25. Bianchini, A.; Bowles, K. C.; Brauner, C. J.; Gorsuch, J. W.; Kramer, J. R.; Wood, C. M., Evaluation of the effect of reactive sulfide on the acute toxicity of silver (I) to *Daphnia magna*. part 2: Toxicity results. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2002**, *21*, 1294-1300.
26. Ferreira, V.; Bueno, M.; Franco-Luesma, E.; Cullere, L.; Fernandez-Zurbano, P., Key Changes in Wine Aroma Active Compounds during Bottle Storage of Spanish Red Wines under Different Oxygen Levels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2014**, *62*, 10015-10027.
27. Danilewicz, J. C., Review of Oxidative Processes in Wine and Value of Reduction Potentials in Enology. *American Journal of Enology and Viticulture* **2012**, *63*, 1-10.