

Universidad Nacional de Cuyo
Facultad de Ciencias Agrarias
Facultad de Ciencias Aplicadas a la Industria

**MEDIDAS SANITARIAS PARA PREVENIR EL INGRESO
Y PRODUCCIÓN DE HALOANISOLES EN BODEGAS**

TESIS DE GRADO
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Sandra Patricia Castro

San Rafael (Mendoza), julio de 2015

I

MEDIDAS SANITARIAS PARA PREVENIR EL INGRESO Y PRODUCCIÓN DE HALOANISOLES EN BODEGAS

TESIS DE GRADO
LICENCIATURA EN BROMATOLOGÍA

Tesista: Esp. Brom. Sandra Patricia Castro

Domicilio: Prof. Carlos Benielli 95 Barrio San Rafael -

San Rafael (Mendoza)

Teléfono fijo: (0260)-4431699

Cel.: (0260)-154303762

Correo electrónico: pcastro@fcai.uncu.edu.ar

sandrapatricia.castro@yahoo.com.ar

Directora de Tesis: Dra. Vilma Inés Morata de Ambrosini

Tribunal Evaluador

Presidente: Lic. Adriana Gimenez

Vocales: Ing. Agr. Hugo Galiotti

Lic. Laura Sanchez

Suplente: Ing. Agr. Cora De Diol

RESUMEN

La contaminación del vino con aromas y/o sabores “fúngicos” o “a moho” es un problema grave que puede afectar a cualquier bodega. En una primera instancia se asociaba este fenómeno exclusivamente al corcho y al TCA: 2,4,6-tricloroanisol. Hoy se sabe que dicha contaminación puede aparecer en otros alimentos, además, a este problema contribuyen varios compuestos químicos y diversos factores. El sabor y/o aroma a moho o a humedad del vino es consecuencia de la presencia en el ambiente de ciertos compuestos conocidos como *haloanisoles*, producidos por hongos filamentosos, el más estudiado de estos hongos es el *Trichoderma longibrachiatum*; aunque también han sido encontrados hongos de las especies *Chrysonilia* y *Penicillium*, aislados de la microbiota del corcho, pero capaces de desarrollarse en varios sitios de la bodega.

Estructuralmente, los haloanisoles podrían ser considerados como provenientes del *anisol* (metoxibenceno); derivado metilado del fenol, y como éter que es, forma parte de gran cantidad de mezclas volátiles que presentan olor intenso. Los haloanisoles, por su parte, están formados por moléculas de anisol que contienen por lo menos un átomo de halógeno: Flúor, Cloro, Bromo, Iodo; por ello se denominan fluoroanisoles, cloroanisoles, bromoanisoles y iodoanisoles, respectivamente. Las principales sustancias de olor defectuoso son: 2,4,6-tricloroanisol (TCA); 2,3,4,6-tetracloroanisol (TeCA); 2,3,4,5,6-pentacloroanisol (PCA); 2,4,6-tribromoanisol (TBA). Estos compuestos son producidos por hongos que poseen una enzima que transforma los clorofenoles o bromofenoles (usados como pesticidas o presentes como contaminantes del ambiente) en los haloanisoles correspondientes; este mecanismo universal ha sido elucidado en el hongo *Trichoderma longibrachiatum* y permite explicar la formación y contaminación de haloanisoles sobre cualquier material. Los hongos filamentosos no forman haloanisoles si no entran en contacto con sus precursores, los halofenoles tóxicos de los que se defienden. Para que un vino resulte contaminado se necesitan entonces condiciones óptimas para el crecimiento de hongos filamentosos y entornos adecuados para que estos microorganismos sintetizen haloanisoles. Ambas situaciones pueden darse tanto en el corcho como en algún otro material de la bodega.

Si bien no son tóxicos, los haloanisoles son contaminantes muy importantes capaces de deteriorar las características sensoriales de cualquier vino ya que tienen un umbral de percepción olfativa muy bajo, siendo suficiente una pequeña cantidad de ciertos haloanisoles para que se perciban con claridad tanto en el gusto como en el olfato. Por otra parte, como son muy volátiles, pueden propagarse por medio del aire y adherirse contaminando el corcho, la madera y otros materiales. Estas características hacen que el vino contaminado adquiera sensaciones desagradables que lo convierten en no apto para consumo. El olor a moho o humedad es frecuente en vinos. El problema de la contaminación del vino por haloanisoles es complejo y se debe a múltiples factores, en donde pueden intervenir una o más sustancias con capacidad para producir aromas fúngicos en los vinos. Este inconveniente adquiere mayor importancia a la luz de un mercado cada vez más competitivo y con mayores exigencias en cuanto a las características sensoriales.

El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión bibliográfica de la información disponible relacionada con los hongos filamentosos productores de haloanisoles; su permanencia, desarrollo y la bioquímica de las reacciones de síntesis de haloanisoles, a fin de poder establecer las medidas sanitarias preventivas correspondientes.

PALABRAS CLAVE: haloanisoles, halofenoles, TCA, sabor a corcho, contaminación del corcho, sabor a moho, contaminación con mohos, hongos filamentosos, *Trichoderma longibrachiatum*.

AGRADECIMIENTOS

A la Virgen del Carmen, presente en todos los momentos de mi vida.

A mis dos tesoros: Nicolás y Nelson, por el tiempo concedido.

A mis padres, por enseñarme con el ejemplo.

A mis queridas hermanas: Marty, María Alejandra y Jaquelina, por sus oraciones.

A Daniela, por su amistad y compañerismo, un verdadero regalo de Dios.

A Vilma, a quien aprecio y admiro, por haber aceptado dirigir esta Tesis.

A Stella, Susana y a todas aquellas personas que hicieron posible que el Ciclo de Licenciatura en Bromatología se ofreciera también aquí en San Rafael.

A los Profesores por todo lo que brindaron.

Gracias...

¡Sin ustedes no hubiera sido posible!

*“La vida es una oportunidad,
aprovéchala”.*

Beata Teresa de Calcuta

ÍNDICE

CAPÍTULO I: Introducción

I.1 Importancia de la vitivinicultura en Mendoza	3
I.1.1 La vitivinicultura en el oasis sur: San Rafael y General Alvear	4
I.2 Vino y calidad	6
I.2.1 Factores que afectan la calidad del vino	7

CAPÍTULO II: Marco Teórico

II.1 Los hongos	11
II.1.1 Características	11
II.1.2 Los hongos en el ambiente de la bodega	15
II.1.2.1 Hongos filamentosos de interés	15
II.2 Los agentes causales del deterioro en vinos: Los haloanisoles	20
II.2.1 Estructura química	20
II.2.2 Clasificación	21
II.2.3 Propiedades	21
II.2.4 Los haloanisoles en el vino	23
II.2.4.1 Consecuencias de su presencia	24
II.3 Hipótesis de trabajo	29
II.4 Objetivos	29
II.4.1 Objetivo general	29
II.4.2 Objetivos particulares	30

CAPÍTULO III: Discusión

III.1 Producción de haloanisoles	33
III.1.1 Precursores y biosíntesis: mecanismos probables	33
III.1.2 Precursores y biosíntesis: mecanismo comprobado	45
III.1.2.1 La clorofenol O-metiltransferasa (CPOMT)	47
III.1.2.1.1 Características	47
III.1.3 Soportes para su formación y contaminación	48

CAPÍTULO IV: Conclusiones

IV.1 Conclusiones y recomendaciones generales	61
IV.2 Estrategias de trabajo específicas	63
IV.2.1 Estrategias de trabajo para impedir la contaminación del vino con haloanisoles	64
IV.2.2 Estrategias de trabajo para evitar el desarrollo de hongos en la bodega	67
IV.2.3 Estrategias de trabajo para evitar la síntesis de haloanisoles en la bodega	71

CAPÍTULO V: Bibliografía

ANEXO

A.1 Recomendaciones para el envío de muestras para el análisis de haloanisoles	87
A.2 Productos a utilizar para limpieza y desinfección	90

CAPÍTULO I: Introducción

Medidas sanitarias para prevenir el ingreso y producción de haloanisoles en bodegas

I.1 Importancia de la vitivinicultura en Mendoza

La provincia de Mendoza es la región vitivinícola más importante de Argentina, representando más del 75% de la producción nacional. Sus condiciones naturales como la altitud (entre 500 y 1.500 metros sobre el nivel del mar), aridez, suelos pedregosos y una marcada amplitud térmica entre el día y la noche, son el marco ideal para el cultivo de la vid.

La vitivinicultura en Mendoza comenzó hace más de cuatrocientos años durante la época colonial, cuando los jesuitas comenzaron a cultivar viñedos y crearon los primeros oasis irrigados, que marcaron la geografía de la provincia.

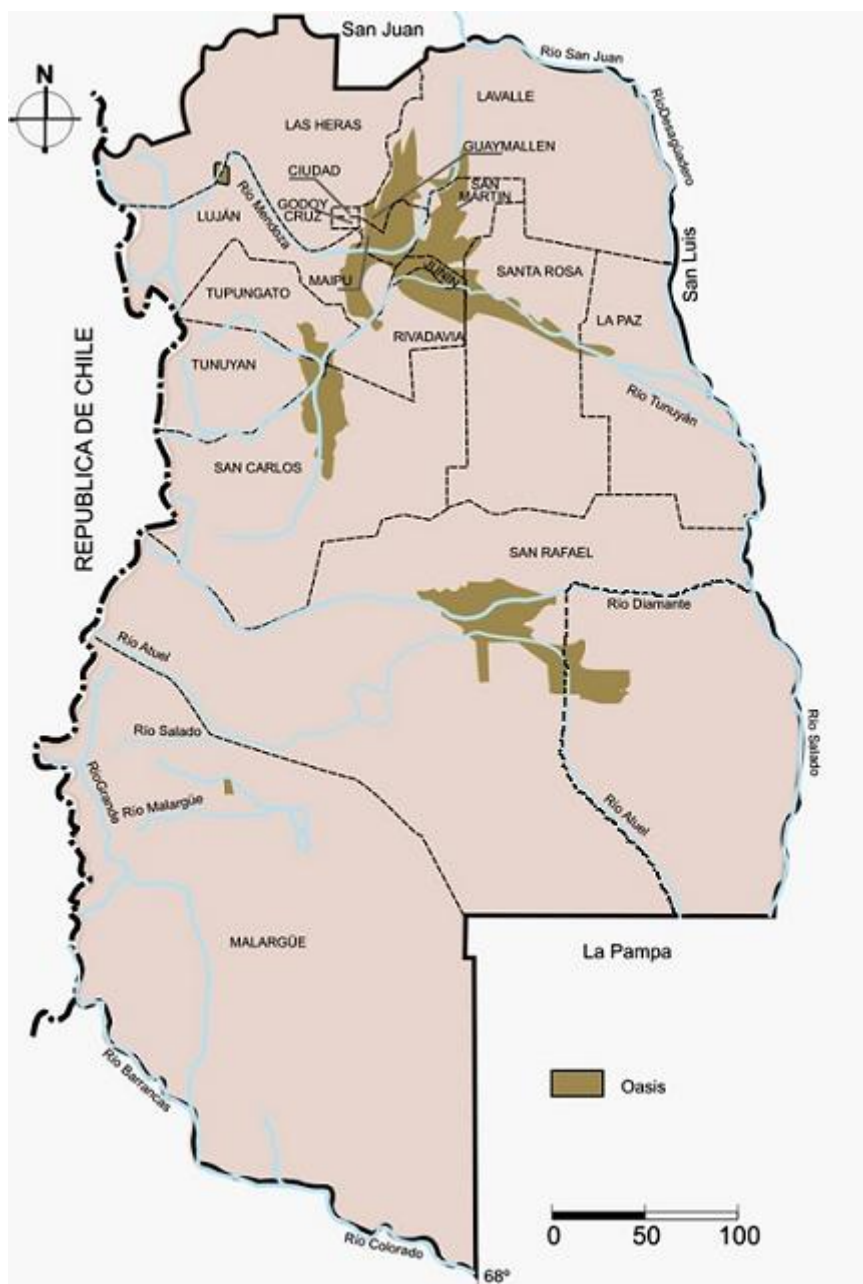


Figura 1: Regiones vitivinícolas de la provincia de Mendoza (Cantarelli, 2010)

Estos oasis, cercanos a los ríos de montaña más importantes y compuestos por departamentos, son los siguientes (Fig. 1):

Región Norte: Lavalle, Maipú, Guaymallén, Las Heras y San Martín.

Región Este: Junín, Rivadavia, San Martín, La Paz y Santa Rosa.

Región Centro Río Mendoza: Luján de Cuyo y Maipú.

Región Valle de Uco: Tupungato, Tunuyán y San Carlos.

Región Sur: San Rafael y General Alvear.

Los principales varietales tintos de alta calidad enológica que componen la oferta de Mendoza son: Malbec, Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah y Bonarda. Mientras, que Chardonnay, Chenin Blanc, Torrontés, Ugni Blanc, Semillón y Sauvignon Blanc, son los cepajes blancos más utilizados para la vinificación (Fundación ProMendoza, 2014).

Mendoza es una zona productiva de vid privilegiada que permite obtener un producto altamente competitivo con una excelente calidad y sabor (Salvalaggio, 2013).

I.1.1 La vitivinicultura en el oasis sur: San Rafael y General Alvear

Compuesta por los viñedos de los departamentos de San Rafael y General Alvear, el área sur está irrigada por los ríos Atuel y Diamante y se ubica al pie de la Cordillera Principal. En cuanto a los sistemas de conducción predomina la espaldera baja (Fig. 2). Se producen vinos de mesa y finos de excelente calidad (Salvalaggio, 2013).



Figura 2: Viñedos en espaldera baja (Región de Cuyo, 2011)

San Rafael se mantiene como uno de los principales productores vitivinícolas del país, y el desarrollo ha sido permanente en los últimos años (Diario San Rafael, 2013).

Entre los distritos más representativos de la vitivinicultura departamental se destacan Cañada Seca, Las Paredes, Real del Padre y Cuadro Nacional.

El competitivo mundo de la vitivinicultura actual exige la máxima calidad en todas las etapas de producción, y ésta comienza con la elección de las plantas apropiadas. El proceso de reconversión registrado en San Rafael derivó en la coexistencia de un incremento de la superficie reconvertida a variedades finas y nuevas plantaciones con la disminución de la superficie cultivada con variedades comunes (Cantarelli, 2010).

Como consecuencia, por primera vez, la Argentina recibió el premio mundial al mejor vino tinto. Se trata de un Malbec de la bodega mendocina Casa Bianchi, ubicada en el sur provincial, en San Rafael, que fue elegido entre más de 3500 caldos de 41 países.

Según los enólogos creadores de este premiado vino nacional, el Famiglia Bianchi Reserva Malbec 2012 (Fig. 3) se destaca por sus aromas a ciruela madura y que seducen por su complejidad e intensidad. Está elaborado con uvas provenientes de parcelas seleccionadas de viñedos propios en San Rafael. Asimismo, a través de un seguimiento de las cepas, se han logrado cosechas de alta calidad que descansaron doce meses en pequeñas barricas de roble, en el corazón de la cava de Casa Bianchi.

Este reconocimiento demuestra el enorme potencial de las uvas de San Rafael, es un premio al trabajo, que aplicado sobre estas uvas permite lograr productos de altísima calidad.

Desde hace una década, el Malbec de esta bodega mendocina ya venía recorriendo un camino importante con varias distinciones y muy avalado por las críticas especializadas (La Nación, 2014).



Figura 3: Famiglia Bianchi Reserva Malbec 2012, mejor vino tinto seco del mundo 2014 (Lecciones de vino, 2014)

I.2 Vino y calidad

El vino es un producto de características particulares. Si bien nunca ha sido considerado como un ser vivo, se entiende como un ente biológico, de gran labilidad, susceptible de proporcionar asentamiento vital a una variada gama de microorganismos. Es, por lo tanto, materia viva que, desde su nacimiento hasta su madurez, sufre una constante evolución (Suárez Lepe & Íñigo Leal, 2004).

El concepto de calidad del vino está ligado principalmente a sus características sensoriales (Cantarelli, 2010). La calidad de un vino se ve afectada por numerosos factores. Muchos aspectos de la calidad de un vino se remontan a características del viñedo. El vino es una expresión de cómo las bayas crecieron y se desarrollaron. Entendiendo los componentes que constituyen la alta calidad de un vino y cómo las prácticas culturales y las decisiones que se toman en el viñedo influyen en éstos, se puede lograr un producto final de excelencia (Bodegas de Argentina, 2013).

Como respuesta a las exigencias y demandas del mercado vitivinícola actual, es necesario cada vez más producir vinos de la mayor calidad posible. La calidad del vino puede ser definida por distintos criterios, estando sujeta a parámetros de evaluación siempre destinados a satisfacer las necesidades de los consumidores.

En muchos casos, la calidad se evalúa a través del análisis sensorial mediante panelistas entrenados que caracterizan los vinos de acuerdo a sus propiedades organolépticas. Luego, estos datos se correlacionan con el gusto de los consumidores o con la aceptación de grupos específicos de consumidores. En este contexto, las técnicas de análisis sensorial han sido ampliamente utilizadas como un complemento en el control de calidad y como herramienta de diagnóstico para caracterizar las diferencias entre los productos.

La identificación y cuantificación de los componentes químicos minoritarios sirve para explicar la descripción sensorial de un vino, y para evaluar su estabilidad, origen y autenticidad y, en consecuencia, su calidad comercial. La relación entre la evaluación sensorial y la composición química del vino es tema de investigación en enología. Los atributos sensoriales del vino no sólo dependen de su composición volátil y de la presencia de compuestos fenólicos. La composición química del vino está relacionada con la variedad y zona de procedencia (Fanzone Sánchez, 2012).

Del vino se espera obtener placer. Este placer está relacionado con las diferentes sensaciones gustativas, táctiles y quemoestésicas (el “picante”, el “efecto frío” o la “astringencia”) producidas durante su consumo. Este conjunto de sensaciones debe estar equilibrado y no debe ser empañado por la presencia de ninguna sensación que no sea

auténtica. Además, durante la degustación, las distintas sustancias químicas presentes en el vino, después de un complejo proceso cerebral, permiten al consumidor poder distinguir y reconocer aromas, sabores, texturas y sensaciones quemoestésicas. Por lo tanto, detrás de la calidad (o de la falta de calidad) de un vino se encuentran un cierto número de componentes odorantes y gustativos, siendo un importante reto para la química determinar su naturaleza y estructura, y comprender el papel que juegan en la percepción final (Ferreira González, 2007).

1.2.1 Factores que afectan la calidad del vino

De acuerdo a su origen, los factores que afectan la calidad del vino pueden clasificarse en:

- Defectos provenientes del viñedo. La calidad de la uva es determinante para la futura calidad del vino.
- Defectos aportados durante la recepción y molienda de la uva. La mayor frecuencia de defectos se atribuye a la presencia de sabor herbáceo.
- Defectos originados en la etapa prefermentativa o fermentativa. El olor a huevo podrido y la aparición de sabor ajerezado y aspecto oxidado ocupan los primeros lugares en la aparición de defectos en esta etapa.
- Defectos que aparecen durante la crianza y conservación. La aparición de sabor ajerezado y aspecto oxidado es el defecto más frecuente. La falta de limpieza de las piletas favorece la aparición de olor a vinagre que podría derivar en picadura acética.
- Defectos que aparecen durante el envejecimiento, en cualquier tipo de vasija. Predomina aquí, como defecto principal el olor a moho. Su presencia se atribuye a compuestos del tipo tricloroanisoles, tetracloroanisoles y tribromoanisoles.
- Defectos originados en los insumos secos. Se consideran como insumos secos botellas, corchos, etiquetas, cápsulas y cajas de cartón (Alturria, *et al.*, 2008).

El ingreso y la producción de haloanisoles en bodegas, y por consiguiente su contaminación al vino, pueden encontrar su origen en todos los factores antes mencionados, aunque en algunos de ellos con mayor incidencia que en otros, como en los defectos de envejecimiento.

La problemática es multicausal: la diversidad de moléculas implicadas, las reducidas cantidades de contaminantes suficientes para ocasionar la alteración de las características

sensoriales y la gran variedad de circunstancias que permiten su contaminación, hacen frecuente este defecto (Chatonnet, 2004).

En todos los casos, cualquiera sea su origen, ocasiona un detrimento de la calidad que hace al producto incompetente en el mercado actual.

Argentina ocupa un importante lugar en el contexto vitivinícola mundial y comienza a posicionarse como un exportador altamente competitivo de los tradicionales países vitivinícolas tales como Francia, España e Italia. La inserción en los mercados internacionales trajo como consecuencia una notable innovación en la vitivinicultura argentina, motivada por la necesidad de adecuarse a las nuevas exigencias de los mercados importadores (INV, 2014). En este marco, resulta fundamental la implementación de las pautas apropiadas que permitan mantener y superar la ubicación alcanzada, de allí la importancia de las medidas sanitarias a emplear.

CAPÍTULO II: Marco Teórico

Medidas sanitarias para prevenir el ingreso y producción de haloanisoles en bodegas

II.1 Los hongos

Los microorganismos son seres vivos microscópicos. El grupo incluye a las bacterias, los hongos, los protozoos, las algas microscópicas y los virus.

Los hongos están contenidos en el reino Fungi, comprenden a las levaduras unicelulares, los hongos filamentosos (mohos) multicelulares y las especies macroscópicas de setas (por ej., champiñones).

La disciplina que estudia a los hongos se denomina micología.

II.1.1 Características

Los hongos son eucariontes, es decir organismos cuyas células poseen un núcleo diferenciado que contiene el material genético (DNA) de la célula, rodeado por una cubierta especial denominada membrana nuclear, entre otras diferencias.

Los más típicos son los hongos filamentosos. Las células de un hongo multicelular están unidas formando túbulos delgados denominados *hifas*. Las hifas suelen ser divididas en unidades multinucleadas por tabiques que presentan orificios, de modo que el citoplasma puede fluir. Estos hongos forman una masa visible denominada *micelio* (Fig. 4), que está compuesto por hifas que se ramifican y entrelazan. Los crecimientos algodonosos que algunas veces se observan en el pan y la fruta son micelios de hongos filamentosos.

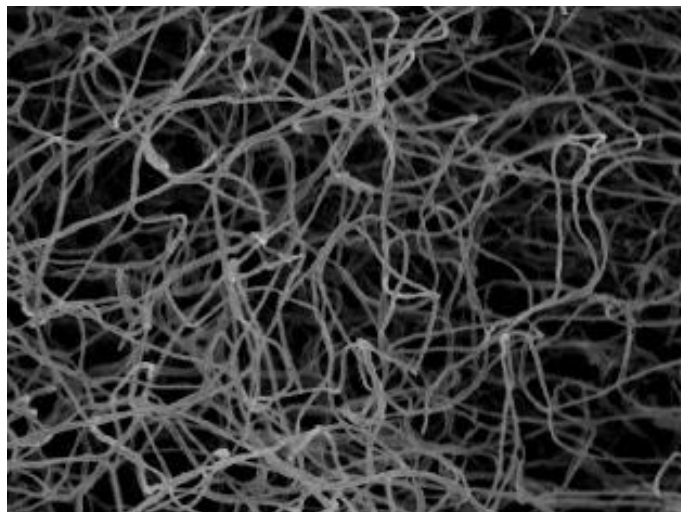


Figura 4: Micelio observado al MEB (Cruz, 2014)

Los hongos se forman a partir de esporas o de fragmentos de hifas.

Para obtener la materia prima para las funciones vitales un hongo absorbe soluciones de materia orgánica de su entorno; sea del suelo, del agua salada, del agua dulce o de un huésped animal o vegetal, a través de su membrana citoplasmática. Todos los hongos son *quimioheterótrofos*, es decir que necesitan compuestos orgánicos como fuente de energía y de carbono. Son aerobios o anaerobios facultativos; sólo se conocen unos pocos hongos anaerobios.

Los hongos multicelulares se identifican sobre la base de su aspecto físico, que incluye las características de las colonias y las esporas reproductivas. En los hongos filamentosos o carnosos, el tallo (cuerpo) está formado por hifas que pueden crecer hasta proporciones inmensas.



Figura 5: Hifas tabicadas con fiálides y macroconidios. Tinción de lactofenol con azul de algodón. 100X (Cruz, 2014)

Las hifas de casi todos los mohos son *tabicadas* (Fig. 5). Pero, en algunas clases de hongos, no contienen tabiques y aparecen como células continuas y largas con muchos núcleos; se denominan entonces *cenocíticas* (Fig. 6).

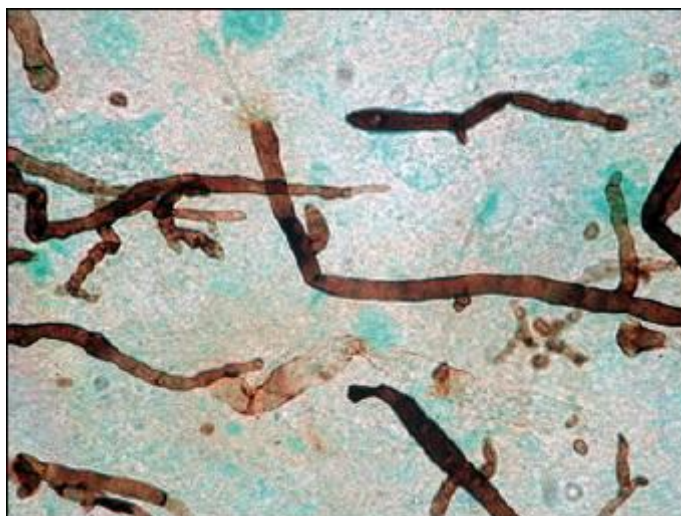


Figura 6: Hifas cenocíticas. 100X (Cruz, 2014)

Las hifas crecen alargándose desde sus extremos. Cada parte de una hifa puede crecer y cuando se desprende un fragmento puede alargarse para formar una hifa nueva.

La porción de una hifa que obtiene nutrientes se denomina hifa *vegetativa*; la porción que participa en la reproducción es la hifa *reproductiva o aérea*, llamada así porque se proyecta sobre la superficie del medio en el que está creciendo el hongo. Comúnmente las hifas aéreas poseen esporas reproductivas. Cuando las condiciones ambientales son convenientes las hifas crecen hasta formar el micelio que es visible a simple vista.

Los hongos filamentosos pueden reproducirse de forma asexual por fragmentación de sus hifas. Además pueden reproducirse mediante la formación de esporas sexuales y asexuales. Después de que un hongo filamentoso forma una espora, la espora se separa de la célula que le dio origen y germina para formar un hongo filamentoso nuevo, es ésta una verdadera espora reproductiva porque a partir de ella crece un segundo organismo. Las esporas se forman a partir de las hifas aéreas de modos diferentes, según la especie. Las esporas asexuales se forman a partir de hifas de un organismo. Cuando estas esporas germinan se convierten en un organismo genéticamente idéntico al que le dio origen. Las esporas sexuales, en cambio, se producen por la fusión de los núcleos de dos cepas de sexo opuesto de la misma especie de hongo, son menos frecuentes que las esporas asexuales. Los organismos que crecen de esporas sexuales tienen las características genéticas de ambas cepas parentales.

Los hongos producen dos tipos de esporas asexuales; la *conidiospora* o *conidio*, una espora unicelular o multicelular que no está encerrada en un saco. Los conidios se producen en una cadena en el extremo de un *conidióforo* (Fig. 7), *Aspergillus* forma este tipo de esporas.

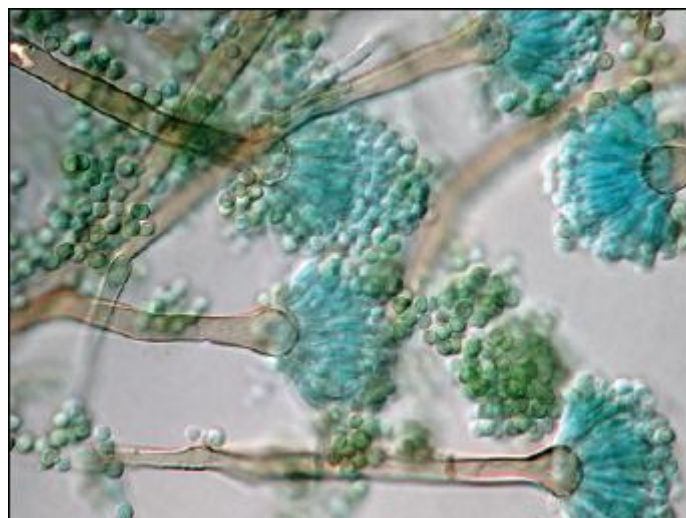


Figura 7: Conidióforos y cabezas conidiales. Tinción de lactofenol con azul de algodón. 100X (Cruz, 2014)

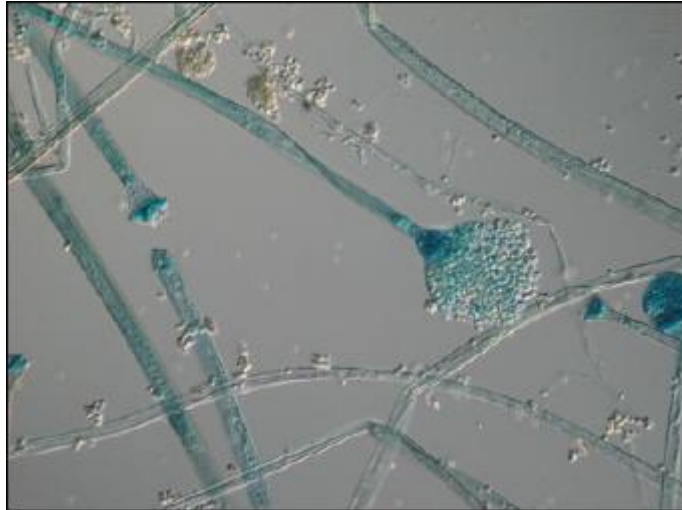


Figura 8: Esporangio y esporangióforo. Tinción de lactofenol con azul de algodón. 100X (Cruz, 2014)

El otro tipo de espora asexual es la *esporangiospora*, formada dentro de un *esporangio*, o saco, en el extremo de una hifa aérea conocida como *esporangióforo* (Fig. 8). El esporangio puede contener centenares de esporangiosporas, el género *Rhizopus* produce este tipo de esporas.

Los hongos suelen adaptarse bien a los ambientes que podrían ser hostiles para las bacterias. Como son quimioheterótrofos, al igual que las bacterias, absorben los nutrientes en lugar de ingerirlos como lo hacen los animales. Sin embargo, los hongos difieren de las bacterias en ciertos requerimientos ambientales y en las siguientes características nutricionales:

- Los hongos suelen crecer mejor en un ambiente con un pH de alrededor de 5, que es demasiado ácido para el crecimiento de la mayoría de las bacterias.
- Casi todos los hongos filamentosos son aerobios. Casi todas la levaduras son anaerobias facultativas.
- La mayoría de los hongos son más resistentes a la presión osmótica que las bacterias; por consiguiente, pueden desarrollarse en concentraciones relativamente elevadas de azúcares o sales.
- Los hongos pueden crecer en sustancias con un contenido muy bajo de actividad acuosa, por lo general menor que las bacterias.
- Los hongos requieren algo menos de nitrógeno que las bacterias para una magnitud equivalente de crecimiento.

- Los hongos a menudo pueden metabolizar carbohidratos complejos como la *lignina* (un componente de la madera), que la mayoría de las bacterias no puede utilizar como nutriente.

Estas características permiten que los mohos se encuentren prácticamente en cada ambiente y puedan ser detectados, tanto en interiores como al aire libre, durante todo el año. Las condiciones húmedas y cálidas favorecen su crecimiento. Al aire libre pueden encontrarse en áreas o lugares húmedos y sombreados, donde hay materiales de desecho, hojas u otro tipo de vegetación en descomposición. En los interiores pueden encontrarse en lugares donde los niveles de humedad son altos como las paredes, maderas y gran diversidad de sustratos, a veces poco apropiados según nuestro parecer (Tortora, *et al.*, 2007).

II.1.2 Los hongos en el ambiente de la bodega

La bodega comprende al conjunto de equipamientos y vasijas vónicas que alojan la cosecha y permiten someterla a las diversas fases de la elaboración de los vinos; se suman a estos componentes las dependencias en las que se llevan a cabo esas tareas.

Las condiciones ambientales óptimas de las distintas partes de las bodegas, varían en función del tipo de trabajo a realizar por las personas y de los mejores entornos para el almacenamiento o crianza de los vinos.

La temperatura y la humedad son los principales factores ambientales que es necesario controlar en los distintos locales de la bodega, pero además se deben tener en cuenta en algunas dependencias, la iluminación necesaria para un adecuado trabajo, la ausencia total de olores extraños, que pueden ser eliminados en algunos casos por una adecuada ventilación, o por el control de los materiales de construcción o de almacenamiento dentro de la bodega (Hidalgo Togores, 2011).

Es factible la presencia de hongos en el ambiente de la bodega. La humedad, la temperatura, la ventilación inadecuada pueden ocasionar su crecimiento e instalación, por eso es fundamental el control de los parámetros citados en las distintas dependencias y fases del proceso de industrialización.

II.1.2.1 Hongos filamentosos de interés

En la uva se pueden desarrollar varios tipos de mohos que entran en la bodega durante la vendimia. Los mohos son microorganismos ubicuos en la bodega y están presentes

tanto en las superficies como en el aire. Los géneros que se encuentran habitualmente en la uva son *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium* y en menor cantidad *Alternaria*, *Cladosporium*. Los mismos géneros mayoritarios se encuentran también en el ambiente de las bodegas.

Uno de los mohos más conocidos es el hongo saprófito *Botrytis cinerea*, que se desarrolla en la uva causando la podredumbre gris, su presencia en la bodega se asocia a la entrada de vendimia contaminada. Este moho se conserva durante el invierno en los sarmientos y en ocasiones en las grietas de la madera y yemas. Las uvas atacadas por *Botrytis* presentan una mayor facilidad para el desarrollo de otros mohos como *Penicillium* y *Aspergillus*. El género *Penicillium* es un hongo capaz de alimentarse de diversos sustratos, lo que le permite desarrollarse en diferentes ambientes. En el vino también se encuentra en la etapa final de la elaboración. Aunque las uvas son el principal vehículo de transmisión de los mohos, es importante tener en cuenta que las esporas de los hongos están en todas partes en la naturaleza, se separan completamente del micelio y son lanzadas para ser transportadas por el aire.

Existen dos posibles orígenes de los mohos en la bodega: la uva y el material de la bodega. Las uvas tradicionalmente se han considerado como la primera fuente de estos microorganismos, pero necesitan de un vector para llegar hasta ellas. Se cree que pueden acceder a los racimos debido al efecto del viento y principalmente insectos como abejas, avispas y *Drosophila* (Garijo Jiménez, 2013).

Si bien las uvas que entran en la bodega tienen una población importante de microorganismos adheridos a la pruina, como levaduras, bacterias y mohos; en el equipamiento de la bodega (tolva, estrujadora, despalladora, depósitos, etc.) también existen estos microorganismos; así las levaduras, bacterias y mohos que se encuentran en contacto con estas superficies pasan al mosto y si las condiciones ambientales lo permiten, comienzan a multiplicarse y a fermentar.

La diseminación de los microorganismos en la bodega ocurre por la maquinaria e instrumental, por los trabajadores, por los insectos y también por el aire. Su supervivencia y su desarrollo están directamente relacionados con las condiciones ambientales (temperatura, humedad, disponibilidad de nutrientes). El aire, por sí mismo, sólo actúa como un medio de transporte o soporte, es una vía de diseminación de microorganismos en el interior de las bodegas. Éstos pueden viajar por el aire de tres formas: adheridos a partículas de polvo, adheridos a gotas de líquido o como partículas individuales. Allí en el aire sufren condiciones de estrés por calor, humedad, luz y falta de nutrientes. En condiciones ambientales adversas predominan en el medio los microorganismos capaces de esporular, porque la esporulación favorece la resistencia a las condiciones adversas (Garijo Jiménez, 2013).

Medidas sanitarias para prevenir el ingreso y producción de haloanisoles en bodegas

En los últimos años se han realizado estudios comparando la calidad ambiental en bodegas y se han evaluado los mohos que se encuentran en el aire. El aire de la zona de embotellado es el de mayor población, tanto desde un punto de vista cuantitativo como cualitativo, lo que convierte a esta zona en mayor riesgo de contaminación del vino a través de este medio. Los mohos presentes en el aire pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Botrytis*. Este último moho, típico “de campo”, sólo se concentra durante los días de entrada de uva en la bodega. Fuera de ese período, los únicos mohos presentes en este ecosistema son *Aspergillus* y *Penicillium*, típicos mohos “de almacén”. Cuando ya no hay actividad microbiana en la bodega y sólo hay vinos almacenados, los mohos más abundantes en el ambiente pertenecen al género *Penicillium* (80 %) (Garijo Jiménez, 2013).

Sin embargo, la invasión de *Penicillium* no es nunca aislada, suele acompañarla *Botrytis*, *Aspergillus* y *Mucor*. El peligro de este moho es su facilidad de penetración por los poros de la madera de los envases, pudiendo inutilizarlos por completo, ya que comunica un olor y sabor a moho inconfundibles (Suárez Lepe & Íñigo Leal, 2004).

Botrytis, *Aspergillus*, y *Penicillium* son los habitualmente descritos en relación con viñedos y bodegas. La preocupación que existe en el sector enológico en relación con los mohos que se desarrollan en las bodegas, se debe a que pueden crecer en las superficies tanto externas como internas de las barricas, así como en los corchos de las botellas, produciendo metabolitos (anisoles, TCA) e incluso micotoxinas (Ocratoxina A, OTA) que pueden alterar la calidad del vino almacenado, provocando en un caso un defecto muy grave y en el otro constituyendo un riesgo para la salud humana. Los principales géneros implicados en este problema son *Aspergillus* y *Penicillium* (Garijo Jiménez, 2013).



Figura 9: Microfotografía del hongo filamentososo *Aspergillus niger* (Palacios García & San Román, 2014)

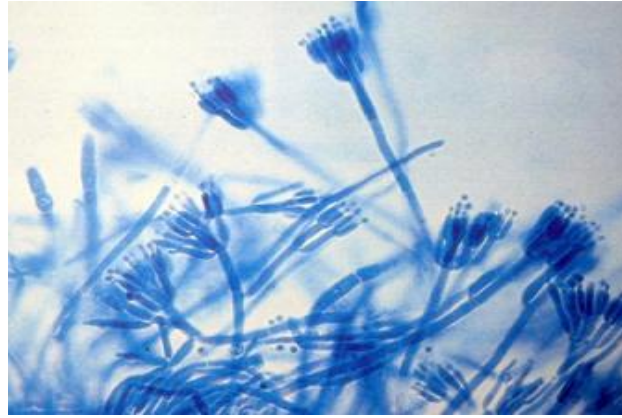


Figura 10: Microfotografía del hongo filamentoso *Penicillium italicum* (Palacios García & San Román, 2014)

Otros hongos de importancia son los pertenecientes al género *Trichoderma*, siendo *Trichoderma longibrachiatum* el más estudiado. Presentan hifas tabicadas hialinas, conidióforos, fiálides (estructura en forma de botella, ubicada en el extremo de un conidióforo, sobre la cual se producen las esporas) y conidios (Fig.11) (Feltre Martínez, 2009).

La mayoría de las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, y visto al microscopio es fino (Infante, *et al.*, 2009).

T. longibrachiatum puede producir clamidosporas (tipo especial de espora asexual con paredes gruesas y adaptada para la resistencia a condiciones adversas) y sus conidióforos adoptan una disposición piramidal. Los conidios tienen unos 3 μm de diámetro, son elipsoidales y de superficie lisa (Figs. 11 y 12) (Feltre Martínez, 2009).

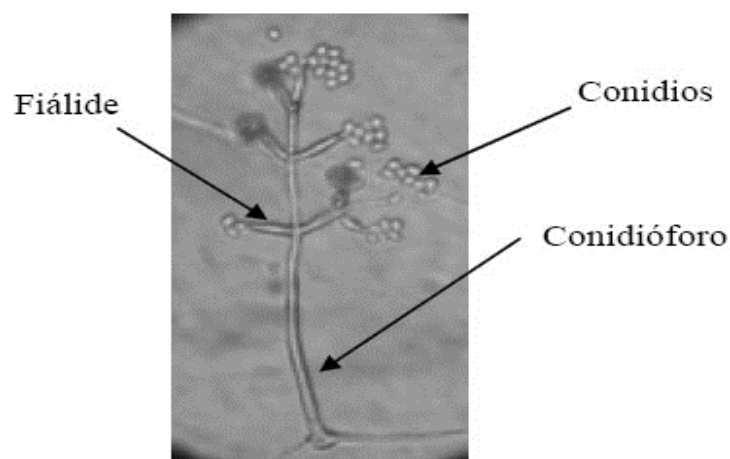


Figura 11: Conidios y conidióforos de *Trichoderma* sp. 400X (Infante, *et al.*, 2009)

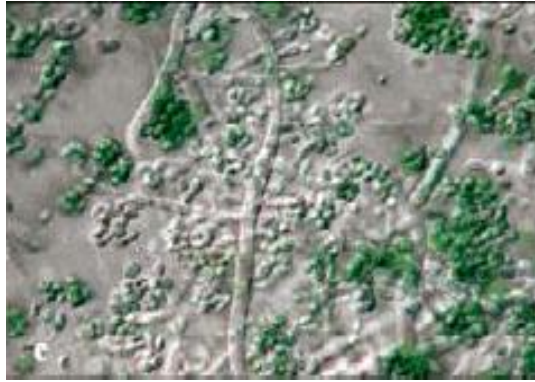


Figura 12: *Trichoderma longibrachiatum*, disposición triangular de las ramas del conidióforo, fiálides y conidios elipsoidales. 100X (Cruz & Piontelli, 2011)



Figura 13: *Trichoderma longibrachiatum* observado al microscopio (Rubio Coque, 2010)

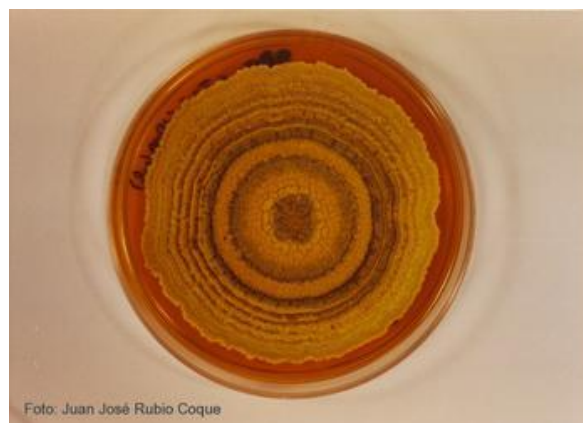


Figura 14: *Trichoderma longibrachiatum* creciendo en una placa de Petri (Rubio Coque, 2010)

Las especies pertenecientes al género *Trichoderma* se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, los cuales son capaces de descomponerla y en determinadas condiciones pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Se encuentran presentes en todas las latitudes, desde las zonas polares hasta la ecuatorial. Estas características están estrechamente relacionadas con la alta capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos, un metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos (Infante, *et al.*, 2009).

El género *Trichoderma* es actualmente reconocido como microorganismo seguro o GRAS (Generally Recognized As Safe), ya que su producción de micotoxinas es prácticamente nula (Feltre Martínez, 2009). Algunas de sus especies son utilizadas para separar isómeros ópticos en la producción de mentol, producen lactonas que se usan ampliamente en la industria como saborizantes y están caracterizados por su agradable olor y sabor; además, se usan comercialmente para producir la enzima celulasa, que se utiliza para elaborar jugos de fruta límpidos mediante la degradación del contenido de pared celular vegetal (Tortora, *et al.*, 2007).

II.2 Los agentes causales del deterioro en vinos: Los haloanisoles

II.2.1 Estructura química

Los éteres son compuestos orgánicos de fórmula general: **R-O-R**, **Ar-O-R** o **Ar-O-Ar**, los dos grupos unidos al oxígeno pueden ser alquílicos o aromáticos o su combinación. Si los dos grupos son idénticos, se dice que el éter es *simétrico*; si son diferentes, es *asimétrico*.

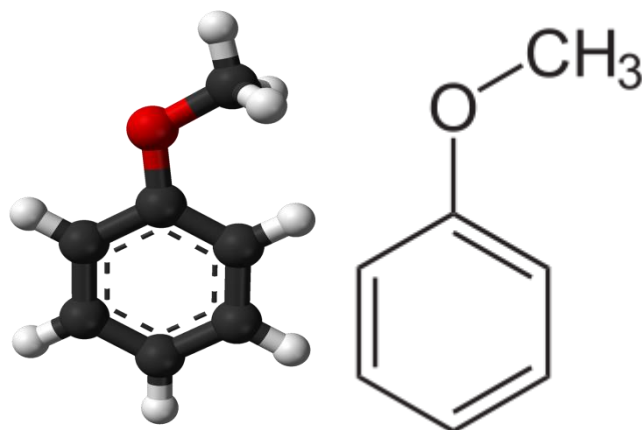


Figura 15: Estructura del anisol: modelo molecular y fórmula estructural (Morrison & Boyd, 1990)

El más simple de los éteres asimétricos aril alquílicos es el metil fenil éter, que tiene el nombre especial de *anisol*, también conocido como *metoxibenceno* (Fig. 15) (Morrison & Boyd, 1990).

Los *haloanisoles* están formados por moléculas de anisol con al menos un átomo de alguno de los cuatro halógenos que existen sustituyendo un hidrógeno en el anillo aromático.

II.2.2 Clasificación

De acuerdo al halógeno presente: flúor (F), cloro (Cl), bromo (Br) o yodo (I); los compuestos resultantes se denominan respectivamente fluoroanisoles, cloroanisoles, bromoanisoles y yodoanisoles (Fig. 16) (Feltre Martínez, 2009).

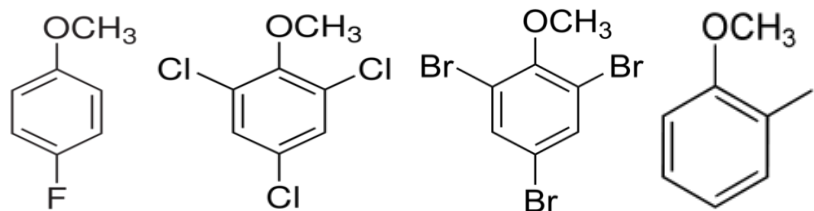


Figura 16: De izquierda a derecha, 4-fluoroanisol; 2,4,6-tricloroanisol; 2,4,6-tribromoanisol; y 2-yodoanisol (Feltre Martínez, 2009)

II.2.3 Propiedades

Debido a que el ángulo del enlace **C-O-C** no es de 180°, los momentos dipolares de los dos enlaces **C-O** no se anulan; por eso los éteres presentan un pequeño momento dipolar neto.

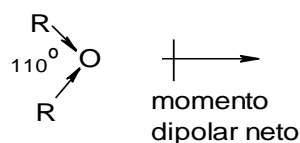


Figura 17: Momento dipolar de los éteres (Morrison & Boyd, 1990)

Esta débil polaridad no afecta apreciablemente los puntos de ebullición de los éteres, que son similares a los de los alcanos de masas molares comparables y mucho más bajos que los de los alcoholes isómeros. Los puentes de hidrógeno que mantienen unidas de forma firme a las moléculas de alcoholes no se dan para los éteres, ya que sólo tienen hidrógeno unido a carbono.

Por otra parte, presentan una solubilidad en agua comparable a la de los alcoholes, que se debe a los puentes de hidrógeno entre moléculas de agua y de éter (Morrison & Boyd, 1990).

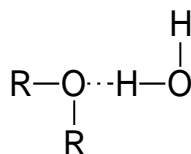


Figura 18: Enlace puente de hidrógeno entre una molécula de éter y una molécula de agua (Morrison & Boyd, 1990)

Como éter que es el anisol conserva algunas de las propiedades de éstos, mientras que otras se ven influenciadas por la presencia del anillo aromático; resulta importante observar su potencia tóxica (Tabla 1).

Estado de agregación:	líquido
Apariencia:	Líquido incoloro a amarillento, de olor característico
Masa molar (M):	108,1 g/mol
Punto de fusión:	-37 °C
Punto de ebullición:	155 °C
Densidad relativa (agua=1):	0,99 g/cm ³
Solubilidad:	Insoluble en agua, soluble en alcohol y éter
DL₅₀ oral en ratas:	3.700 mg/kg (ligeramente tóxico)

Tabla 1: Propiedades del anisol (Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2003)

La estructura química del anisol, forma parte de un gran número de moléculas volátiles y frecuentemente odoríferas. Estas diversas moléculas están muy presentes en la naturaleza, y en especial en el entorno vinícola. La sustitución en el núcleo anisol por átomos de cloro o de bromo para originar haloanisoles da lugar a la formación de una molécula con propiedades organolépticas particulares. En el contexto vinícola, estas moléculas se caracterizan en concreto por olores desagradables, que recuerdan el carácter “mohoso”. Además, en su mayoría presentan umbrales relativamente reducidos de detección olfativa (Chatonnet, 2004).

Los haloanisoles (cloroanisoles y bromoanisoles) reconocidos como los enemigos más importantes del vino son: 2,4,6-tricloroanisol (2,4,6-TCA, o TCA, que es el más estudiado), 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA, o TeCA), pentacloroanisol (PCA) y 2,4,6-tribromoanisol (2,4,6-TBA, o TBA).

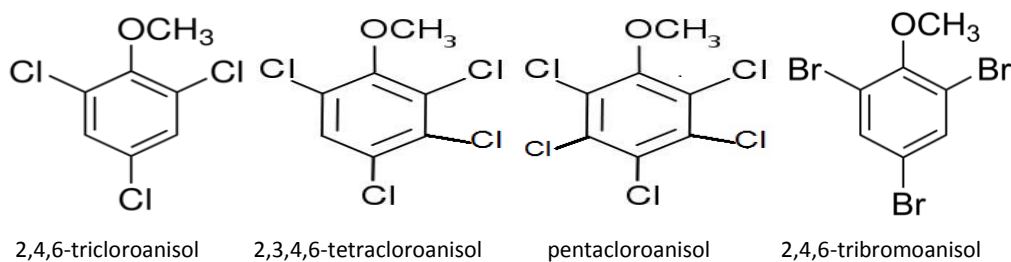


Figura 19: Estructuras de haloanisoles de mayor importancia (Rubio Coque, *et al.*, 2005)

Compuesto	Umbral de Percepción
2,4,6-TCA	En solución acuosa: 30 – 300 µg/L. En solución alcohólica (vino): 1,5 – 3 ng/L
2,3,4,6-TeCA	En solución acuosa: 4 ng/L. En solución alcohólica (vino): 10 – 15 ng/L en vinos tranquilos; 5 ng/L en vinos espumosos
PCA	Compuesto poco oloroso: > 50 µg/L
2,4,6-TBA	En solución acuosa: 8 – 30 µg/L. En solución alcohólica (vino): 3,4 ng/L

Tabla 2: Umbrales de percepción de los principales haloanisoles implicados en la contaminación del vino (Rubio Coque, *et al.*, 2005)

Los olores desagradables que producen los haloanisoles han sido descritos como fúngicos o a moho (olores mohosos) o como olores y aromas propios de humedad; pero cuando la concentración de TBA es particularmente elevada se pueden percibir además aromas iodados o fenólicos. Otra propiedad significativa de estos compuestos es el hecho de que una muy pequeña cantidad se aprecia con claridad a través de gusto y olfato (Tabla 2). Hay que agregar también que generalmente son muy volátiles, capaces de transmitirse a través del aire y con una gran facilidad para adherirse y contaminar la madera, el corcho y otros materiales (Rubio Coque, *et al.*, 2006).

II.2.4 Los haloanisoles en el vino

En los vinos, los olores con carácter mohoso son uno de los defectos sensoriales más desagradables y más severamente juzgados tanto por catadores expertos como por los consumidores.

Las características físico-químicas de los haloanisoles explican que pese a sus puntos de ebullición, se pueden encontrar fácilmente en las atmósferas que contienen fuentes de emisión de dichas moléculas. Todos los contaminantes en cuestión tienen una hidrofobia similar ($\log P$, coeficiente de reparto octanol-agua, indica el carácter hidrófilo o hidrófobo de una sustancia), la mayor presión de vapor saturado de TeCA explica la facilidad de contaminación. El valor de la presión de vapor saturado de un líquido, da una idea clara de su

volatilidad, los líquidos más volátiles tienen una presión de vapor saturado más alta (Tabla 3). El TBA, volátil y maloliente pasa fácilmente al aire. El vino manipulado en ese ambiente puede disolver los contaminantes presentes en la fase gaseosa, o contaminarse indirectamente por contacto con los materiales porosos ya contaminados con los que está en contacto directo (madera de las barricas) (Chatonnet, 2004).

Otra característica importante a destacar, en particular del TCA, es que es un compuesto inocuo, inofensivo; su presencia en los vinos genera un deterioro en el aspecto sensorial lo que provoca que no puedan ser consumidos, pero no implica toxicidad alguna.

Molécula	Punto de Ebullición °C 760 mm Hg	Punto de Fusión °C 760 mm Hg	Presión de vapor 10 ⁻³ mm Hg	Log P octanol/ agua	Solubilidad en agua mg/L	Cte. de Henry
TCA	241	61	0,228		10,0	130,000
TBA	298	88	0,644	3,69	1,0	20,200
TeCA	-	84	3,190	4,18	1,4	96,100
PCA	-	108	0,592	4,09	0,4	1930,00

Tabla 3: Características físico-químicas de los haloanisoles (Chatonnet, 2004)

II.2.4.1 Consecuencias de su presencia

A lo largo de la historia de la humanidad se han propuesto numerosas clasificaciones de los diferentes olores. El intento más antiguo se lo debemos al filósofo Platón, quien clasificó los olores en agradables y desagradables. De acuerdo a esta clasificación, el 2,4,6-TCA es una sustancia con olor desagradable; disuelto en agua pura (insípida e inodora) es fácilmente reconocible por su olor mohoso a partir de una concentración umbral, más alta en la población en general (8-9 ng/L), que en catadores entrenados (3-4 ng/L). La presencia de concentraciones elevadas por encima del umbral arruina las características sensoriales del vino. Para comprender el efecto completo de esta sustancia sobre el vino, es conveniente hacer un breve repaso del funcionamiento del sentido del olfato.

Todo receptor sensorial debe ser considerado como un transductor de energía, es decir, una estructura que capta un determinado estímulo y convierte su energía natural en cambios de potencial eléctrico en la membrana plasmática de la célula receptora, éste es el “lenguaje” que utiliza nuestro sistema nervioso. Los receptores olfatorios pertenecen al gran grupo de los quimiorreceptores, que informan al sistema nervioso central acerca de la presencia en el medio de determinadas sustancias químicas. Así, el olfato es un sistema de

detección química de sustancias volátiles, presentes en el aire respirado y que, a diferencia de otros quimiorreceptores, da lugar a una serie de sensaciones conscientes.

Los receptores olfatorios son neuronas diferenciadas, localizadas en la parte superior de la cavidad nasal, en el epitelio olfatorio, cuya superficie está cubierta de mucus. Las células de este epitelio tienen una serie de cilios que son el lugar en el que se lleva a cabo la interacción entre las moléculas de la sustancia odorífera y la neurona receptora. Estas neuronas tienen un axón, relativamente corto, que asciende y penetra en el interior del cráneo a través de la lámina cribosa del hueso etmoides, y hace sinapsis con neuronas secundarias de la vía olfatoria en los denominados bulbos olfatorios, parte ya del encéfalo. El conjunto de axones de estas neuronas forman el nervio olfatorio (Fig. 20).

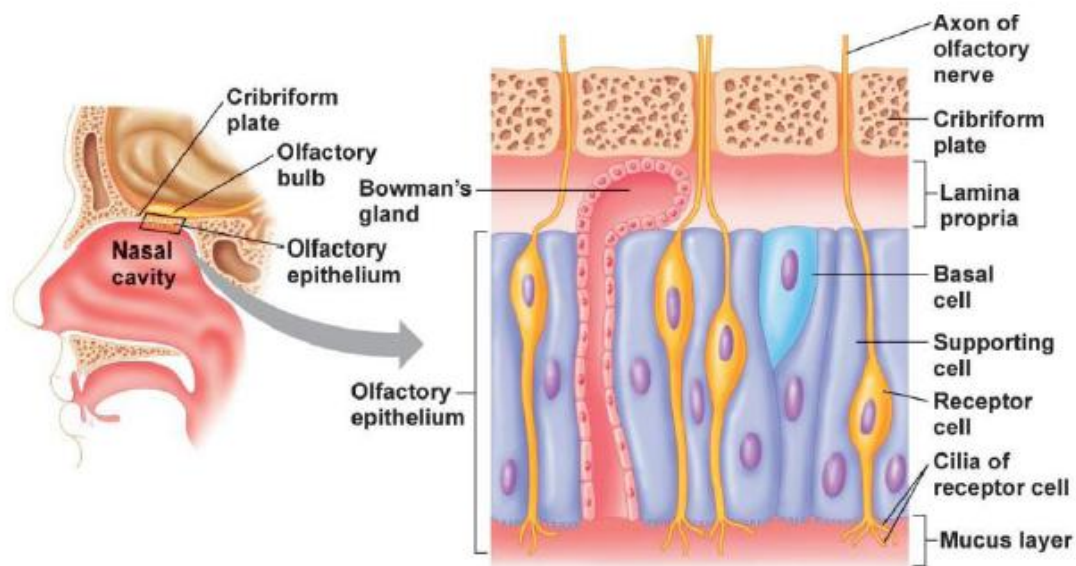


Figura 20: Esquema de la localización y ultra estructura del epitelio olfatorio en humanos

(Palacios García & San Román, 2014)

En la membrana de los cilios, estas neuronas poseen una gran variedad de receptores de membrana, proteínas que reconocen de manera específica las diferentes sustancias odoríferas. Luego de la unión de la molécula con su receptor, se desencadenan fenómenos de señalización intracelular, que se inician por activación de una proteína G heterotrimérica, que a su vez es responsable de la activación de la adenilil ciclasa, una enzima ligada a la membrana, que cataliza la síntesis del mensajero intracelular AMP cíclico (cAMP) a partir de ATP. Sigue ahora el proceso de transducción que consiste en la unión de este cAMP con la porción

intracelular de canales catiónicos inespecíficos, conocidos como CNG (Cyclic Nucleotides – Gated Channels), promoviendo su apertura.

Aunque hay muchas dudas acerca de las concentraciones extracelulares de cationes en el mucus que recubre los cilios, la apertura de estos canales CNG implica necesariamente la entrada a la célula de cargas positivas, en forma de iones Na^+ , Ca^{2+} y K^+ que en su conjunto, van a provocar la despolarización de la membrana plasmática. Secundariamente, la entrada de Ca^{2+} provoca un incremento de la concentración citosólica de este catión, que será ahora capaz de unirse y activar a otro tipo de canales, en este caso aniónicos, los CACC (Calcium – Activated Chloride Channels), por lo cuales saldrá Cl^- ; esta salida de cargas negativas contribuye también a la despolarización de la membrana. Si la despolarización de la membrana de los cilios es lo suficientemente intensa, la neurona olfatoria producirá potenciales de acción, que se propagarán sin disminución a través de toda la membrana plasmática, incluyendo la del axón, enviando así el correspondiente mensaje al sistema nervioso central e informándole de la presencia de esa sustancia odorífera en la cavidad nasal (Palacios García & San Román, 2014).

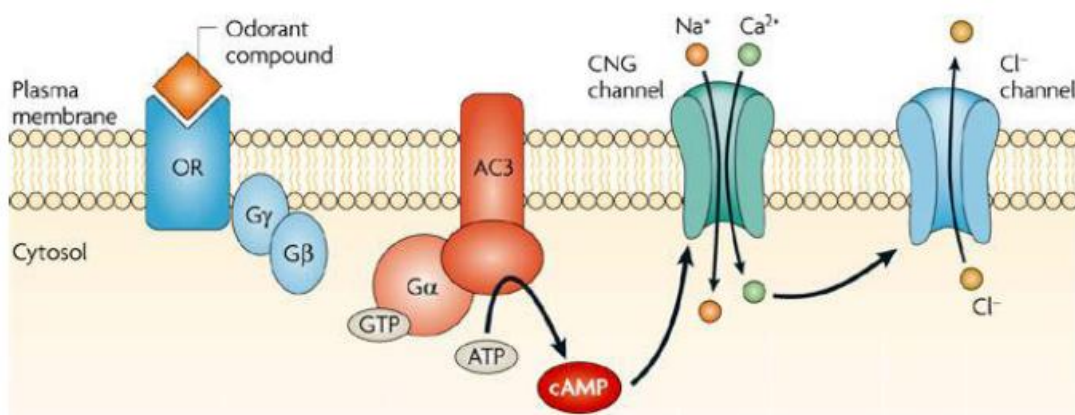


Figura 21: Esquema del proceso de transducción sensorial en receptores olfatorios
(Palacios García & San Román, 2014)

Existe un cambio radical en la forma en la que debemos considerar las acciones del 2,4,6-TCA sobre el sentido del olfato. Utilizando como modelo experimental neuronas olfatorias de salamandra, cuyo tamaño es muy superior a las de los mamíferos, lo que facilita su manejo en el laboratorio y métodos electrofisiológicos (técnica de patch – clamp, “pinzamiento de membrana”), se ha puesto de manifiesto que hay un potente efecto inhibitorio del 2,4,6-TCA sobre el flujo de cationes a través de los canales CNG, que se mantiene durante cerca de un minuto tras la exposición a esta sustancia. Este efecto implica, por lo tanto, que

esta molécula no sólo da lugar a sensaciones olfatorias desagradables al interactuar con algunas neuronas olfatorias, sino que además da como resultado general una inhibición de la transducción olfatoria en todos los demás receptores. Entonces, el 2,4,6-TCA dificulta, de forma transitoria, nuestra capacidad para detectar, por medio del olfato, la presencia de otras sustancias volátiles en la cavidad nasal. En presencia de moléculas de 2,4,6-TCA éstas se unen a sus receptores específicos en las neuronas olfatorias, pero en esa unión no produce el flujo de cationes a través de los CNG lo suficientemente intenso como para convertirse en señales nerviosas. Nuestro sistema nervioso central no recibe ninguna información acerca de la presencia de otra sustancia si al mismo tiempo está actuando el 2,4,6-TCA sobre los CNG, se induce un estado transitorio de “ceguera olfatoria”.

Los fenómenos de “inhibición cruzada” son frecuentes en muchos sistemas sensoriales, por ejemplo en el tacto o la visión, pero su existencia en el sentido del olfato no había sido descrito hasta muy recientemente.

Las acciones inhibitorias del 2,4,6-TCA sobre los GNC se ejercen de manera significativa a concentraciones bastante inferiores a los límites de detección de esta sustancia, no sólo en la población general, sino también en los expertos entrenados. Se han detectado respuestas inhibitorias a concentraciones tan bajas como un aM (attomolar = 10^{-18} mol/dm³; 10^{-15} mol/m³). Además, el efecto del 2,4,6-TCA es dependiente de su concentración, logrando inhibiciones muy marcadas de la actividad de los CNG a concentraciones elevadas. Esto puede explicar, al menos de forma parcial, porqué los vinos contaminados con anisoles, al mismo tiempo de parecer neutros en cuanto a aromas, no huelen más que a humedad o a moho, desapareciendo por completo cualquier otro aroma positivo, como los recuerdos a fruta o a madera tostada. Esto implica que el 2,4,6-TCA, a concentraciones a las que su presencia no resulta detectable por el olfato humano, es capaz ya de inhibir la sensibilidad olfatoria a otras sustancias diferentes y, por lo tanto, no es difícil imaginar las consecuencias que esto puede tener al momento del consumo de un vino contaminado con pequeñas concentraciones. Existen referencias bibliográficas en las que se describe este efecto negativo de bajas concentraciones de anisoles en vinos, en los que gran parte de sus aromas característicos parecen haber desaparecido.

El 2,4,6-TCA ejerce un efecto supresor mucho más potente sobre los canales CNG (100 – 1000 veces más) que otros agentes que funcionan como enmascarantes olfativos muy conocidos y ampliamente usados en perfumería, como el geraniol. Esto puede explicar el aroma potente y embriagador que desprenden algunos vinos de la variedad Moscatel, ricos en geraniol.

Debido al carácter lipofílico del 2,4,6-TCA (cuantificado por su coeficiente de reparto en octanol/agua a pH 7,4) y a que la cinética de su efecto inhibitor no se ajusta a una ecuación de Michaelis – Menten, sino a una regresión logarítmica, se deduce que el efecto sobre los CNG está mediado por la inclusión del 2,4,6-TCA en la bicapa lipídica de las membranas plasmáticas de las células receptoras, desde donde, de alguna forma se altera la conductancia y/o el mecanismo de compuerta de los CNG.

Es importante aclarar que son demasiadas las diferencias interespecíficas como para asumir que los efectos del 2,4,6-TCA observados en las neuronas olfatorias de un anfibio son directamente extrapolables a nuestra especie. Serán necesarias entonces más investigaciones para elucidar la eventual implicación de este fenómeno en el olfato humano (Takeuchi, *et al.*, 2013).

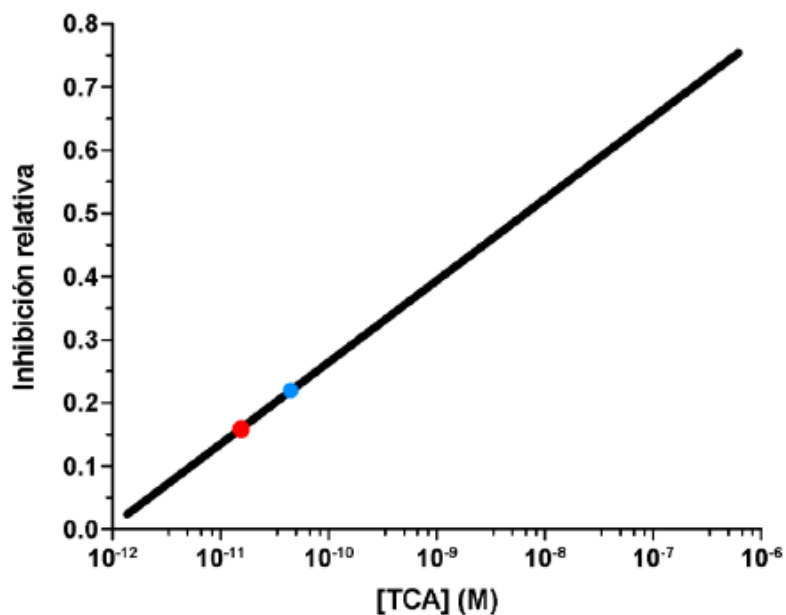


Figura 22: Medidas de intensidad de corriente eléctrica y efecto supresor por la molécula de TCA sobre receptores olfatorios de salamandra. El punto rojo indica el umbral de detección olfatoria típico en catadores entrenados, y el punto azul el de la población en general (Takeuchi, *et al.*, 2013)

De todos los órganos de los sentidos, el olfato se distingue por la eficacia con la que se adapta al estímulo. Esto se debe a que, cuando las células olfatorias se han “acostumbrado” (fenómeno de adaptación de los receptores sensoriales) a la presencia de una determinada

molécula odorífera, disminuyen paulatinamente su respuesta, hasta que cesan de transmitir al cerebro la información sobre su presencia. Esta capacidad para dejar de percibir un olor puede constituir una limitación muy importante para el descubrimiento de una eventual contaminación en la bodega. En el caso de estar sometidos de forma continua al impacto de una atmósfera contaminada por 2,4,6-TCA, dicha molécula va a conseguir con su constante presencia una adaptación del sentido del olfato, no emitiéndose señales que avisen de su presencia, por lo que pasará desapercibida sin emitir señales de alarma que nos obliguen a corregir el grave problema que sufre el ambiente de la bodega. Esto se debe a que la percepción olfativa de ciertos agentes químicos puede estar alterada por contactos previos a los mismos, desarrollándose tolerancia cuando la exposición a un producto hace que disminuya la respuesta a exposiciones posteriores. En resumen, el 2,4,6-TCA consigue que nos acostumbremos a su presencia sin molestarnos.

La presencia de contaminantes en la bodega constituye un serio problema que puede afectar a la calidad de los vinos. Debido a su condición hidroalcohólica, el vino absorbe muy fácilmente cualquier contaminante capaz de volatilizarse a bajas temperaturas y viajar por la humedad relativa. La concentración de sustancias de olores desagradables en materiales albergados en una atmósfera contaminada puede aumentar con el tiempo, y nuestro sistema sensorial olfativo no nos permite detectar el problema, por lo que se hace necesario un estricto control ambiental de los lugares sensibles de la bodega (Palacios García & San Román, 2014).

II.3 Hipótesis de trabajo

Es posible minimizar la contaminación del vino con haloanisoles implementando medidas sanitarias tanto en materiales que ingresan a la bodega: corchos, maderas; como en la atmósfera, tierras de filtración, placas de filtración.

II.4 Objetivos

II.4.1 Objetivo general

- Recopilar información a fin de identificar y proponer medidas sanitarias tendientes a impedir la contaminación de vinos con haloanisoles.

II.4.2 Objetivos particulares

- Identificar y proponer estrategias de trabajo que eviten el desarrollo de hongos filamentosos en el ambiente general de la bodega, en base al conocimiento de las condiciones que lo favorecen.
- Identificar y proponer estrategias de trabajo que eviten la síntesis de haloanisoles por hongos filamentosos (*Trichoderma longibrachiatum*), en base a las condiciones necesarias para que éstos se produzcan.

CAPÍTULO III: Discusión



Medidas sanitarias para prevenir el ingreso y producción de haloanisoles en bodegas

III.1 Producción de haloanisoles

III.1.1 Precursores y biosíntesis: mecanismos probables

Se han propuesto distintos mecanismos de reacción a fin de dar explicación al origen de los haloanisoles. El estudio se ha centrado principalmente en torno al 2,4,6-TCA. Los hipotéticos mecanismos para su formación son los siguientes:

- 1- **Catabolismo de fenoles altamente clorados.** El pentaclorofenol (PCP) y el 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-TeCP), son muy tóxicos, su metilación seguida de deshalogenación para dar anisoles, sería un método de detoxificación (Feltre Martínez, 2009).

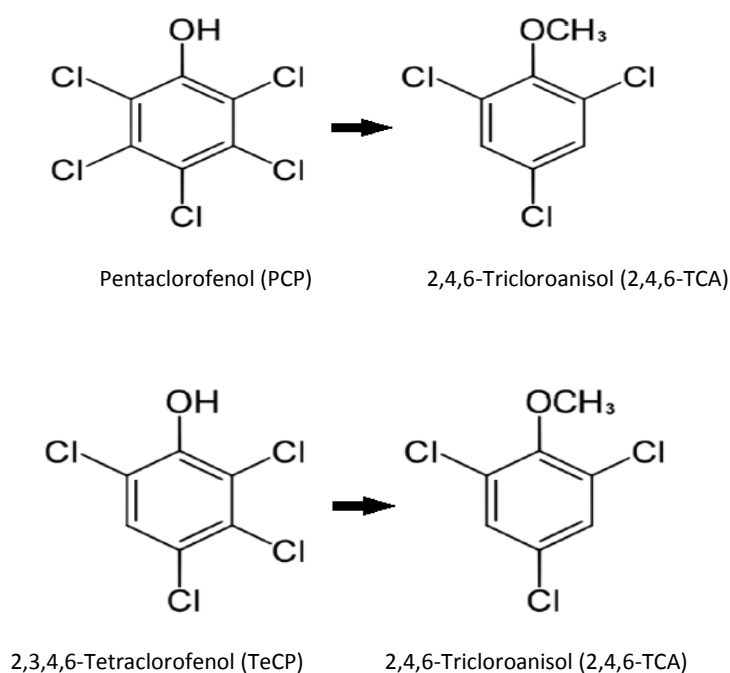


Figura 23: Producción de 2,4,6-Tricloroanisol a partir de Pentaclorofenol y 2,3,4,6-Tetraclorofenol (Feltre Martínez, 2009)

El pentaclorofenol es un compuesto producido mediante síntesis química, por cloración de fenol. Ya en 1936 se producía a escala industrial y se estima que en el año 1970 se producían anualmente 100.000 toneladas a nivel mundial, un 25 % de las cuales se manufacturaban en USA, donde era uno de los plaguicidas más utilizados. Por su efectiva acción tóxica se empleó como biocida de amplio espectro, para preservación de la madera y como aditivo en pinturas, solventes y

barnices. Posteriormente a su utilización masiva se descubrió su toxicidad sistémica al alcanzar concentraciones en sangre y orina de humanos por encima de 1 ppm, niveles que se podían superar principalmente a través de la ingestión de alimentos contaminados y por exposición. Desde el año 1984, la adquisición y el uso del pentaclorofenol se limitó a personas autorizadas, pero debido a su uso generalizado durante los años anteriores es hoy un contaminante que se encuentra repartido en tierra, agua, aire y en todo tipo de organismos vivos, ya que por su estabilidad se acumula en los todos los hábitats. En la actualidad el uso de pentaclorofenol está muy restringido, pero sigue estando autorizado en instalaciones industriales (no permitiéndose sus emisiones en cantidades superiores a las indicadas por la legislación vigente), para el tratamiento de maderas que no vayan a ser utilizadas en establecimientos o contenedores de uso alimentario, como impregnante de fibras y textiles (no para prendas de vestir), y en casos excepcionales (Palacios García & San Román, 2014).

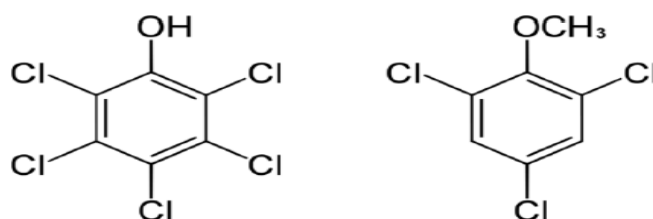
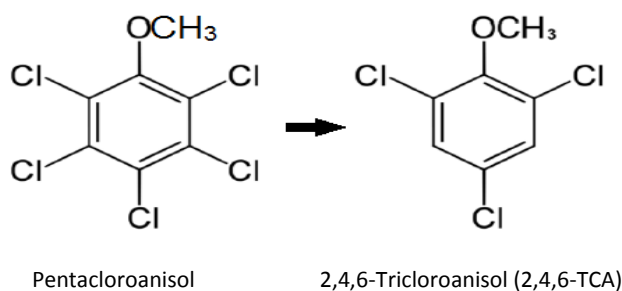


Figura 24: Moléculas que representan al precursor 2,3,4,5,6-pentaclorofenol (PCP) y al producto final, el 2,4,6-tricloroanisol (TCA) (Palacios García & San Román, 2014)

- 2- **Deshalogenación.** El 2,4,6-TCA se sintetizaría por la eliminación de átomos de cloro de anisoles altamente clorados.



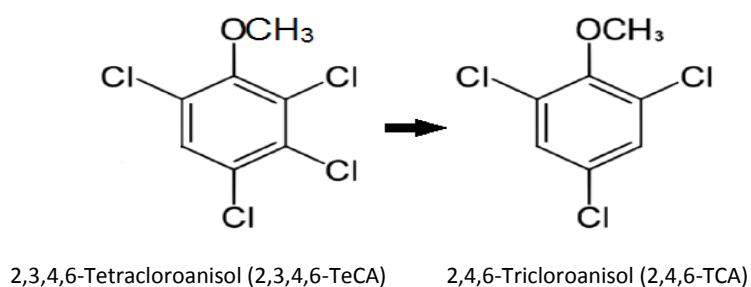


Figura 25: Producción de 2,4,6-Trichloroanisol a partir de Pentacloroanisol y 2,3,4,6-Tetrachloroanisol (Feltre Martínez, 2009)

Sin embargo, según algunos autores, las dos hipótesis mencionadas hasta ahora son las menos probables. La deshalogenación es reductora, ocurre en ausencia de oxígeno, y la degradación aerobia de precursores altamente clorados ocurriría por una deshalogenación oxidativa catalizada por enzimas monooxigenasas dando lugar a quinonas como intermediarios que no pueden producir 2,4,6-TCA.

- 3- **Biohalogenación.** Los cloroanisoles podrían formarse a partir de anisol (metoxibenceno) por un proceso de cloración, que sería un mecanismo de detoxificación que algunos microorganismos poseerían para eliminar átomos de cloro presentes en el ambiente. Así se originarían los cloroanisoles en la etapa de lavado con hipoclorito que se realiza durante la fabricación del tapón de corcho, por esto actualmente el baño clorado ha sido reemplazado, aunque ahora sabemos que esta técnica sólo constituye un factor agravante.

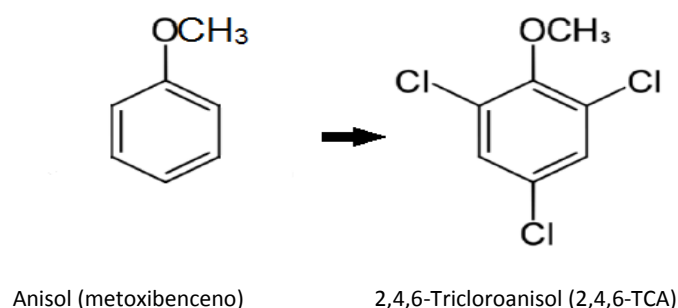


Figura 26: Producción de 2,4,6-Trichloroanisol a partir de Anisol (Feltre Martínez, 2009)

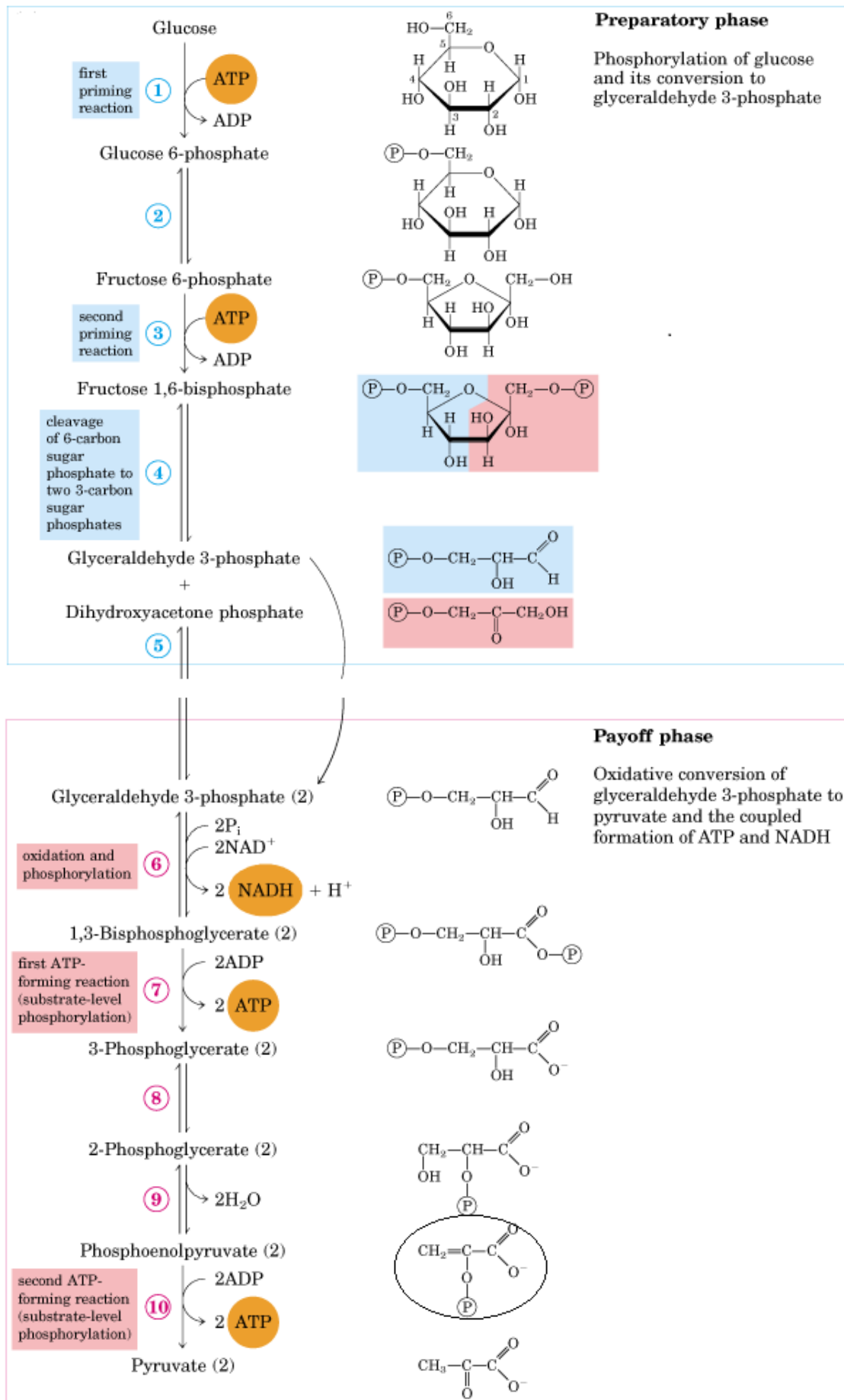
- 4- **Síntesis del núcleo fenólico y posterior cloración y metilación.** El núcleo fenólico se podría formar a partir de glucosa, que a través de la ruta de las pentosas fosfato originaría ácido shiquímico (ácido 3,4,5-trihidroxi-1-ciclohexenoico), precursor del fenol, el que sería clorado para dar 2,4,6-TCP. Este compuesto sería metilado para su detoxificación por medio de una actividad metiltransferasa, en presencia de ácido fólico como cofactor y S-adenosilmetionina (SAM) como donador de grupos metilo (Feltre Martínez, 2009).

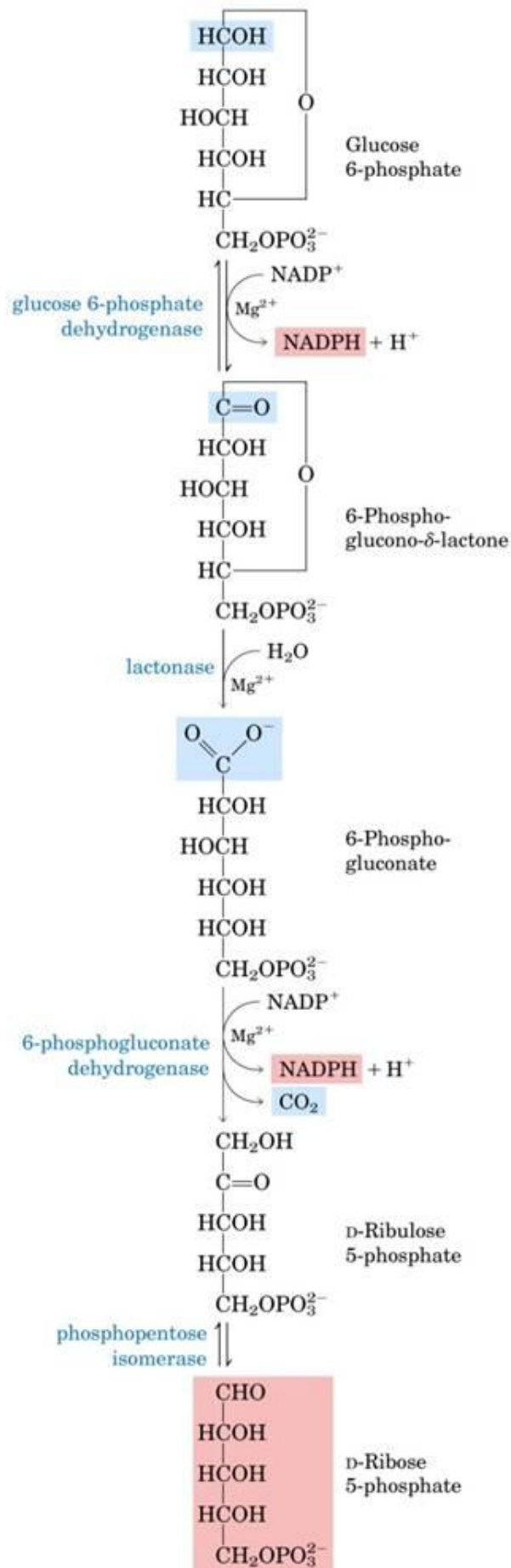
La ruta del ácido shiquímico es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los fenoles. Está presente en plantas, hongos y bacterias, pero no en animales. Convierte los precursores de la glicólisis y de la ruta de las pentosas fosfato en aminoácidos aromáticos. La glucosa es el precursor de compuestos de importancia a través de su intermediario clave, el ácido shiquímico. Este compuesto fue aislado en 1885 de un árbol japonés *shikimi-no-ki*, y su intervención en la bioformación de fenoles naturales fue establecida en 1955. La ruta metabólica que conduce al ácido shiquímico involucra un intermediario de siete átomos de carbono proveniente de la condensación de fosfoenolpiruvato y eritrosa (Nelson & Cox, 2009).

En resumen, en esta síntesis están involucrados los siguientes pasos:

- Obtención de fosfoenolpiruvato (Glicólisis) (Fig. 27)
- Obtención de eritrosa-4-fosfato (Vía de las pentosas fosfato) (Fig. 28)
- Bioformación del ácido shiquímico y compuestos análogos (Fig. 30)
- Biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (Ruta del prefenato) (Figs. 29 y 31)
- Obtención de fenoles simples (Fig. 32)
- Obtención del compuesto metilado, después de clorado (Fig. 33)

Figura 27: Glicólisis, obtención de fosfoenolpiruvato (Nelson & Cox, 2009)





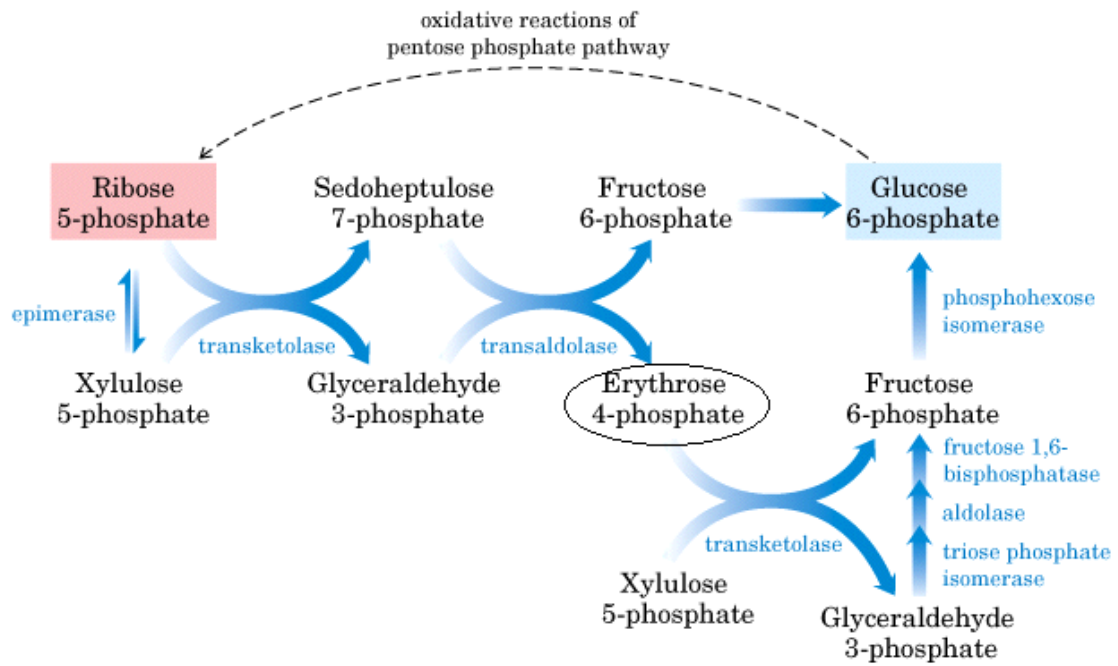


Figura 28: Vía de las pentosas fosfato, obtención de eritrosa-4-fosfato (Nelson & Cox, 2009)

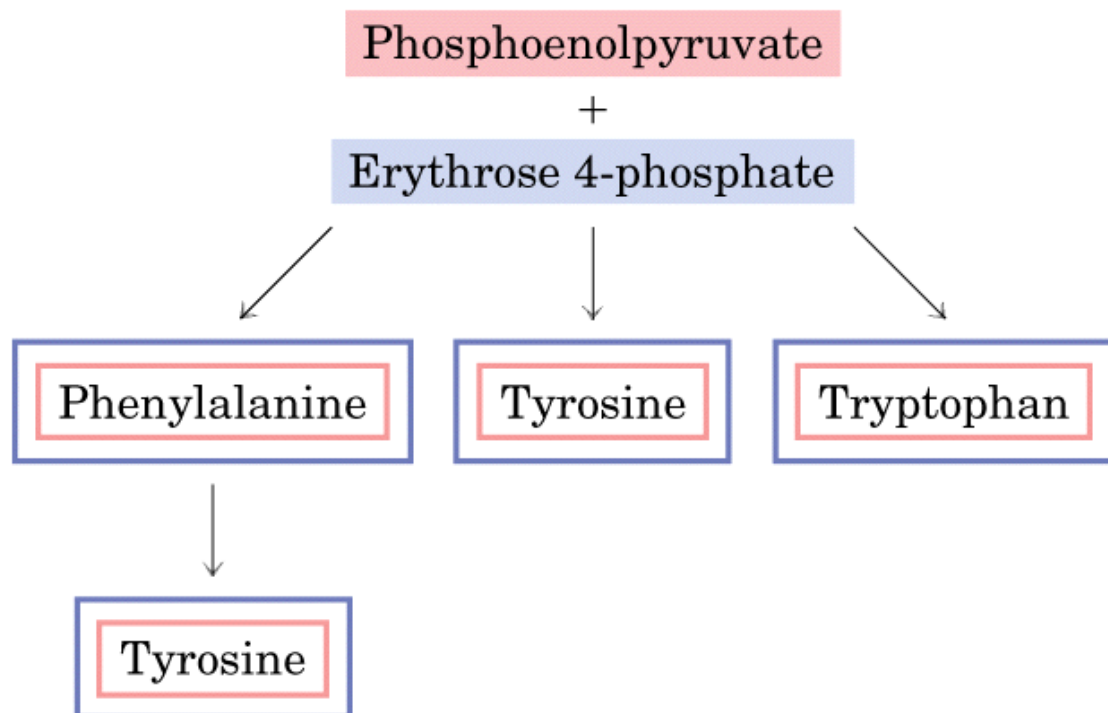


Figura 29: Esquema de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Nelson & Cox, 2009)

El ácido shiquímico es precursor de diversos intermediarios metabólicos aromáticos, tales como los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano (Nelson & Cox, 2009).

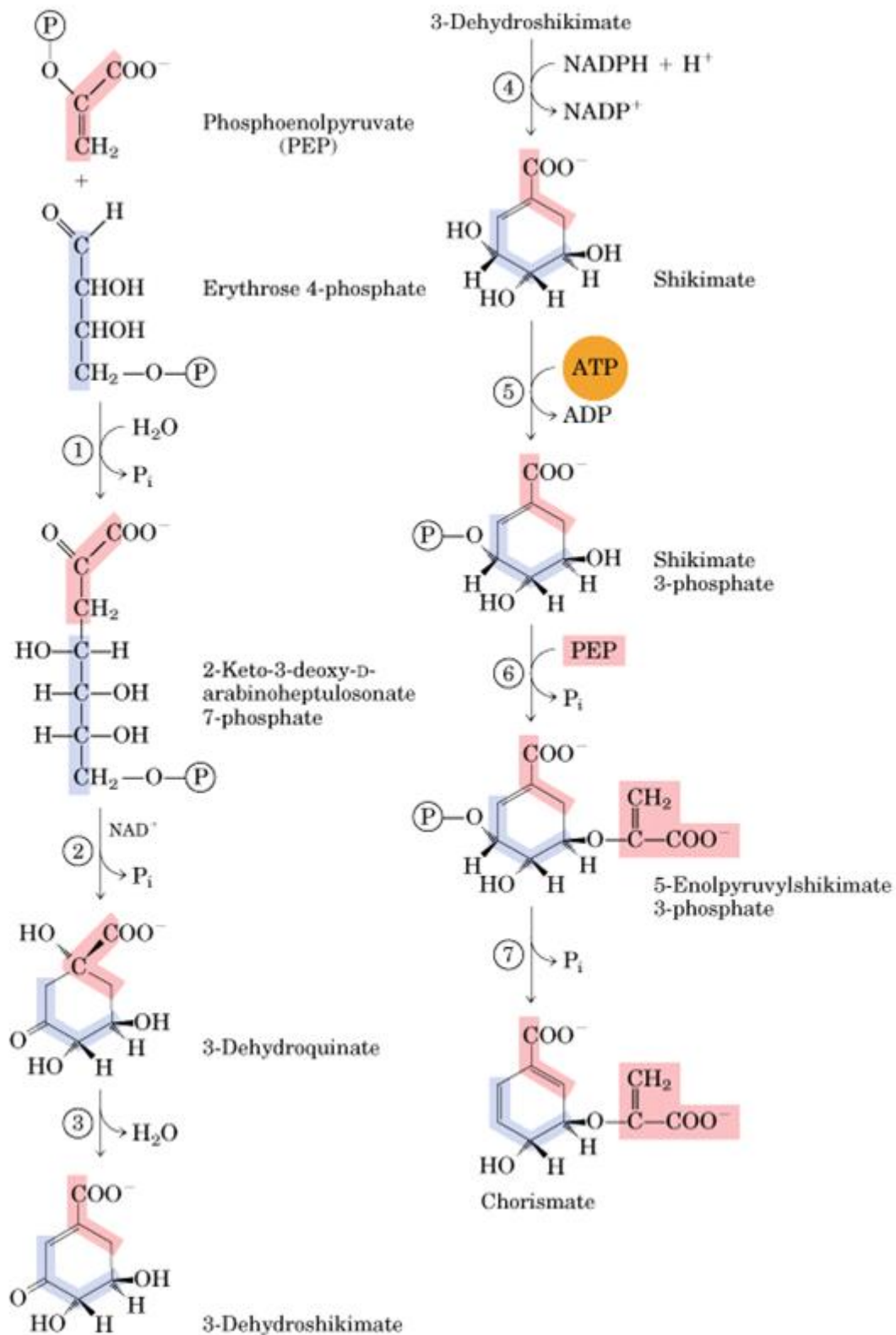


Figura 30: Bioformación del ácido shiquímico y compuestos análogos (Nelson & Cox, 2009)

El ácido shiquímico se biosintetiza originalmente del fosfoenolpiruvato y la eritrosa-4-fosfato para formar el precursor denominado 3-deshidroquinato. Además, puede producir por una vía enzimática de tres pasos uno de los

metabolitos más importantes de la ruta del ácido siquímico, el corismato (Nelson & Cox, 2009).

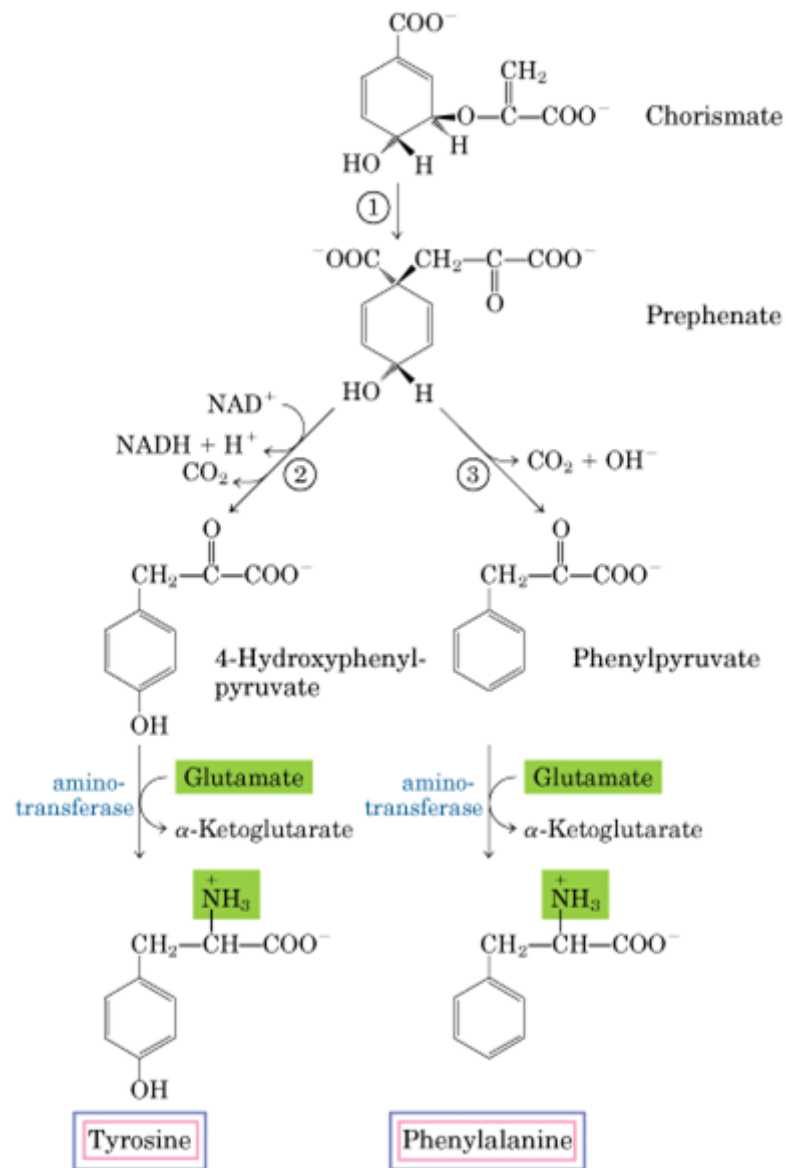


Figura 31: Ruta del prefenato: biosíntesis de los aminoácidos aromáticos (Nelson & Cox, 2009)

Las rutas de los aminoácidos aromáticos L-fenilalanina y L-tirosina a partir de prefenato suelen variar de acuerdo al organismo, y puede operar más de una ruta en una especie. Implica tres tipos de reacciones: transaminación, aromatización descarboxilativa e hidroxilaciones, lo que cambia en los organismos es el orden en el que se llevan a cabo.

La L-fenilalanina y la L-tirosina pueden dar origen a una amplia gama de metabolitos secundarios. El primer paso es la eliminación del nitrógeno de la

fenilalanina en forma de amonio para generar cinamato, por medio de la fenilalanina amonio liasa (Nelson & Cox, 2009).

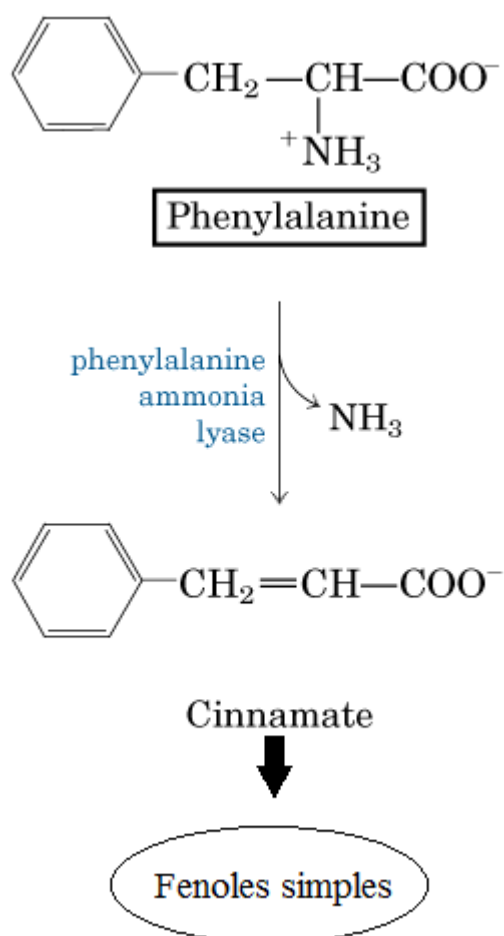


Figura 32: Obtención de fenoles simples (Nelson & Cox, 2009)

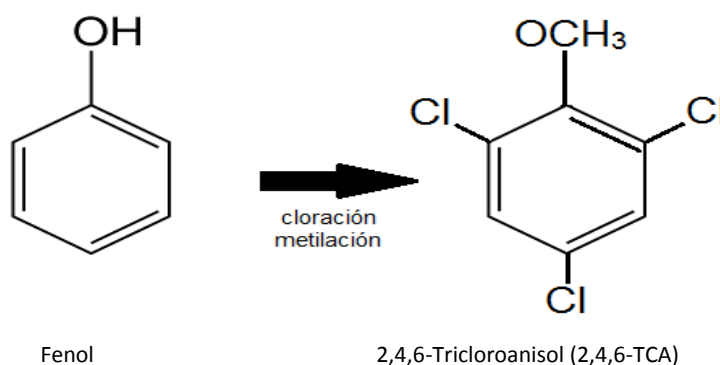


Figura 33: Obtención del compuesto metilado, después de clorado (Feltre Martínez, 2009)

Desde el punto de vista químico, la halogenación del fenol y del anisol (ver en ítem 3), son muy factibles. Los grupos hidroxilo (HO^-) y alcoxi (RO^- ; metiloxi, en este

último caso: CH₃O-) activan el anillo en tal grado que la halogenación (bromación) ocurre con rapidez, aún en ausencia de un catalizador (Carey, 2006).

- 5- **Biometilación a partir del precursor clorofenólico correspondiente.** Se ha propuesto también que los anisoles podrían formarse directamente por biometilación a partir de clorofenoles. Los clorofenoles podrían tener su origen en la contaminación ambiental debido a su uso como pesticidas, herbicidas y preservadores de la madera que han sido utilizados durante décadas y que se han convertido en contaminantes generalizados en cualquier ecosistema. Este hecho se agrava por la elevada resistencia de estos compuestos a la degradación, lo que origina que permanezcan en los ecosistemas durante largos períodos (Feltre Martínez, 2009).

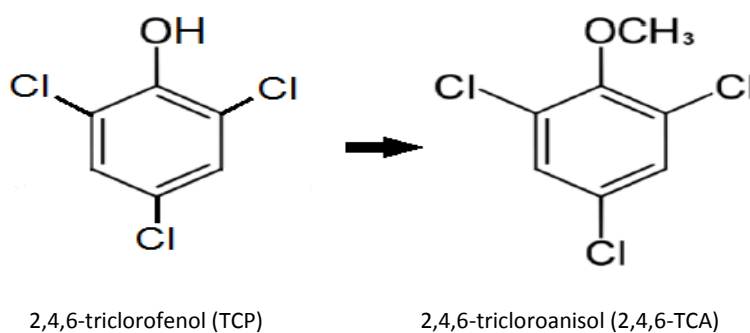


Figura 34: Biometilación del 2,4,6-triclorofenol (Feltre Martínez, 2009)

Los halofenoles más ampliamente utilizados por el hombre son los clorofenoles y los bromofenoles. Estos compuestos se transforman en anisoles por la acción de determinados microorganismos, fundamentalmente hongos filamentosos.

Los clorofenoles no son sustancias creadas por la naturaleza, sino que han sido producidos artificialmente por el hombre. El pentaclorofenol (PCP) y el 2,4,6-triclorofenol (2,4,6-TCP, o TCP) son dos de los pesticidas más empleados. Además las preparaciones de PCP suelen contener 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-TeCP, o TeCP).

Su amplio uso se debe a una serie de factores:

- Son fáciles de sintetizar para las industrias químicas.
- Son baratos.
- Son liposolubles, por lo que atraviesan las membranas de los seres vivos, y producen rápidamente la muerte de los microorganismos dañinos.

-Son muy tóxicos (Tabla 4). Su toxicidad se debe a la capacidad para destruir las proteínas y el material genético de los seres vivos, lo que aumenta su eficiencia. Una pequeña cantidad puede ocasionar la muerte de un número importante de microorganismos dañinos.

	2,4,6-Triclorofenol (2,4,6-TCP)	2,3,4,6-Tetraclorofenol (2,3,4,6-TeCP)	Pentaclorofenol (PCP)
DL ₅₀ oral en ratas, clasificación	820 mg/kg, ligeramente tóxico	140 mg/kg, moderadamente tóxico	50 mg/kg, altamente tóxico

Tabla 4: Toxicidad de clorofenoles, según Ullmann, 1986 (Rubio Coque, *et al.*, 2005)

El empleo de clorofenoles está actualmente prohibido en Europa ya que se sospecha que son cancerígenos. Sin embargo, continúan siendo utilizados en países en desarrollo (Asia y África).

Algunos autores proponen que los clorofenoles podrían formarse durante el proceso de cloración del agua mediante la reacción del hipoclorito sódico con fenoles disueltos, también se ha sugerido que en el corcho podría formarse durante el blanqueo de los tapones (práctica hoy en desuso) (Rubio Coque, *et al.*, 2005).

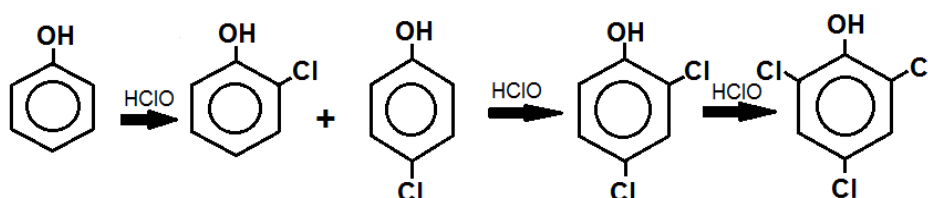


Figura 35: Mecanismo de formación del 2,4,6-triclorofenol a partir de solución clorada en un entorno ácido y al entrar en contacto con núcleos fenólicos (Chatonnet, 2004)

En la actualidad se conocen microorganismos conocidos por su capacidad para producir derivados organohalogenados, particularmente clorofenoles, que poseen una actividad enzimática del tipo cloroperoxidasa (CPO). Los cloruros (Cl⁻) no pueden ser oxidados a ácido hipocloroso (HClO) directamente por los perácidos o los peróxidos clásicos (ácido peracético, peróxido de hidrógeno), la reacción debe ser catalizada por el sistema enzimático del microorganismo mencionado,

pudiendo ser intra o extracelular. Pero esta fuente de anisoles es poco relevante (Palacios García & San Román, 2014).

Luego de los clorofenoles, los compuestos más usados son los bromofenoles, especialmente el 2,4,6-tribromofenol (2,4,6-TBP, o TBP). Son producidos en grandes cantidades por las industrias químicas, se emplean en pinturas, barnices, elementos plásticos y también como fungicidas. Aunque también se encuentran en la naturaleza.

III.1.2 Precusores y biosíntesis: mecanismo comprobado

El único mecanismo efectivo para explicar la formación de cloroanisoles a niveles detectables supone la transformación del TCP por biometilación en TCA. Esta transformación es llevada a cabo por una variedad de microorganismos, principalmente hongos filamentosos, que poseen una enzima llamada clorofenol O-metiltransferasa (CPOMT), que metila un amplio rango de halofenoles incluyendo clorofenoles, bromofenoles y yodofenoles, produciendo los haloanisoles correspondientes siendo: TCA, TeCA, PCA y TBA, los que afectan al vino (Rubio Coque, *et al.*, 2005).

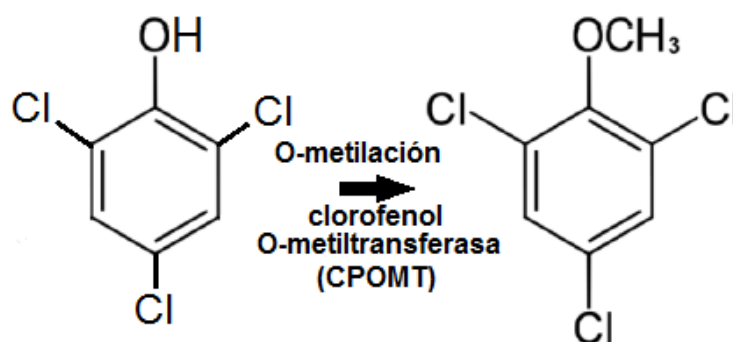


Figura 36: Mecanismo de formación de 2,4,6-tricloroanisol por *Trichoderma longibrachiatum* a partir de 2,4,6-triclorofenol mediante una reacción de O-metilación catalizada por la enzima clorofenol O-metiltransferasa (CPOMT) (Chatonnet, 2004)

Los clorofenoles han sido usados como fungicidas y pesticidas precisamente por su elevada toxicidad. Cuando un hongo filamentoso entra en contacto con estos compuestos procede a su inactivación, es decir, producir la detoxificación; ya que de lo contrario podría morir o sufrir daños severos que afecten su fisiología. La alta reactividad de los clorofenoles, y

su toxicidad, se debe al débil carácter ácido del grupo hidroxilo, que es capaz de reaccionar con las proteínas y los ácidos nucleicos generando un deterioro grave y a veces irreversible para la célula (Feltre Martínez, 2009).

Para llevar a cabo la detoxificación los hongos han desarrollado dos estrategias diferentes.

- 1- Cuando la célula fúngica entra en contacto con el TCP como mecanismo de defensa produce un tipo de enzimas oxidativas (por ejemplo lacasas y peroxidasas) que son secretadas al exterior de la célula para degradar allí los clorofenoles, oxidándolos primero a quinonas y luego a dióxido de carbono (usando el oxígeno como aceptor de electrones), evitando así que entren en el organismo y causen algún daño (Rubio Coque, *et al.*, 2006).

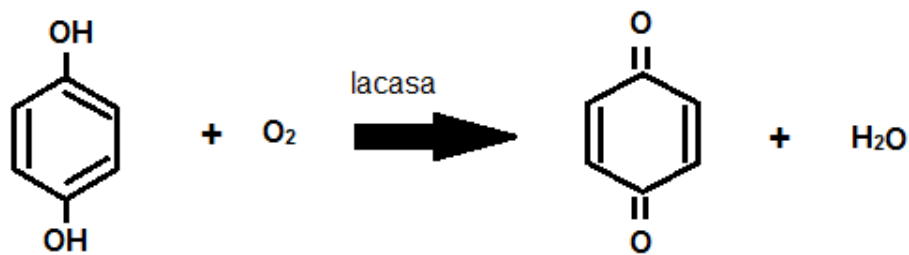


Figura 37: Reacción típica de las lacasas sobre sustratos fenólicos. (Enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas: catalizan la oxidación de un sustrato orgánico o inorgánico y la reducción de oxígeno molecular a agua por transferencia de un electrón) (Nelson & Cox, 2009)

- 2- Sin embargo, como los clorofenoles son compuestos liposolubles pueden llegar a atravesar la pared y la membrana celular del hongo para alcanzar su interior donde pueden destruir irreversiblemente proteínas importantes o incluso su material genético (ADN). Ante esta amenaza el sistema defensivo fúngico comienza la producción de clorofenol O-metiltransferasa (CPOMT), que es la responsable de transformar el TCP tóxico en TCA, un compuesto inocuo, inofensivo. Luego este compuesto es excretado de la célula y, debido a su carácter lipófilo, se adhiere al corcho, la madera o cualquier otro material sobre el que el hongo esté creciendo. Este mecanismo de defensa es muy común en los hongos filamentosos, la mayoría de los hongos presentes en el corcho o en las bodegas pueden sintetizar anisoles. Además, la enzima clorofenol O-metiltransferasa (CPOMT) puede actuar sobre distintos sustratos: clorofenoles y bromofenoles. Por lo tanto esta enzima es la

responsable de la formación de todos los anisoles, cloroanisoles y bromoanisoles, que contaminan al vino (Rubio Coque, *et al.*, 2005).

III.1.2.1 La clorofenol O-metiltransferasa (CPOMT)

III.1.2.1.1. Características

La superfamilia de las metiltransferasas (Enzyme Commission numbers, EC 2.1.1.-) incluye una gran cantidad de grupos con diferentes sustratos de actuación y que están relacionadas en funciones completamente dispares, desde la metilación del ADN hasta la modificación de aminoácidos. Comprende un importante número de proteínas con una gran heterogeneidad en cuanto a funciones y estructuras. En este caso particular, nos encontramos ante una enzima capaz de transferir grupos metilo a compuestos de origen fenólico (Feltre Martínez, 2009).

La enzima clorofenol O-metiltransferasa (CPOMT) de *Trichoderma longibrachiatum* es inducible por la adición de clorofenoles con al menos dos átomos de cloro, siendo esta inducción mayor con la adición de 2,4,6-triclorofenol. Es posible que el carácter inducible de la enzima de *Trichoderma longibrachiatum* proporcione al hongo alguna ventaja, ya que tal vez resulte en una respuesta más fuerte frente a clorofenoles en un tiempo más corto, con la posibilidad de poder modular la intensidad de la respuesta y el consiguiente ahorro energético para la célula. *Trichoderma longibrachiatum* posee niveles bajos de esta metiltransferasa. El efecto inductor parece ser independiente de las condiciones nutricionales del cultivo. El pH óptimo de la enzima se sitúa entre 8,2 – 8,5. La reacción transcurre de manera lineal durante las cuatro primeras horas (Chatonnet, 2004).

Los clorofenoles actúan desregulando la fosforilación oxidativa al intercalarse en las membranas mitocondriales y romper los gradientes de protones, lo que conduce a un considerable estrés oxidativo para la célula. Dado que no son compuestos naturales, se podría derivar que la actividad clorofenol O-metiltransferasa es en realidad una actividad secundaria o no específica de una metiltransferasa relacionada con la biometilación de otros sustratos fisiológicos que todavía no se han identificado. Se ha optimizado el método de purificación de la enzima clorofenol O-metiltransferasa (CPOMT) de *Trichoderma longibrachiatum* lo que permitió obtener cantidades suficientes de proteína y determinar la secuencia de aminoácidos de varios péptidos internos mediante análisis por huella peptídica y doble espectrometría de masas. La proteína CPOMT de *Trichoderma longibrachiatum* muestra alta homología con numerosas metiltransferasas del tipo II de hongos. Además se han encontrado tres dominios

conservados de metiltransferasas SAM (S-Adenosil metionina) dependientes en su secuencia. Estos datos nos permiten concluir que la enzima CPOMT es una O-metiltransferasa.

La enzima CPOMT es una proteína de 468 aminoácidos, con una masa molecular deducida de 52,4 kDa (Feltre Martínez, 2009). En su forma nativa tiene una masa molecular de 112.000 Da (112 kDa), mientras que el tamaño en condiciones desnaturalizantes es de 52.500 Da (52,5 kDa), lo que indica que es un dímero. La reacción catalizada por esta enzima es altamente específica de fenoles halogenados, siendo el 2,4-diclorofenol el compuesto metilado con mayor eficiencia (Tabla 5). La clorofenol O-metiltransferasa metila de mayor a menor eficiencia los sustratos TCP, TBP y 2,4,6-triiodofenol (2,4,6-TIP, o TIP), mientras que no metila 2,4,6-trifluorofenol (2,4,6-TFP, o TFP). Por lo tanto desarrolla una mayor actividad frente a clorofenoles que frente a fenoles halogenados con bromo, iodo o flúor (Chatonnet, 2004).

Sustrato	Grado de metilación
2,4-diclorofenol	100,00
2,4,6-triclorofenol	59,91
2,4,6-tribromofenol	12,98
2,4,6-triiodofenol	*
2,4,6-trifluorofenol	0

Tabla 5: Especificidad de sustratos de la enzima CPOMT. Los datos son relativos respecto al sustrato metilado con más eficiencia (2,4-DCP), al que se le atribuyó un valor arbitrario de 100. *El sustrato 2,4,6-TIP fue metilado pero la cuantificación del producto 2,4,6-TIA no fue posible (Chatonnet, 2004)

III.1.3 Soportes para su formación y contaminación

El corcho es un biopolímero de origen vegetal que se obtiene de la corteza externa del alcornoque, *Quercus suber* L.

Tiene como principales propiedades una baja densidad, una gran elasticidad, impermeabilidad, adherencia y compresibilidad. Además es compacto, resistente y se puede considerar inalterable.

El encuentro más célebre entre el corcho y el mundo de la ciencia ocurrió en el siglo XVIII cuando el físico inglés Robert Hooke obtuvo la primera imagen microscópica de las células que componen la corteza del alcornoque.

En este siglo el corcho comienza a utilizarse de manera regular en la industria. En la actualidad la principal aplicación del corcho es la fabricación de tapones para botellas de vino.

Sin embargo, la importancia del tapón de corcho se ha visto minimizada por el problema conocido como “*cork taint*” o contaminación del corcho, por el cual el tapón sería el

único responsable de contaminar el vino con metabolitos de origen microbiano que le confieren olores y sabores desagradables que impiden su consumo.

La presencia de la pared celular es una de las características de la célula vegetal. Es una capa rígida que se localiza en la parte externa de la membrana plasmática y media en las relaciones de la célula con su entorno, protege el contenido, da rigidez a la estructura de los hongos y soporte a los tejidos de las plantas. En el alcornoque, existe además una pared celular secundaria muy engrosada que es lo que conocemos como corcho.

El corcho es químicamente un heteropolímero complejo compuesto por: suberina, celulosa, ceras, polifenoles y polisacáridos.

La suberina es el componente mayoritario y el responsable de su elasticidad. Es una mezcla de ácidos fenólicos esterificados con ácidos grasos de cadena larga, entre 14 y 30 átomos de carbono. Éstos tienen carácter hidrofóbico, por lo que aportan impermeabilidad. Se ha encontrado también la presencia de moléculas de glicerol intercaladas entre los grupos alifáticos y aromáticos de la suberina.

Dentro de los polifenoles el principal componente es la lignina (Figs. 38 y 39), polímero constituido por restos fenilpropanoides unidos entre sí por enlaces éter carbono – carbono. Se caracteriza por su estabilidad y resistencia a la degradación, a la vez que actúa como elemento de soporte.

Otros polifenoles presentes en el corcho son los taninos, responsables de su coloración. Muchos de estos polifenoles se descomponen por la acción de microorganismos razón por la cual se pueden encontrar fenoles de baja masa molar (Feltre Martínez, 2009). Como puede observarse en la imagen anterior, la molécula de lignina presenta una estructura muy compleja, pocos microorganismos son capaces de llevar a cabo su degradación, entre ellos están los hongos filamentosos (Granda, *et al.*, 2005).

Los polisacáridos se localizan sobre todo en la pared celular y contribuyen a definir la textura del corcho. Los más importantes son la celulosa y la hemicelulosa. La celulosa es un polímero lineal formado por unidades de β -D-glucopiranosas; las hemicelulosas son polímeros de pentosas y hexosas asociados a celulosa y lignina en la pared celular.

Las ceras son componentes muy hidrófobos, que hacen que el corcho sea impermeable; mezclas complejas de compuestos alifáticos, en su mayor parte alcanos de número impar de carbonos, entre 29 y 31 átomos.

Además el corcho está constituido por agua, minerales, sales y glicerina.

El tejido suberoso no es homogéneo, está atravesado en su interior por poros o canales, que forman las lenticelas, rellenas de polvo rico en taninos.

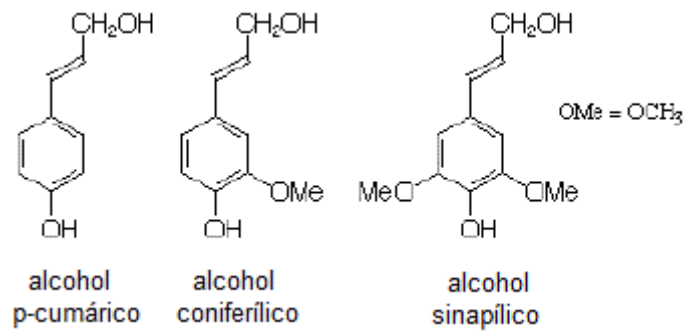


Figura 38: Precursores de la lignina (Granda, *et al.*, 2005)

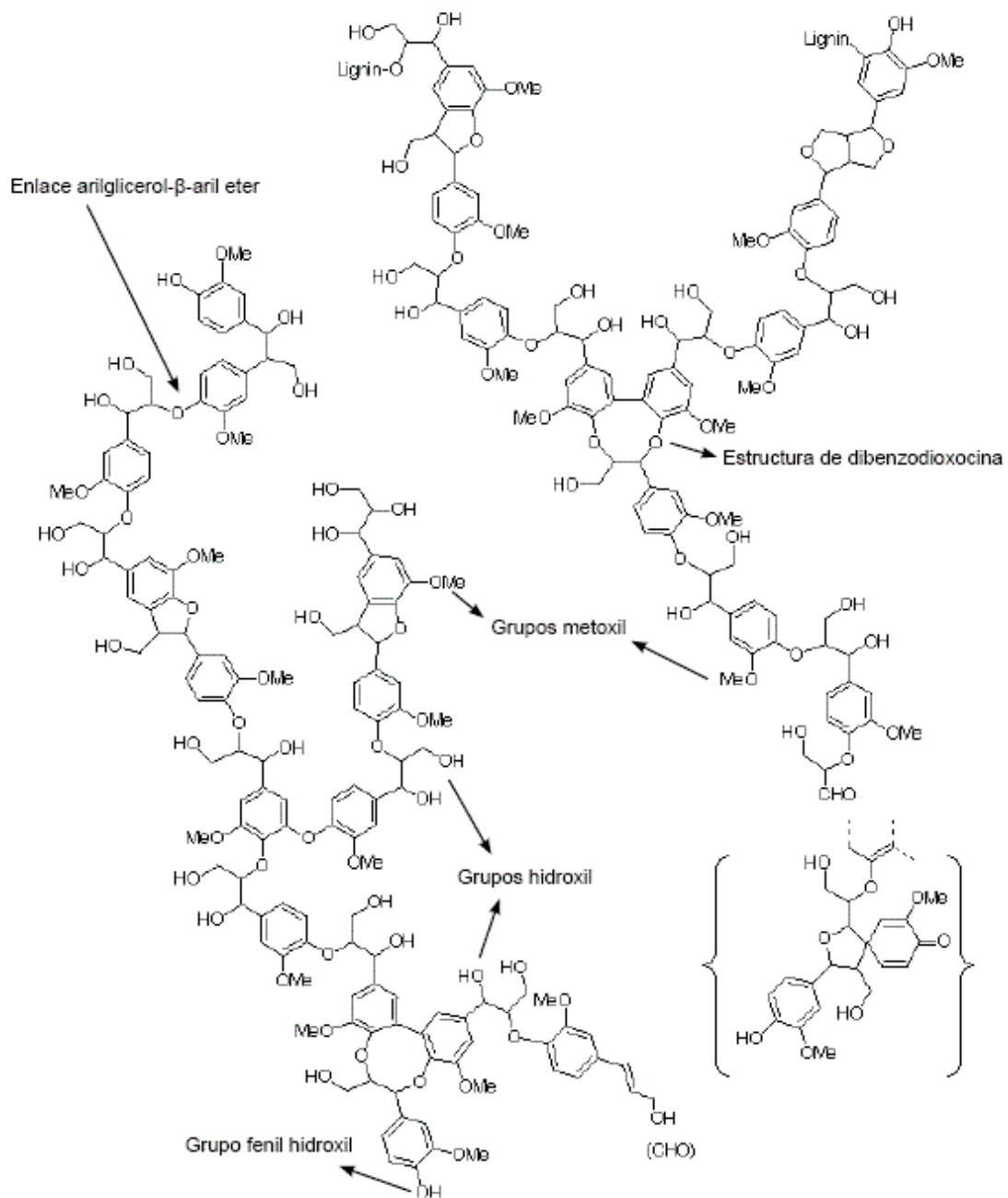


Figura 39: Molécula de la lignina con sus grupos funcionales (Granda, *et al.*, 2005)

Como consecuencia de las características químicas y estructurales citadas, el corcho tiene propiedades físicas definidas que son el motivo de su utilización a lo largo de la historia:

- Impermeabilidad total a los líquidos y parcial a los gases, lo que posibilita el intercambio de gases y la evolución del vino embotellado.
- Compresibilidad y elasticidad, que dependen de la cantidad de agua presente en el mismo.
- Adherencia en contacto con una superficie lisa, como consecuencia de las cavidades que actúan a modo de ventosa, propias de su estructura.

Todas estas particularidades hacen del corcho un material idóneo para el embotellamiento del vino.

Desde el punto de vista microbiano, el corcho presenta un ecosistema muy complejo en el que se pueden encontrar gran cantidad de microorganismos. A pesar de ser un material que por sus propiedades tiende a limitar su crecimiento:

- Baja concentración de nutrientes. Sólo aquellos microorganismos con capacidad suberolítica, ligninolítica o capaces de degradar celulosas y hemicelulosas pueden acceder a compuestos metabolizables.
- Baja actividad de agua. Lo que determina que el desarrollo se realice en la superficie del corcho, en la mayor parte de los casos por hongos filamentosos, que si bien tienen capacidad invasiva, no penetran en profundidad.

Estos microorganismos se pueden dividir en dos grupos. Por un lado, los que son saprófitos, es decir, que tienen capacidad para desarrollarse y crecer a expensas del corcho. Y por el otro lado los que son naturales de otros nichos ecológicos (suelo, material vegetal, etc.) y que aparecen como contaminantes ocasionales.

Sin embargo, diferenciar entre ambos grupos es casi imposible. La mayoría de los microorganismos aislados se encuentran en el corcho ya en el momento de la extracción del árbol, mientras que otros lo colonizan durante la etapa de reposo, en el proceso de manufacturación, en la bodega o durante el almacenamiento en fábrica.

La microbiota del corcho es muy variada y podemos destacar la presencia de un elevado número de bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Además se ve modificada en función del origen, el tipo de muestra y las condiciones ambientales. Si bien el crecimiento de los microorganismos tiene sus limitaciones, el corcho es capaz de soportar poblaciones microbianas considerables (Feltre Martínez, 2009).

Si a esto se añade, además, la presencia de precursores (halofenoles), se dan entonces todas las condiciones adecuadas para la producción de las moléculas de haloanisoles. Así, varios estudios realizados indican que los tapones de corcho serían los responsables de numerosos casos de contaminación donde se pueden destacar dos situaciones diferentes:

- El tapón de corcho como elemento contaminante. En este caso el tapón llega a la bodega con un nivel importante de haloanisoles, proveniente ya sea del propio alcornoque o contaminado durante su producción en la fábrica.
- El tapón de corcho como elemento transmisor de una contaminación existente en la bodega. Ahora es un vehículo de contaminación, pero el origen está en la bodega misma. Aquí el problema primario no es el tapón.

Resulta importante destacar que el tapón de corcho sólo es capaz de ceder al vino TCA en aquellas superficies que entran en contacto directo con él. Si la contaminación se localiza en la parte interna no pasa al vino.

El ingreso de TCA como consecuencia de contaminación en la bodega sólo se produce en los 2 mm externos, no penetrando hacia el interior del tapón.

Si el contenido de TCA de un tapón es uniforme, entonces la contaminación ha sucedido durante un tiempo prolongado en el árbol.

Cuando se detecta un vino cerrado con tapón de corcho y que presenta haloanisoles, no siempre puede afirmarse que la fuente primaria es el corcho. Es necesario realizar análisis adicionales para descartar que el problema no sea del vino.



Figura 40: En un principio se creyó que la contaminación por haloanisoles provenía sólo del tapón de corcho.

Foto: Alexandre Jaeger Vendruscolo (Laboratorios Excell Ibérica, 2010)

Hay evidencias que sugieren que un porcentaje importante del total de contaminaciones del vino por haloanisoles son atribuibles a otros elementos, observándose vinos contaminados que no han entrado en contacto con el corcho.

Se han encontrado vinos con contenido de TCA, PCA y TeCA, donde la contaminación era de la madera de la bodega, que seguramente debió ser tratada con PCP o TCP como fungicidas, y en el ambiente húmedo de la bodega habrían sido convertidos a cloroanisoles por hongos filamentosos (Rubio Coque, *et al.*, 2005).

En relación a la contaminación por TBA, se han citado diferentes situaciones:

- Vinos almacenados en barricas de roble o en cubas de acero inoxidable con niveles apreciables de este metabolito, también manifestado en la atmósfera de la bodega y en las barricas de roble durante la maduración del vino. La fuente primaria de contaminación, según los expertos, estaría radicada en las barricas, impregnadas con TBP, transformado en el haloanisol correspondiente por mohos y transmitido vía aérea a diferentes lugares de la bodega.
- En otro caso, el ambiente de la bodega con cantidades residuales de estos compuestos, infecta las barricas nuevas y el vino. La estructura microporosa de los materiales de la bodega representa una considerable superficie de intercambio, los contaminantes se volatilizan poco a poco en el aire.
- Vinos envejecidos en barricas de roble fuertemente contaminadas, con altos niveles de TBP encontrados en el recubrimiento de la madera de la bodega y en la pintura blanca de las paredes. La vía de entrada en la bodega habría sido la pintura o la madera empleada en su construcción. Luego de la intervención oportuna de los hongos filamentosos, las moléculas de haloanisoles se propagarían afectando hasta los tapones de silicona utilizados para sellar las barricas y por supuesto, también al vino.

Al igual que ocurre con los cloroanisoles, los materiales plásticos en general y las resinas elastómeras de silicona en particular pueden adsorber fácilmente el TBA, y en menor medida el TBP, igual de hidrófobo pero menos volátil. El material a base de polietileno o de poliéster, las juntas de caucho vulcanizado y los tapones de las barricas pueden fijar fácilmente los contaminantes del aire y cederlos después a los vinos. La presencia de importantes cantidades de contaminantes en tapones de polietileno extrusionado (PET, polietilentereftalato) almacenados en un ambiente viciado demuestra que es posible una contaminación aerológica a gran distancia, a través de la atmósfera y de los embalajes. Si bien no se sabe en qué proporciones pueden migrar al vino los contaminantes adsorbidos por el PET (Chatonnet, 2004).



Figura 41: La contaminación ambiental se produce, especialmente, en salas de crianza y maduración donde se guardan los vinos dirigidos a los mercados más exigentes. Foto: Enrica Bressan (Laboratorios Excell Ibérica, 2010)

De manera similar al fenómeno que se da en los corchos, hay varias fuentes de contaminación de la madera de roble por el TCA, algunas impredecibles. El TCA afecta a las duelas de la barrica en zonas muy limitadas sobre la superficie, que pueden alcanzar varios milímetros de profundidad. Se cree que durante la fase de secado natural de las duelas de madera podría haber una contaminación con compuestos organoclorados indeseados. La formación química del TCP, derivado de biocidas organoclorados no debería tener lugar en las tradicionales condiciones de la tonelería, y su acumulación es también poco probable.

Los análisis efectuados en la madera de roble indican que el TCP tiene un origen bioquímico. La capacidad de biometilación de los clorofenoles por la microflora de las duelas de la madera ya es conocida, pero aún no se conoce el verdadero origen del intermediario que conduce a la formación de TCP. Una posible hipótesis sería que en estas reacciones participen enzimas del tipo clorofenoloxidasas (CPO), que catalizan la formación de enlaces estables C – Cl; en sitios activos separados proceden a clorar sustratos aromáticos, vía ácido hipocloroso (HClO). Se han propuesto varias posibilidades, pero los responsables de la formación del precursor del TCA en la madera de roble aún no se han identificado concretamente.

Si bien esta posibilidad de contaminación de las barricas está siendo tenida en cuenta por los bodegueros, suele ser subestimada por los toneleros.

Como consecuencia de los estudios realizados, algunos especialistas opinan que si el problema es ambiental, debería buscarse una solución tendiente a la eliminación de los clorofenoles y bromofenoles del medio (Chatonnet, *et al.*, 2011).

La biotecnología es una de las disciplinas actuales que más se usa para resolver complicaciones relacionadas con la industria y el medio ambiente. En este contexto, la biorremediación es el proceso en el que se emplean organismos para resolver problemas

medioambientales específicos y ha experimentado un notable desarrollo en los últimos años. Existen dos estrategias de biorremediación de ecosistemas: la primera consiste en agregar nutrientes para estimular las poblaciones naturales y así aumentar su actividad, mientras que la segunda se basa en la introducción de microorganismos exógenos dentro del ecosistema como forma de remediación. Se estima que los mejores microorganismos para la eliminación de tóxicos presentes en un medio son en principio aislados del propio ambiente de donde han sido seleccionados naturalmente. Esto se sustenta en la observación de que los microorganismos capaces de habitar en un medio contaminado, poseen en su metabolismo celular dispositivos efectivos para realizar la descontaminación. Hoy, con las nuevas técnicas de ingeniería genética se pueden emplear microorganismos ya presentes en el ecosistema, pero genéticamente modificados haciéndolos así más eficientes en la biorremediación (Feltre Martínez, 2009).

La crianza y vinificación de vinos en recipientes de madera de roble es un proceso tradicional especialmente reservado para los productos de alta gama. Cuando el proceso está controlado, las interacciones entre el vino y la madera contribuyen a la estabilización natural y a la mejora de la calidad. Si esto no ocurre así, el riesgo de alteración del vino en contacto con la madera es mucho mayor que si se conserva en cubas fabricadas con materiales “inertes”: acero inoxidable, hormigón, hormigón revestido, cerámica. La estructura particular de la madera, con su microporosidad natural, dificulta la limpieza y desinfección de los recipientes de pequeña o gran capacidad, barricas o cubas de madera (Chatonnet, 2007).

La madera de roble puede considerarse como una serie de tubos conductores, paralelos al eje del árbol y unidos entre sí por células orientadas perpendicularmente a los mismos y radialmente en el tronco, que constituyen los radios leñosos (Cacho Palomar, 2009).

Esta característica de la madera de roble facilita la conservación y el desarrollo de los microorganismos en las paredes de los recipientes, por esto aumenta el riesgo de contaminación microbiana del vino. La utilización de recipientes de madera usados permite la contaminación si las condiciones de la bodega no son las apropiadas. La higiene de los recipientes de madera es un punto clave del control de calidad de los vinos (Chatonnet, *et al.*, 2010).

El uso de sales de hipoclorito disueltas en el agua de limpieza o desinfección de los recipientes de madera puede provocar la formación de clorofenoles precursores de cloroanisoles. Las sales de hipoclorito en medio ácido y en contacto con la materia orgánica que contiene trazas de núcleos fenólicos, producen mono, di y triclorofenoles, los que pueden ser degradados por los mohos en los correspondientes cloroanisoles. La conservación de los

recipientes de madera vacíos puede ocasionar un desarrollo “invisible” de estos hongos con la formación de las moléculas indeseables.

El empleo de productos clorados para la limpieza y desinfección de los pisos y paredes, es todavía más peligrosa. El cloro desprendido en fase gaseosa puede desplazarse y contaminar a distancia la madera de las barricas. La aplicación repetida a barricas envejecidas puede originar por acumulación una contaminación de los recipientes, la atmósfera de la bodega y el vino (Chatonnet, 2007).

Tanto el alcornoque como el roble son árboles, de modo que ambos tienen una estructura microscópica común: la célula vegetal. La semejanza entre estos sustratos posibilita que en los dos puedan llevarse a cabo, con igual importancia, los procesos citados anteriormente: adsorción de haloanisoles, absorción de halofenoles, desarrollo y permanencia de hongos filamentosos capaces de sintetizar haloanisoles en el sustrato en que se encuentran en presencia de los precursores, para ser luego ser absorbidos por el vino o el ambiente de la bodega. Pero estos fenómenos se extienden, además, a otro tipo de superficies: tapones de plástico o de silicona, juntas de goma, etc.; ya sea por su carácter microporoso similar al del corcho o la madera, o por alguna propiedad particular de las moléculas intervinientes, lo cierto es que el problema de contaminación por haloanisoles no se limita al corcho. El estudio de distintas situaciones ha permitido ampliar esta visión.

A modo de resumen, se puede concluir que, la atribución al tapón de corcho de ciertos aromas y gustos extraños en el vino embotellado ha dado lugar a una serie de estudios sobre el origen del problema (Suárez Lepe & Íñigo Leal, 2004).

-Las moléculas responsables están relacionadas con el metabolismo de detoxificación del cloro, llevado a cabo principalmente por hongos filamentosos. La microflora del corcho está constituida por una gran variedad de hongos filamentosos, levaduras y bacterias, y los agentes clorados, clorofenoles (procedentes en principio de los tratamientos fungicidas al alcornoque y muy tóxicos para los microorganismos), son transformados por éstos para evitar su poder letal. El resultado son moléculas orgánicas de cloroanisoles que en muy pequeñas cantidades confieren al vino un carácter mohoso.

-La presencia de cloro en la materia prima está relacionada con el número e intensidad de tratamientos fitosanitarios aplicados al alcornoque, y con la porción del tronco de donde se realice la extracción. Las regiones más cercanas al suelo presentan mayor incidencia de tratamientos fungicidas.

-Si el procesado industrial de las planchas de corcho no reúne las condiciones mínimas, se favorece la presencia y proliferación de hongos filamentosos que metabolizan las moléculas

de cloro presentes en la corteza, o procedentes de los desinfectantes clorados utilizados en las industrias.

-Se señala también como causa principal del problema, la contaminación en la propia bodega, debida a agentes clorados de uso común en la limpieza de barricas y piletas. Los cloroanisoles son compuestos volátiles con una débil tensión de vapor, por lo que una vez que estos compuestos se encuentran en fase gaseosa, pueden fácilmente invadir toda la atmósfera y difundirse hacia otras partes distantes de la bodega en principio no contaminadas.

-Los contaminantes pueden disolverse en los vinos durante los trasiegos. Igualmente las sustancias contaminantes toman contacto con las barricas, y a través de ellas con el vino en período de envejecimiento. Esta acción se ve además favorecida por la invasión de micelios fúngicos, que actúan como catalizadores biológicos de los clorofenoles.

-El almacenamiento en atmósferas contaminadas de productos destinados al acondicionamiento de los vinos puede ser también el origen de numerosos problemas. Es el caso de la bentonita, utilizada para la estabilización proteica de vinos blancos, que posee una estructura microscópica muy favorable a la recepción de moléculas orgánicas, que posteriormente, pueden liberarse al vino durante su tratamiento. Las tierras de filtración a base de diatomeas también presentan aptitudes de fijación de clorofenoles y cloroanisoles, y en caso de conservaciones prolongadas, pueden contaminar los vinos durante las operaciones de filtración. Algo similar ocurre con las placas filtrantes.

-En cuanto al almacenamiento de tapones de corcho en la bodega, su estructura celular y la abundancia de lípidos, hacen a los tapones particularmente sensibles a las contaminaciones por clorofenoles y cloroanisoles procedentes de la atmósfera de la bodega.

-La propia microbiota contaminante de las cavas puede ser responsable de la invasión de los tapones de corcho ya embotellados. No se puede culpar en este caso al tapón de corcho como responsable de las alteraciones organolépticas en el vino, sino a la deficiente desinfección en la bodega y/o al uso de agentes de limpieza inadecuados.

La expresión *gusto a corcho*, es un término genérico referido a una percepción sensorial desagradable en el vino, que alude a un carácter mohoso o terroso, independientemente de que su origen sea o no el tapón de corcho. En enología también se conoce como *gusto a tapón* (Suárez Lepe & Íñigo Leal, 2004).

En consecuencia, si bien el origen de la contaminación fue el corcho, hoy sabemos que ésta puede hacerse efectiva a otras superficies y en otras condiciones, posibilitando revelar así la verdadera dimensión de esta problemática.

CAPÍTULO IV: Conclusiones

Medidas sanitarias para prevenir el ingreso y producción de haloanisoles en bodegas

IV.1 Conclusiones y recomendaciones generales

Se mencionan a continuación conclusiones y recomendaciones fundamentadas a tener en cuenta para evitar la contaminación de vinos por haloanisoles.

- ✓ Es un problema complejo, con múltiples factores, en el que pueden intervenir distintas sustancias: 2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TeCA; PCA; 2,4,6-TBA y además 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina que es un compuesto relacionado a ellas.
- ✓ El 50% de los casos en los que aparecen aromas mohosos es debido a una contaminación con cloroanisoles, el resto es producido por 2,4,6-TBA y 2-metoxi-3,5-dimetilpirazina, por mezclas de estos compuestos o por otros que aún son desconocidos.
- ✓ Los haloanisoles son producidos por varios microorganismos, sobre todo hongos filamentosos, los que poseen una enzima: clorofenol-O-metiltransferasa, capaz de transformar pesticidas como los clorofenoles o bromofenoles en el haloanisol correspondiente.
- ✓ El mecanismo de transformación molecular fue estudiado y descubierto en el hongo *Trichoderma longibrachiatum*, es universal y permite explicar la formación de haloanisoles sobre diferentes materiales: corcho, agua, madera.
- ✓ Un alto porcentaje de hongos filamentosos sintetizan haloanisoles y se encuentran en el corcho y en las bodegas.
- ✓ El verdadero origen del problema no es sólo la presencia de hongos filamentosos creciendo sobre el corcho o la madera, sino además la elevada contaminación ambiental de clorofenoles y bromofenoles que son transformados en los correspondientes haloanisoles. Los hongos filamentosos no sintetizan 2,4,6-TCA si no entran en contacto con 2,4,6-TCP. Es importante por esto realizar tareas preventivas para evitar la contaminación con estos pesticidas.

- ✓ La presencia de haloanisoles en un vino no siempre supone la contaminación del corcho, ya que el corcho puede llegar limpio a la bodega y contaminarse allí con clorofenoles, cloroanisoles, bromofenoles o bromoanisoles presentes en las instalaciones de la bodega.
- ✓ Si se realiza el análisis cromatográfico de un vino contaminado y se detectan niveles mayores de haloanisoles en el tapón que en el vino, el problema puede no ser el tapón, ya que el corcho puede absorber la mayor parte del 2,4,6-TCA presente en el vino contaminado en un período de tiempo muy corto.
- ✓ Para conocer cuál es la fuente primaria de contaminación se lleva a cabo una batería de análisis cromatográficos que determinen los niveles de contaminación. Si es homogéneo, es decir, todas las botellas contaminadas, existe una probabilidad muy alta de que la contaminación provenga del vino. Si el nivel de contaminación es aleatorio, es decir, unas botellas sí y otras no, la fuente primaria sería el tapón de corcho.
- ✓ Si el tapón de corcho está contaminado con cloroanisoles puede contaminar al vino si estos compuestos están en la zona de contacto corcho-vino, porque está comprobado que el 2,4,6-TCA no puede atravesar el tapón de corcho. En el caso de bodegas contaminadas el tapón de corcho puede llegar a proteger al vino.
- ✓ El uso de tapones sintéticos (PET) no garantiza vinos libres de cloroanisoles. Está comprobado que el PET absorbe los cloroanisoles y podría cederlos al vino.
- ✓ Las bodegas deben realizar análisis periódicos, semestrales o al menos anuales, para determinar que sus instalaciones están libres de clorofenoles, cloroanisoles, bromofenoles y bromoanisoles (Ver **A.1 Recomendaciones para el envío de muestras para el análisis de haloanisoles**, Anexo 87).
- ✓ Los análisis consisten en trampas atmosféricas y análisis de materiales susceptibles de contaminación: madera de instalaciones, techos suelos, paredes y fundamentalmente barricas.

- ✓ Los análisis deben detectar la presencia de: 2,4,6-TCP; 2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TeCP; 2,3,4,6-TeCA; PCP; PCA; 2,4,6-TBP y 2,4,6-TBA.
- ✓ Se debe solicitar a los fabricantes de tapones de corcho y todos los elementos que entran en contacto con el vino: barricas, tapones de silicona, chips, duelas, un certificado que indique que están libres de estos contaminantes.
- ✓ Siempre que se introduzcan nuevos materiales a la bodega, incluyendo barnices y pinturas debe requerirse la certificación correspondiente que asegure que no contienen estos compuestos.
- ✓ Se debe solicitar a los proveedores de las cajas de cartón y demás utilizadas en el embalaje del vino un certificado que sus productos están libres de clorofenoles, cloroanisoles, bromofenoles y bromoanisoles. La contaminación de estos elementos no afecta al vino, pero contribuye a la contaminación de las instalaciones de la bodega.
- ✓ Se deben conocer cuáles son los estándares de calidad con que trabajan todas las empresas proveedoras, en particular aquellas que suministren elementos que entren en contacto con el vino en cualquier etapa de su elaboración o almacenamiento. Es importante establecer parámetros a cumplir que minimicen al máximo las posibilidades de contaminación con haloanisoles y sus precursores (Rubio Coque, *et al.*, 2006).

IV.2 Estrategias de trabajo específicas

Se entiende como medida preventiva a cualquier actividad o acción que tiene la finalidad de prevenir o eliminar un peligro contra la calidad de los alimentos reduciéndolo hasta niveles aceptables. Considerando a la inocuidad de los alimentos como el estado de los mismos que no causa daño al consumidor cuando sean preparados o consumidos de acuerdo con el uso previsto (Código Alimentario Argentino, 2010).

La calidad incluye cuatro grupos básicos de características, ellas son: la inocuidad, las características nutricionales, las sensoriales, y las comerciales. El presente trabajo no está relacionado con la inocuidad, porque la presencia de haloanisoles no contribuye a la toxicidad del vino, pero sí afecta gravemente a las características sensoriales, y está en relación directa

con una insuficiencia en la aplicación de prácticas sanitarias oportunas. Las medidas propuestas aquí son entonces tendientes a evitar el deterioro sensorial y en consecuencia el detrimento de la calidad.

IV.2.1 Estrategias de trabajo para impedir la contaminación del vino con haloanisoles

Las sugerencias planteadas en esta sección están destinadas a imposibilitar el ingreso e instalación de las moléculas de haloanisoles en la bodega y por ende en el vino.

Locales e instalaciones

- Deberán tener sistemas de ventilación, mecánica o natural, apropiados y suficientes, que eviten las corrientes de aire desde una zona contaminada a otra limpia. Se debe poder acceder fácilmente a los filtros y a las otras partes de los sistemas de ventilación cuando se tengan que limpiar.
- Las superficies de pisos, paredes y equipos deben ser de materiales sólidos, lisos, no absorbentes.
- Los techos, falsos techos y otras instalaciones suspendidas no deben favorecer la condensación de vapores.
- Las puertas y ventanas estarán construidas de manera que queden ajustadas herméticamente; las puertas con salida al exterior tienen que abrir hacia afuera y en el interior se recomienda puertas cortina. Las ventanas deben permanecer cerradas (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).
- Las bodegas deben realizar análisis periódicos (semestrales o como mínimo anuales) para determinar que sus instalaciones están libres de cloroanisoles y bromoanisoles. Los análisis consistirán en trampas atmosféricas y análisis de materiales susceptibles de estar contaminados como madera de instalaciones (techos, pisos, paredes) y barricas fundamentalmente. Los análisis deben detectar la presencia de los siguientes compuestos: 2,4,6-TCA; 2,3,4,6-TeCA; 2,4,6-TBA (Ver **A.1 Recomendaciones para el envío de muestras para el análisis de haloanisoles**, Anexo 87).
- Si existe la sospecha de contaminación con haloanisoles en algún sector de la bodega, debe encontrarse y eliminarse por completo la fuente de contaminación. Si hay madera, aislarla.

- Cada vez que se introduzcan nuevos materiales a las instalaciones de la bodega, se debe realizar un análisis o exigir la certificación de que los materiales empleados están limpios (Rubio Coque, *et al.*, 2005).

Equipos

- La maquinaria, los equipos y recipientes o contenedores serán de materiales lisos y no porosos (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).

Transporte

- Cuando se transporta vino se recomienda inspeccionar los vehículos antes de su carga, para asegurarse que estén aptos (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).

Aprovisionamiento de agua

- Se debe disponer de una cantidad suficiente de agua potable y de instalaciones apropiadas para almacenarla, distribuirla y controlarla. El volumen, la temperatura y la presión del agua deben ser adecuados para las demandas de usos. Cuando se utilice agua no potable, ésta debe circular por una canalización independiente, debidamente señalizada y sin conexión con la red de distribución de agua potable ni posibilidad de reflujo. Si el agua no potable se usa para refrigerar equipos, hay que asegurarse que no se produzcan fugas de fluido refrigerante hacia el mosto o vino (por ejemplo en las camisas). La recirculación de agua, también se debe distribuir de forma independiente y señalizada, debe ser tratada, vigilada y mantenida de acuerdo con los requisitos de uso. El programa de control de agua incluye: determinación de niveles del agente desinfectante residual, examen organoléptico y análisis completo. Para el agua de suministro de red pública, preferentemente hay que realizar el control diario del nivel de desinfectante residual presente (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).

Trazabilidad en la viña

- Los viticultores deben llevar el Cuaderno de Campo donde se registran los tratamientos fitosanitarios realizados.
- Opcionalmente se puede adjuntar información sobre fertilización, control de plagas y enfermedades, revisiones de maquinaria agrícola, datos de la vendimia que se consideren relevantes, etc. (Gobierno de Cataluña, 2012).

Trazabilidad en la bodega

- Se propone la preparación de un Registro de Vinificación, Registro de Elaboraciones y Prácticas Enológicas; en los que se detallan las variedades de uva, las manipulaciones, los tratamientos o prácticas enológicas, las utilidades de productos auxiliares, etc., en el proceso de elaboración (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).
- Es aconsejable disponer de una ficha de depósito que permita tener perfectamente identificado el tipo de vino que contiene en cada momento. Esta ficha incluirá: número de depósito, capacidad, tipo de vino, origen, variedades, cosecha, código de trazabilidad interno, tipo de operación, responsable y fecha.

El sistema de trazabilidad debe permitir asegurar la disponibilidad de la información a lo largo de todo el proceso de producción, de manera de poder conocer:

- Origen y características de las materias primas utilizadas (uvas, mostos, vinos, botellas, tapones...).
- Origen y características de las materias auxiliares empleadas (físicas: suelos, bentonitas, químicas: dióxido de azufre, ácido ascórbico; biológicas: levaduras, bacterias).
- Condiciones de elaboración, embotellado, almacenado y distribución de los productos elaborados.
- Composición y parámetros analíticos de cada lote de producción (Gobierno de Cataluña, 2012).

Proveedores

- La bodega debe establecer las especificaciones técnicas de las materias primas y las condiciones adecuadas de elaboración y transporte hasta la propia bodega.
- Se deben llevar a cabo procedimientos para evaluar, seleccionar y controlar a los proveedores con el fin de garantizar el origen, la calidad y las características higiénico-sanitarias de los insumos y de otros servicios contratados (gestión de residuos, laboratorio de control del agua, control de plagas, transporte, distribución).

- Las materias primas se deben inspeccionar en recepción, mediante una revisión y observación visual, y, si es necesario, se realizan otras pruebas. Las materias de mayor riesgo son las que se someten a un mayor grado de control.
- Los envases y el material de envasado además de cumplir con las especificaciones establecidas deben estar almacenados en condiciones que no favorezcan su contaminación y deterioro. Las botellas deben guardarse al amparo de la intemperie, manteniéndose íntegras las fundas o cubiertas. Los tapones deben estar en lugares no contaminados, aireados y sin olores (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).
- Se debe exigir a los fabricantes de barricas, y otros elementos que entren en contacto con el vino, como los tapones de silicona utilizados para su cierre, un certificado de que están libres de haloanisoles (Rubio Coque, *et al.*, 2005).
- Los proveedores de las cajas de cartón y del embalaje deben presentar una certificación de que sus productos están libres de cloroanisoles y bromoanisoles.
- Los corchos vienen envasados herméticamente en una atmósfera de SO₂, no deben dejarse las bolsas abiertas mucho tiempo. Si una bolsa queda abierta durante un tiempo prologado, conviene reenviarla nuevamente a la corchera para su reacondicionamiento (Rubio Coque, *et al.*, 2005).

IV.2.2 Estrategias de trabajo para evitar el desarrollo de hongos en la bodega

Los hongos filamentosos son microorganismos siempre presentes, ya que se encuentran en muy diversos hábitats. Apenas encuentran las condiciones apropiadas, que no son muy estrictas, se instalan. A veces producen un desarrollo imperceptible, que no permite advertir su presencia, y lo hacen sobre una amplia variedad de superficies.

Favorecen el crecimiento de los hongos los ambientes cerrados y húmedos, características éstas que suelen darse en la bodega. Los mohos del género *Mucor* y *Penicillium*, muy frecuentes en sus instalaciones, originan olores muy característicos (Chatonnet, 2007).

Si bien son habitantes ubicuos, existen medidas convenientes a adoptar para impedir su proliferación.

Locales e instalaciones

- Las diferentes áreas de la bodega deben estar limpias y en buen estado de conservación. El diseño, disposición, construcción y dimensiones deben

permitir una limpieza y desinfección adecuadas, y evitar la acumulación de suciedad.

- Separar zonas limpias de zonas sucias, para prevenir la contaminación cruzada y procurar que el flujo del proceso sea siempre desde la zona sucia hacia la más limpia.
- Deberán tener sistemas de ventilación, mecánica o natural, apropiados y suficientes, que eviten las corrientes de aire desde una zona contaminada a otra limpia. Se debe poder acceder fácilmente a los filtros y a las otras partes de los sistemas de ventilación cuando se tengan que limpiar.
- Disponer de sistemas de desagüe contruidos y diseñados para evitar el riesgo de contaminación. Los desagües deben tener un sifón para evitar los malos olores y rejillas para retener los residuos sólidos, de modo de poder retirarlos con facilidad.
- Las superficies de pisos, paredes y equipos, deben ser fáciles de limpiar, y cuando sea necesario fáciles de desinfectar, de materiales sólidos, lisos, no absorbentes, lavables.
- Construir ángulos, esquinas y uniones piso-pared y pared-techo redondeados (con un ángulo mínimo) para facilitar su limpieza y sin deterioro.
- Los techos, falsos techos y otras instalaciones suspendidas no deben favorecer la acumulación de suciedad y la condensación de vapores.
- Las puertas y ventanas estarán contruidas de manera que queden ajustadas herméticamente; las puertas con salida al exterior tienen que abrir hacia afuera y en el interior se recomienda puertas cortina. Las ventanas deben permanecer cerradas.
- Las calles deben estar pavimentadas para facilitar la limpieza (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).

Equipos

- Elementos, instalaciones y equipos que entren en contacto con uva, mosto o vino deben estar limpios; su construcción, composición y estado de conservación tienen que reducir al máximo el riesgo de contaminación, y deben permitir la limpieza y, cuando sea necesario, la desinfección.
- Los depósitos estarán diseñados y contruidos sin ángulos ni rincones, con fondo esférico cónico y con drenaje adecuado.

- La maquinaria, los equipos y recipientes o contenedores serán de materiales lisos y lavables; diseñados y contruidos de forma que permitan la salida total del líquido.
- Las tuberías y válvulas deben evitar la acumulación de suciedad (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).

Residuos

- Los residuos generados durante el proceso de elaboración deben recibir un tratamiento diferenciado. Se pueden clasificar según su toxicidad en peligrosos y no peligrosos. Son residuos peligrosos los que exigen, en función de sus características, una eliminación especial: tóners, tintas, baterías, pilas, tubos fluorescentes, aceites lubricantes, disolventes, ácidos, álcalis, envases con residuos peligrosos, etc. Dentro de los residuos no peligrosos se encuentran los residuos líquidos, obtenidos de las decantaciones y trasiegos, y los efluentes vinícolas provenientes de la limpieza de las instalaciones y de los derrames de los depósitos y equipos. Los residuos sólidos son escobajos, orujos y tierras de filtración, también los tartratos cristalizados que quedan adheridos a las paredes de los depósitos o retenidos en los filtros.
- Se tiene que prever una zona adecuada para almacenar y disponer los residuos, evitando fugas o accidentes con emisiones al medio ambiente.
- Debe haber una frecuencia de retirada de los residuos, no se pueden acumular de forma indiscriminada.
- Los recipientes utilizados para los residuos deben estar identificados, provistos de tapa y apertura no manual, de fácil limpieza y desinfección, con la frecuencia apropiada para reducir al máximo la posibilidad de contaminación (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).

Plagas

- Se generan si existen en la bodega zonas que permitan su entrada, espacios donde refugiarse y reproducirse, y disponibilidad de alimento, agua, temperatura y humedad adecuadas.
- Se deben respetar las distancias mínimas de las plantas de producción a los focos de contaminación (vertederos, estaciones de depuración de aguas residuales, etc.).
- Controlar vías potenciales de entrada como aberturas, desagües, rejillas, tuberías, ventilación, extractores, materias primas, instalaciones vecinas, etc.

- La disponibilidad de alimento radica en suciedad, rechazos, devoluciones, productos vencidos, pérdidas de agua, agua estancada, etc.
- Las plagas más habituales son insectos (mosca común y mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*), roedores y aves. Los signos que constatan su presencia son:
 - Insectos: mudas huevos, heces y daños.
 - Roedores: huellas, excrementos, pelos, madrigueras y roeduras.
 - Aves: nidos, excrementos, plumas.

En estos casos se tiene que constituir un control integrado de plagas, con la utilización de medidas pasivas o preventivas y de medidas activas o defensivas. Entre las medidas pasivas o preventivas está el diseño de los locales y las instalaciones. Hay que tener en cuenta:

- Ausencia de posible alimento o lugares de refugio (vegetación descontrolada, material inservible en torno a la bodega, recipientes de almacenado de residuos).

- Medidas físicas para evitar el acceso (protecciones en desagües, alcantarillas y agujeros; redes mosquiteras en ventanas, aberturas externas y extractores de aire, puertas externas cerradas y dobles puertas en áreas abiertas; cierres de protección en las líneas de embotellado desde la salida de la lavadora hasta la taponadora).

- Otros métodos físicos (ultrasonidos, trampas de luz ultravioleta, cebos antiinsectos, trampas de gomas adhesivas, control de maleza).

Mantener siempre selladas las grietas y los agujeros que puedan ir apareciendo, muy especialmente donde el producto elaborado o los materiales auxiliares en contacto directo con el producto elaborado se puedan contaminar con el ambiente. El personal debe comunicar la presencia o evidencia de plagas.

Entre las medidas activas o defensivas se incluyen los tratamientos con plaguicidas, que sólo se emplean cuando se haya detectado una plaga. Los tratamientos de desinsectaciones y desratizaciones se pueden llevar a cabo con el personal propio o una empresa externa, ambos especializados. Se deben tener siempre los certificados de los tratamientos realizados, las fichas técnicas y de seguridad de cada producto autorizado empleado (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).

Trazabilidad en la viña

- Opcionalmente se puede adjuntar en el Cuaderno de Campo información sobre fertilización, control de plagas y enfermedades, revisiones de maquinaria agrícola, datos de la vendimia que se consideren relevantes, etc.; de manera de conocer si hay alguna irregularidad que afecte la carga microbiana (mohos) de la materia prima que va a ingresar a la bodega (Gobierno de Cataluña, 2012).

Trazabilidad en la bodega

- Resulta conveniente realizar, mediante el sistema de trazabilidad, un seguimiento de la materia prima (uva), cuando ésta presente características particulares que pudieran afectar el ambiente de la bodega (Gobierno de Cataluña, 2012).

IV.2.3 Estrategias de trabajo para evitar la síntesis de haloanisoles en la bodega

La presencia de clorofenoles y bromofenoles en la bodega es un problema de contaminación ambiental. Como los hongos filamentosos sólo sintetizan haloanisoles cuando entran en contacto con sus precursores, es fundamental realizar labores preventivas para impedir su producción.

Locales e instalaciones

- Las superficies de pisos, paredes y equipos deben ser de materiales sólidos, lisos, no absorbentes. Hay que evitar las pinturas que tengan disolventes nocivos (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).
- Las bodegas deben realizar análisis periódicos (semestrales o como mínimo anuales) para determinar que sus instalaciones están libres de clorofenoles y bromofenoles. Los análisis consistirán en trampas atmosféricas y análisis de materiales susceptibles de estar contaminados como madera de instalaciones (techos, pisos, paredes) y barricas fundamentalmente. Los análisis deben detectar la presencia de los siguientes compuestos: 2,4,6-TCP; 2,3,4,6-TeCP; PCP; 2,4,6-TBP.
- Si existe la sospecha de la presencia de pallets tratados con compuestos organoclorados, deben ser eliminados.
- Cada vez que se introduzcan nuevos materiales a las instalaciones de la bodega (incluyendo barnices y pinturas) se debe realizar un análisis o exigir la

certificación de que los materiales empleados están limpios (Rubio Coque, *et al.*, 2005).

Desinfectantes

- No se aconseja el uso de compuestos clorados debido a que pueden dar lugar a la formación de clorofenoles (Gobierno de Cataluña, 2012).

Aprovisionamiento de agua

- Debe llevarse a cabo un programa de control de agua que incluye: determinación de niveles del agente desinfectante residual, examen organoléptico y análisis completo. Para el agua de suministro de red pública, preferentemente hay que realizar el control diario del nivel de desinfectante residual presente (Código Alimentario Argentino, 2010), (Gobierno de Cataluña, 2012).

Trazabilidad en la viña

- Los viticultores deben llevar el Cuaderno de Campo donde se registran los tratamientos fitosanitarios realizados.
- Opcionalmente se puede adjuntar información sobre fertilización, control de plagas y enfermedades, revisiones de maquinaria agrícola, datos de la vendimia que se consideren relevantes, etc.; de manera de conocer si hay alguna irregularidad que afecte las características fitosanitarias de la materia prima que va a ingresar a la bodega (Gobierno de Cataluña, 2012).

Trazabilidad en la bodega

- Resulta conveniente realizar, mediante el sistema de trazabilidad, un seguimiento de la materia prima (uva), cuando ésta presente características particulares que pudieran afectar el ambiente de la bodega (Gobierno de Cataluña, 2012).

Proveedores

- La bodega debe establecer las especificaciones técnicas de las materias primas y las condiciones adecuadas de elaboración y transporte hasta la propia bodega.
- No hay que admitir ninguna materia prima que se sospecha contaminada con restos de plaguicidas o sustancias tóxicas que no se puedan reducir a un nivel aceptable después de la elaboración (Código Alimentario Argentino, 2013), (Gobierno de Cataluña, 2012).

- Se debe exigir a los fabricantes de barricas, y otros elementos que entren en contacto con el vino, como los tapones de silicona utilizados para su cierre, un certificado de que están libres de halofenoles.
- Los proveedores de las cajas de cartón y del embalaje deben presentar una certificación de que sus productos están libres de clorofenoles y bromofenoles (Rubio Coque, *et al.*, 2005).

CAPÍTULO V: Bibliografía

Medidas sanitarias para prevenir el ingreso y producción de haloanisos en bodegas

V. Bibliografía

- Alturria, L. y otros, 2008. *Elaboración de vinos: Defectos en el proceso que originan costos de no calidad*. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. UNCuyo*. Vol. 40, n° 1, p. 1 - 16. [En línea] <http://bdigital.uncu.edu.ar/2629>
[Consulta: 14 octubre 2014].
- Bodegas de Argentina, 2013. *Protocolo de autoevaluación de sustentabilidad vitivinícola de bodegas de Argentina*. [En línea]
http://www.bodegasdeargentina.org/premios/informacion/Protocolo_BdeA_Version_2_289.pdf
[Consulta: 02 enero 2015].
- Cacho Palomar, J., 2009. *El roble, la barrica y la crianza del vino tinto*. [En línea]
http://www.academiaaragonesadegastronomia.com/sites/default/files/archivos/17Juan_Cacho.pdf
[Consulta: 11 julio 2014].
- Cantarelli, A. P., 2010. *Transformaciones de la viticultura del sur de Mendoza en la década de 1990*. [En línea]
<http://hum.unne.edu.ar/revistas/geoweb/Geo13/contenidos/vitmdza1.htm>
[Consulta: 17 julio 2014].
- Carey, F. A., 2006. *Química Orgánica*. 6a ed. México: Mc Graw - Hill, Interamericana 1.245 p.
- Chatonnet, P., 2004. *Anisoles y Brettanomyces. Causas, efectos y mecanismos de control*. [En línea]
http://www.culturadelvino.org/mobile/actividades/pdf/encuentros/encuentro_2004.pdf
[Consulta: 11 julio 2014].
- Chatonnet, P., 2007. *Limpieza y desinfección aplicadas a recipientes de madera destinados a la vinificación y crianza de vinos*. *Revista Enología* n°3. [En línea]
http://www.revistaenologia.com/pdf/n21_ENO_Ponencia_Pascal_higiene.pdf
[Consulta: 11 julio 2014].

- Chatonnet, P., Fleury, A. & Bouton, S., 2011. Contaminación de la madera por 2,4,6-tricloroanisol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(19), pp. 10.528 - 10.538.
- Chatonnet, P., Fleuryl, A., Boutou, S. & Palacios, P., 2010. Puesta en evidencia de una nueva fuente de contaminación de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) en el vino a partir de la madera de roble *Quercus* sp. y su efecto durante la crianza en barricas. *Enoviticultura*, n°6, pp. 2 - 11.
- Chávarri Mardones, J. B., 2012. *Vinos y Viñedos. La prohibición del sulfuroso en la desinfección de barricas (Situación actual, métodos y alternativas)*. [En línea] <http://urbinavinos.blogspot.com.ar/2012/08/la-prohibicion-del-sulfuroso-en-la.html> [Consulta: 09 diciembre 2014].
- CIATI AC. Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria Agroalimentaria - Asociación Civil, 2014. *Manual de Procedimientos LOG 001 - Anexo 2 rev 1. Recomendaciones para el envío de muestras para análisis de anisoles*. [En línea] <http://www.ciati.org/ciati/Documentos/LOG001-Anexo2-Rev1-Recomendaciones%20Muestras%20Anisoles.pdf> [Consulta: 16 agosto 2014].
- Código Alimentario Argentino, 2010. *Capítulo II: Condiciones generales de las fábricas y comercios de alimentos*. [En línea] http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp [Consulta: 06 octubre 2014].
- Código Alimentario Argentino, 2013. *Capitulo IV: Utensilios, recipientes, envases, envolturas, aparatos y accesorios*. [En línea] http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp [Consulta: 06 octubre 2014].
- Cruz, R., 2014. *Revista Chilena de Infectología*. Vol. 31, n° 2, p. 173 - 179. [En línea] http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182014000200008&script=sci_arttext [Consulta: 05 agosto 2014].
- Cruz, R. & Piontelli, E., 2011. *Revista Chilena de Infectología*. Vol. 28, n° 2, p. 123 - 129. [En línea] http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182011000200004&script=sci_arttext [Consulta: 08 agosto 2014].

- Diario San Rafael, 2013. *San Rafael produjo el 6,2% del vino de Mendoza*. [En línea]
<http://www.diario18n.com.ar/san-rafael/noticia/1463-san-rafael-produjo-el-62-del-vino-de-mendoza>
[Consulta: 11 julio 2014].
- Fanzone Sánchez, M. L., 2012. *Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (Vitis vinifera L.): su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial*. Tesis Doctoral - Universitat Rovira i Virgili, 369 p. [En línea]
<http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/81715/Tesis%20Doctoral-M.%20Fanzone.pdf?sequence=1>
[Consulta: 23 octubre 2014].
- Feltrer Martínez, R., 2009. *Análisis de la formación de cloroanisoles por Trichoderma longibrachiatum: Caracterización del gen codificante del enzima clorofenol O-metiltransferasa (CPOMT)*. Tesis Doctoral - Universidad de León, 196 p. [En línea]
<https://buleria.unileon.es/handle/10612/924>
[Consulta: 11 julio 2014].
- Ferreira González, V., 2007. *La base química del aroma del vino: Un viaje desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas*. *Revista Real Academia de Ciencias. Zaragoza*. Vol. 62, p. 7 - 36. [En línea]
<http://www.unizar.es/acz/05Publicaciones/Revistas/Revista62/p007.pdf>
[Consulta: 22 octubre 2014].
- Fundación ProMendoza, 2014. *Vitivinicultura*. [En línea]
http://www.promendoza.com/index.php?option=com_content&view=article&id=29&Itemid=32&lang=es
[Consulta: 11 julio 2014].
- Garijo Jiménez, M. P., 2013. *Estudio del aire como vía de diseminación de microorganismos enológicos*. Tesis Doctoral - Universidad de La Rioja, 204 p. [En línea]
<http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=41551>
[Consulta: 20 septiembre 2014].
- Gobierno de Cataluña, 2012. *Guía de prácticas correctas de higiene para el sector vitivinícola*. [En línea]

- http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/es/dir3230/gpch_vitivinicola_es.pdf
[Consulta: 16 agosto 2014].
- Granda, D., Mejía, A. & Jiménez, G., 2005. *Vitae. Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus**. Vol. 12, n° 2. [En línea]
http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042005000200002#f3
[Consulta: 30 septiembre 2014].
- Hidalgo Togores, J., 2011. *Tratado de Enología*. 2a ed. Madrid - México: Ediciones Mundi - Prensa, 1823 p. en dos tomos (Tomo I, 976 p.; Tomo II, 847 p)
- Infante, D., Martínez, B., González, N. & Reyes, Y., 2009. *Revista de Protección Vegetal*. Vol. 24, n° 1, p. 14 - 21. [En línea]
http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1010-27522009000100002&script=sci_arttext
[Consulta: 05 agosto 2014].
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, 2003. *Fichas Internacionales de Seguridad Química*. [En línea]
<http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1001a1100/nspn1014.pdf>
[Consulta: 08 agosto 2014].
- INV, 2014. *Vitivinicultura argentina, Situación de la vitivinicultura argentina*. [En línea]
http://www.inv.gov.ar/vitiv_arg.php
[Consulta: 25 agosto 2014].
- La Nación, 2014. *Un Malbec argentino fue distinguido en Francia como "el mejor tinto del mundo"*. [En línea]
<http://www.lanacion.com.ar/1671957-un-malbec-argentino-fue-distinguido-en-francia-como-el-mejor-tinto-del-mundo>
[Consulta: 19 julio 2014].
- Laboratorios Excell Ibérica, 2010. *Contaminación medioambiental de anisoles clorados y bromados en bodegas*. [En línea]
<http://www.interempresas.net/Vitivinicola/Articulos/44913-Contaminacion->

medioambiental-de-anisoles-clorados-y-bromados-en-bodegas.html

[Consulta: 24 julio 2014].

Lecciones de vino, 2014. *Casa Bianchi: mejor vino tinto seco para su Premium Famiglia Bianchi Reserva Malbec 2012*. [En línea]

<http://leccionesdevino.blogspot.com.ar/2014/03/casa-bianchi-mejor-vino-tinto-seco-para.html>

[Consulta: 18 julio 2014].

Morrison, R. & Boyd, R., 1990. *Química Orgánica*. 5a ed. Wilmington, Delaware, E.U.A.: Addison - Wesley Iberoamericana, S.A., 1.479 p.

Nelson, D. L. & Cox, M. M., 2009. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 5a ed. Barcelona, España: Omega , 1.296 p.

Nelson, D. L. & Cox, M. M., 2009. *Presentaciones Power Point del libro Lehninger Principios de Bioquímica*. [En línea]

<http://laguna.fmedic.unam.mx/lenpres/>

[Consulta: 28 agosto 2014].

Palacios García, A. & San Román, J., 2014. *Vinos y Viñedos: Todo sobre el TCA o también llamado por defecto "olor a moho", "olor a corcho" en vinos*. [En línea]

<http://urbinavinos.blogspot.com.ar/2014/01/todo-sobre-el-tca-o-tambien-llamado-por.html>

[Consulta: 09 agosto 2014].

Palacios, A., Borinaga, I. & Carrillo, D., 2012. *Estudio comparativo de sistemas de desinfección de barricas de vino como alternativa al empleo del sulfuroso*. [En línea]

http://www.google.com.ar/url?url=http://www.revistaenologos.es/download.php?type%3Ddoc%26name%3DA17_LimpiezadeBarricas_Enlogos2012_x.pdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ei=QNa_U983ouCwBI-bgbgG&ved=0CBoQFjAB&usg=AFQjCNEzUOGidyirkKzJm_7JV7Ua2PMHUQ

[Consulta: 11 julio 2014].

Región de Cuyo, 2011. *La elaboración del vino*. [En línea]

<http://regiondelcuyo.blogspot.com.ar/2011/11/cuyo-una-region-geografica-historica.html>

[Consulta: 18 julio 2014].

- Remirez, E. & Palacios, A., 2012. *Limpieza y desinfección de barricas a través de microondas de alta frecuencia. INNERBARREL. Revista Enólogos. Año XIV, n° 75, p. 34 - 38. [En línea]*
http://www.google.com.ar/url?url=http://revistaenologos.es/download.php%3Ftype%3Ddoc%26name%3DA14_LimpiezadeBarricas_Enologos2011_x.pdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ei=VcG_U9v2JMjQsATvuoHYBA&ved=OCDQQFjAG&usg=AFQjCNG_-IIDXikesNeDgJsz_aZ9nAmuBw
[Consulta: 11 julio 2014].
- Rubio Coque, J., 2010. *Agencia Iberoamericana para la Difusión de la Ciencia y la Tecnología (DICYT). Investigadores leoneses desarrollan un hongo transgénico para reducir los aromas fúngicos del vino. [En línea]*
<http://www.dicyt.com/noticias/investigadores-leoneses-desarrollan-un-hongo-transgenico-para-reducir-los-aromas-fungicos-del-vino>
[Consulta: 09 agosto 2014].
- Rubio Coque, J., Álvarez Rodríguez, M. & Feltrer Martínez, R., 2005. *Causas y orígenes de la contaminación del vino por haloanisoles. [En línea]*
http://www.asecor.com/doc/anisoles_es.pdf
[Consulta: 11 julio 2014].
- Rubio Coque, J. J., Álvarez Rodríguez, M., Goswami, M. & Feltrer Martínez, R., 2006. *Causes and origins of wine contamination by haloanisoles (chloroanisoles and bromoanisoles). [En línea]*
http://www.apcor.pt/userfiles/File/Causes_and_origins_of_wine_contamination_by_haloanisoles.pdf
[Consulta: 10 diciembre 2014].
- Salvalaggio, M. L., 2013. *Análisis de las tendencias de ventas vitivinícolas de la década 2002 - 2012 de Mendoza. [En línea]*
<http://bdigital.uncu.edu.ar/5723>
[Consulta: 11 julio 2014].
- Suárez Lepe, J. A. & Íñigo Leal, B., 2004. *Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación. 3a ed. Madrid - Barcelona - México: Mundi - Prensa, 716 p.*
- Takeuchi, H., Kato, H. & Kurahashi, T., 2013. *2,4,6-Trichloroanisoles is a potent suppressor of olfactory signal transduction. Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

United States of America. Vol. 110, n° 40, p. 16.235 - 16.240. [En línea]

<http://www.pnas.org/content/110/40/16235.full>

[Consulta: 18 agosto 2014].

Tortora, G. J., Funke, B. R. & Case, C. L., 2007. *Introducción a la Microbiología*. 9a ed.

Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 988 p.

Vinos y viñedos, 2010. *Limpieza de barriles de vino*. [En línea]

<http://urbinavinos.blogspot.com.ar/2010/01/limpieza-barriles-de-vino.html>

[Consulta: 20 octubre 2014].

Vinos y viñedos, 2012. *Utilización de ozono en bodega*. [En línea]

<http://urbinavinos.blogspot.com.ar/2012/04/utilizacion-de-ozono-en-bodega.html>

[Consulta: 20 octubre 2014].

ANEXO

Medidas sanitarias para prevenir el ingreso y producción de haloanísolos en bodegas

A.1 Recomendaciones para el envío de muestras para el análisis de haloanisoles

El INV, el INTI, y el CIATI, poseen laboratorios equipados para llevar a cabo estos análisis. El INTI Mendoza ha desarrollado y está validando una metodología analítica para la determinación de haloanisoles en vinos, asistiendo a la demanda de la industria vitivinícola local. El CIATI, que es el Centro de Investigación y Asistencia a la Industria Agroalimentaria, con sede en Villa Regina (Río Negro), realiza ensayos de la Química del Flavor donde se incluyen análisis de dichos compuestos.

Vinos

- Las muestras de vino deben ser enviadas en envases de vidrio con tapa a rosca debiéndose colocar una doble capa de papel de aluminio entre el envase y la tapa. Este papel no debe interferir en el buen cerrado de la rosca, se recomienda cortar el papel de aluminio del tamaño del diámetro de la tapa e insertarlo en su interior de forma que no haya papel entre la tapa y el envase en el sector de la rosca.
- Se debe consignar en el envase un rótulo de identificación de la muestra donde se incluya el grado alcohólico del vino.
- Si se desea realizar el análisis del corcho y del vino de uno o varios envases de una partida de vino ya fraccionado, cuando se sospeche contaminación por los corchos, se recomienda enviar los envases sin más manipulación. Si el envase ha sido abierto, el corcho no debe insertarse de nuevo en el mismo, y se deben enviar el vino y el corcho por separado.
- Los envases para el muestreo deben ser nuevos, previamente lavados con el siguiente protocolo:
 - Enjuagar con alcohol común dos veces.
 - Cepillar con agua caliente y detergente.
 - Enjuagar con abundante agua.
 - Secar en un lugar limpio.
 - Enjuagar dos veces con la muestra antes de llenarlo.
- El volumen mínimo requerido de muestra es de 50 mL.

Corchos, chips y cajas de cartón

- Se deben envolver con doble capa de papel aluminio, luego colocarlo en una bolsa de plástico lo más gruesa posible y cerrada herméticamente (si es

posible, envolver en film plástico de cocina antes de colocarlo en la bolsa). Hay que asegurarse que el papel de aluminio no se rompa y permita que los corchos o chips queden expuestos al plástico.

- Se recomienda muestrear 100 corchos al azar por lote.
- Se debe consignar en la muestra un rótulo indicando si son corchos naturales, tratados o no, colmatados, aglomerados, así como cualquier otro dato relevante.
- Para el análisis de los chips, enviar al menos 120 g de muestra del lote extraída al azar previa homogeneización del mismo.
- Para las cajas, si no es muy grande, enviarla completa, de lo contrario muestrear pedazos de cartón de distintas partes de la caja.

Barricas

- Se debe preparar una solución hidroalcohólica al 10 % utilizando un alcohol de buena calidad. Colocar en cada barrica 250 mL de esta solución, y dejarla por cuatro días agitando periódicamente para poner en contacto las paredes de la misma con la solución.
- Transcurridos los cuatro días, colocar la muestra de lavado en un envase limpio, tratando de dejar el menor espacio de cabeza posible, tapar con doble capa de papel de aluminio, cerrar bien, colocar dentro de una bolsa plástica bien cerrada y enviar para su análisis.
- Primeramente, chequear la solución hidroalcohólica antes de lavar la barrica, para descartar contaminación por haloanisoles en el alcohol o agua. Enviar a analizar de la misma forma que los vinos.

Monitoreo ambiental

- Se debe disponer de una fuente de vidrio tipo Pyrex, nueva, de 35 cm de diámetro por un centímetro de altura. Lavar la fuente con alcohol, abundante agua caliente y detergente neutro, enjuagar por último suavemente con alcohol. Tener la precaución de hacerlo en un lugar que se presuma libre de haloanisoles (nada de maderas, ni cartones, ni paredes con pintura descascarada; si hay aire acondicionado que no sea Split, mantenerlo apagado). No secar con papel ni repasador, dejar secar solo (por esto es importante que haya la mayor certeza de que el lugar está libre de haloanisoles).

- Preparar una solución de 10 grados alcohólicos con un vino blanco libre de haloanisoles (si se tiene duda del agua a utilizar, no diluir el vino, enviar la muestra con el dato del grado alcohólico del vino utilizado).
- Es muy importante calcular el volumen total de vino necesario, en función de cuántos ambientes se controlarán separadamente más el testigo y un margen ante cualquier accidente o error.
- Colocar 500 mL en la fuente, en un lugar libre de haloanisoles, dejar 10 a 30 minutos. Con una pipeta Pasteur nueva, homogeneizar y tomar como mínimo 50 mL en un envase limpio (limpiar de acuerdo al protocolo indicado para envases en el caso de muestras de vino), colocar doble capa de papel de aluminio en la tapa, cerrar y poner en bolsa de plástico. Esta muestra será entonces el testigo con el que se evaluará que tanto la bandeja como los materiales de lavado y el vino que se utilizarán en el estudio ambiental, estén libres de haloanisoles.
- Lavar nuevamente la bandeja y dejarla secar. Una vez seca envolverla en papel de aluminio y plástico por fuera y llevarla hasta el lugar a analizar (todo lo descrito hasta aquí es recomendable realizarlo fuera del establecimiento a analizar para evitar contaminaciones).
- Colocar otros 500 mL de vino y exponer el plato durante una hora en el lugar a analizar, tratando de muestrear diferentes puntos dentro de la misma sala si es muy grande o haciendo controles sucesivos si son ambientes separados o diferentes (es decir que se tendrá un testigo y una muestra de cada ambiente controlado).
- Pasada la hora de exposición, tomar al menos 50 mL utilizando pipeta Pasteur nueva, colocar en un envase tratando de no dejar espacio de cabeza (si se puede, volcar directamente en el envase con la precaución de no tocar con las manos el vino en el interior de la fuente), tapar con papel de aluminio, tapar y colocar en una bolsa de plástico para enviar a analizar.
- No dejar que el papel de aluminio toque las paredes internas de la tapa porque esto produce que el cierre no sea bueno. Cortar el papel de aluminio con un diámetro igual al interior de la tapa. También es importante que no quede tapa al descubierto en contacto con el vino.
- Cualquier instrumento que se utilice en la preparación de la muestra debe ser de vidrio o metal previamente lavado como las bandejas.

- No reutilizar en monitoreos ambientales posteriores material de vidrio que ha estado en contacto con soluciones de vino que contengan más de 3 ng/L de haloanisoles, descartarlo (CIATI AC. Centro de Investigación y Asistencia Técnica a la Industria Agroalimentaria - Asociación Civil, 2014).

A.2 Productos a utilizar para limpieza y desinfección

Como hemos visto, la presencia de anisoles en el vino puede atribuirse a distintos factores. Para erradicar este problema enológico se requiere la adopción como estrategia de un estricto control ambiental y de los materiales utilizados en la bodega, para eliminar potenciales fuentes de contaminación.

Limpieza es la eliminación de tierra, restos de alimentos, polvo, u otras materias objetables (Código Alimentario Argentino, 2010).

Desinfección es la reducción, mediante agentes químicos o métodos físicos adecuados, del número de microorganismos en el edificio, instalaciones, maquinarias y utensilios, a un nivel que no dé lugar a contaminación del alimento que se elabora (Código Alimentario Argentino, 2010).

A fin de aportar algo más a estas definiciones, se hace necesaria la incorporación de otro concepto importante a tener en cuenta, que es la higiene. Generalmente cuando se hace referencia a la higiene se la relaciona sólo con la limpieza que se realiza en forma diaria. Pero, este concepto adopta hoy en día una concepción mucho más amplia, entendiendo por higiene a todas las medidas tendientes a prevenir contaminaciones o, si ya se ha producido, a evitar su probable propagación. Tiempo atrás se utilizaban productos que tenían como objetivo lograr una limpieza adecuada, y luego de esta operación le seguía la desinfección. En la actualidad, el concepto de limpieza se une al de desinfección, con la existencia de productos que cumplen con esta doble finalidad, colaborando con el mantenimiento de ambientes que presentan condiciones favorables para la planta elaboradora y para las personas (Hidalgo Togores, 2011).

En enología, teniendo en cuenta la particular composición del vino, la higiene no tiene que ver realmente con la conservación de la salud del consumidor, porque no existe ese riesgo. En este campo, la higiene tiene que ver con la calidad y la estabilidad microbiológica del producto. Es una medida preventiva que tiende a limitar los riesgos de desviaciones microbianas que puedan generar gustos y olores desagradables o afectar la longevidad del vino.

La limpieza es la que se eliminan manchas visibles adheridas a una superficie, se realiza combinando métodos físicos y químicos adecuados. Para esto se utiliza agua, cuyo

poder de limpieza se aumenta con la presión, la temperatura o la presencia de detergentes. Como parte de un mismo proceso, la desinfección reduce el número de microorganismos vivos presentes, recurriendo a procedimientos físicos o químicos.

Higiene de recipientes de madera

El uso de barricas en la elaboración y crianza de los vinos es una práctica que se considera como un elemento muy favorable en la participación y evolución de los caracteres sensoriales de los vinos. Durante la crianza en barricas, los intercambios vino-madera enriquecen en aromas y sensaciones gustativas el producto, además de favorecer una microoxigenación que provoca una estabilidad física y química en el vino y de conferirle la delicadeza, equilibrio y complejidad aromática tan apreciadas por el consumidor (Palacios, *et al.*, 2012).

Es muy conocido el problema que existe con el deterioro de las barricas de roble y que incide negativamente en la calidad de los vinos que en ellas se crían. Este envejecimiento está determinado por la interrelación de varios factores: formación de depósitos de bitartratos, desarrollo bacteriano, reducción progresiva de la capacidad de oxidación, disminución del aporte de sustancias agradables al vino. Estos factores no son independientes, sino que unos son consecuencia de los otros. Esta situación afecta la calidad del vino que se ve mermada por la disminución de la microoxigenación que induce la estabilización del color, así como el detrimento en el desarrollo de sabores propios de la madera de roble, con la proliferación de depósitos de bacterias de difícil eliminación que se ocultan en la estructura interna de la madera y se manifiestan cuando las barricas están en pleno proceso de crianza contaminando el vino y ocasionando un aumento de la acidez del mismo.

Si se hace referencia específicamente a los recipientes de madera, se observa que diversas dificultades limitan su control higiénico. La conservación prolongada de dichos recipientes vacíos y en ambientes húmedos favorece el crecimiento de mohos que en presencia de fuentes de los precursores adecuados, hace posible la formación de cloroanisoles y bromoanisoles con la aparición de olores desagradables (Chatonnet, 2007).

Enólogos de bodegas de Mendoza, considerados informantes calificados señalaron que dentro de los defectos que aparecen durante el envejecimiento del vino, predomina el olor a moho; atribuible a compuestos del tipo tricloroanisoles, tetracloroanisoles y tribromoanisoles, declarado por el 100 % de los encuestados (Alturria, *et al.*, 2008).

Durante la vinificación y maduración, sobre todo para el caso de recipientes de madera, es imposible lograr la esterilización; es decir, la obtención de un medio absolutamente exento de microorganismos. La madera no es un material inerte, por esto se utiliza, por sus aportaciones al vino, por lo tanto, cualquier procedimiento de higiene debe

respetar su estructura y composición. Su microporosidad y su inercia, limitan la eficacia de los métodos de limpieza y desinfección (Chatonnet, 2007).

Los depósitos de tartrato durante la crianza se acumulan y sirven de refugio a los microorganismos. Se ha establecido que una barrica usada de 225 L contiene alrededor de 5 L de vino retenidos en los primeros milímetros de las duelas (Remirez & Palacios, 2012).

No es posible utilizar cualquier procedimiento, agente detergente o desinfectante para garantizar el mantenimiento de la calidad de las interacciones entre la madera y el vino, y a la vez la ausencia de residuos dañinos. Dentro de los diferentes medios de limpieza y desinfección aptos para la madera están:

-Enjuague. Su objetivo es acelerar el proceso eliminando los sedimentos poco adheridos o no adheridos a las superficies. Se utiliza agua fría a baja presión, porque para provocar el arrastre y el escurrido de los sedimentos no adheridos, lo más importante es el volumen de agua.

-Limpieza. Su velocidad y eficacia dependen de la presión y temperatura del agua de lavado.



Figura 42: Lavando barricas (Vinos y viñedos, 2010)

Limpieza a alta presión. El aumento de la presión y el uso de cabezas de lavado rotativo permiten aumentar la eficacia de la limpieza, acceder a casi la totalidad de la superficie a limpiar, y reducir el consumo de agua y el volumen de residuos. Cuanto más elevada sea la presión, más eficaz será el lavado, pero siempre se debe trabajar con presiones que no sean susceptibles de alterar la estructura de la madera. La temperatura de limpieza eficaz se encuentra entre 60 y 90 °C. De esta forma, y con un mantenimiento regular (por lo

Medidas sanitarias para prevenir el ingreso y producción de haloanisoles en bodegas

menos dos veces al año) es posible limpiar bien sin recurrir al empleo de detergentes químicos.

Utilización de detergentes químicos. Cuando los recipientes son grandes (cubas), no es tan fácil usar la alta presión, ya que debido a las dimensiones de los continentes es necesario que para su limpieza un operario penetre en su interior, pero la elevada presión y el agua caliente producen una niebla que hacen insoportable la permanencia en el recipiente. Conviene trabajar entonces a media presión y, tomando en consideración su volumen y superficie, recurrir a la ayuda de detergentes químicos para eliminar los sedimentos de tártaro y materias colorantes adheridas a la madera. La edad de los sedimentos también influye en la facilidad de la limpieza, así, el sedimento abundante de un vino joven es más fácil de limpiar que el de un vino ya limpio.

Los detergentes a utilizar sobre la madera deben respetar sus características, en este caso la limpieza es siempre superficial. Es imposible limpiar realmente la madera más allá de 0,5 a 1,5 mm de profundidad utilizando sólo agua a presión. La acción del detergente acelera la limpieza facilitando la desincrustación de los sedimentos presentes en la microporosidad de las duelas. Sin embargo, los detergentes nunca deben penetrar demasiado profundamente porque sería imposible su eliminación total.

En enología, los detergentes aptos para la eliminación de las manchas clásicas son principalmente alcalinos moderados, adecuados para niveles reducidos de suciedad, o fuertes, más adecuados para la eliminación de precipitados de tartrato abundantes. El detergente ideal, no existe; por lo tanto, para obtener un resultado satisfactorio es necesario asociar distintos productos.

-La soda cáustica o hidróxido de sodio es un potente alcalino que neutraliza los ácidos generando sales de sodio. Por sí misma no posee propiedades detergentes propiamente dichas, pero su alcalinidad permite la solubilización de todos los sedimentos de ácidos fuertes y débiles. La disolución en agua es exotérmica, por lo que debe aplicarse con medidas protectoras, es higroscópica, lo que dificulta su dosificado, y además es agresiva con la madera por lo que debe utilizarse en concentraciones bajas.

-Los fosfatos alcalinos, ortofosfatos (disódicos y trisódicos), pirofosfato tetrasódico y tripolifosfato pentasódico, son de muy controvertida utilización debido al fenómeno de la eutrofización. La eutrofización es un desarrollo intensivo de algas a expensas de la flora y la fauna del agua: plancton, peces. Los fosfatos desempeñan un papel de abono, y “nutren” los ríos y lagos provocando la proliferación de algas y, a la larga, la muerte de los peces. Los fosfatos conocidos desde hace tiempo por sus propiedades detergentes y anticalcáreas, pueden ser sustituidos por silicatos de aluminio complejos, las zeolitas, que no presentan los

inconvenientes de los fosfatos. En consecuencia, para la limpieza en general y la de recipientes de madera en particular, es aconsejable no utilizar detergentes fosfatados para contribuir a la protección del medio ambiente.

-El carbonato de sodio no se disuelve bien en agua fría, es un alcalino medio, neutraliza todos los ácidos dando sales de sodio y desprendiendo dióxido de carbono, es poco higroscópico y se adapta bien al mantenimiento de recipientes de madera poco sucios.

-Los silicatos que se encuentran en el mercado son una mezcla de distintos compuestos. Sus interesantes propiedades detergentes se deben en parte a la facilidad con que los silicatos se adsorben sobre las superficies, pero resulta muy difícil su desorción dejando residuos blancos.

-Los agentes de superficie (tensioactivos), gracias a su acción sobre la tensión superficial del agua, aceleran la velocidad de la limpieza permitiendo la humectación, la hidratación y el rápido desprendimiento de las manchas incluso antes de su completa disolución por los elementos minerales contenidos en la solución detergente. Su acción también es muy importante en desinfección porque son los tensioactivos los que permiten el contacto entre los principios desinfectantes y los microorganismos a destruir. Existen cuatro tipos de tensioactivos diferentes: no iónicos, aniónicos, catiónicos y anfóteros. Aparte de los tensioactivos aniónicos fosfatados, que deberían evitarse por su poder eutrofizante, no hay una molécula más adecuada a la madera que otras, su elección deberá realizarse en base a las condiciones de utilización, básicamente temperatura y pH.

-Los complejantes (minerales u orgánicos), también llamados secuestrantes o quelantes, tienen la función anti-tártaro; “secuestran” los cationes metálicos y los obligan a unirse a los aniones en forma de sales insolubles. Entre los cationes están: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Al^{3+} . Los complejantes a emplear deben seleccionarse en relación al pH de utilización y al metal a complejar.

Prácticamente todas las fórmulas de detergentes industriales contienen complejantes, pese a haber sido diseñados para resistir las aguas duras, los agentes tensioactivos son mejores detergentes en agua dulce o desmineralizada.

-Desinfección.

-Desinfección por vías químicas. Tradicionalmente se utiliza el dióxido de azufre, que puede producirse por la combustión de una mecha o de pastillas de azufre, o introducirse directamente en forma gaseosa. Pese a su antigüedad, el empleo de dióxido de azufre es eficaz tanto para proteger al vino como a la madera frente a contaminaciones de bacterias y levaduras no deseadas. También el azufre es eficaz para conservar las barricas usadas vacías, pero es necesario repetir regularmente el sulfitado en función de las condiciones de

almacenamiento. Una atmósfera seca favorece la entrada de aire y la pérdida del antiséptico, pero también limita el crecimiento de gérmenes al disminuir la actividad del agua (a_w); una atmósfera húmeda permite conservar mejor el dióxido de azufre gracias a una mejor estanqueidad de las barricas, pero no limita el eventual crecimiento de los gérmenes residuales por la deshidratación del medio. Quemar una cantidad demasiado grande de azufre de una sola vez no es conveniente, porque la combustión será incompleta (disminución del oxígeno disponible y extinción de la combustión por el dióxido de azufre); la combustión de varias dosis pequeñas o la inyección de gas son mucho más eficaces.



Figura 43: Empleo del sulfuroso en la desinfección de barricas (Chávarri Mardones, 2012)

-Los desinfectantes químicos intervienen destruyendo los microorganismos por oxidación de sus componentes celulares, por lisis o alteración de las membranas celulares, o por interacción letal con componentes celulares. Entre los distintos desinfectantes químicos existentes, sólo unos pocos se pueden emplear en enología y en contacto con la madera.

-Los oxidantes halogenados (cloro, cloraminas y iodóforos) no se pueden utilizar en contacto con madera por las razones expuestas anteriormente en el caso del cloro y por la reducida eficacia de los iodóforos en contacto con una masa de materia orgánica como es la madera. El formaldehído ha sido ampliamente usado para la conservación prolongada de recipientes de vino vacíos mediante fumigación. Sin embargo, la toxicidad del formol aconseja su abandono ya que es un producto sospechoso de propiedades cancerígenas. Los alcoholes deben utilizarse en altas concentraciones, tienen poco o nulo efecto contra las levaduras, caros e inflamables. Los jabones anfolitos precisan de una elevada concentración para ser eficaces y forman mucha espuma, lo que dificulta su aclarado.

Los desinfectantes químicos más utilizables son los oxidantes no halogenados y los amonios cuaternarios.

Dentro de los oxidantes no halogenados están: el peróxido de hidrógeno, las sales de peróxidos, el ácido peracético, el permanganato de potasio y el ozono.

-El peróxido de hidrógeno, o agua oxigenada, se encuentra en el mercado en forma líquida. Para ser eficaz, necesita un tiempo prolongado de contacto. El oxígeno activo se libera a pH neutros o ácidos a partir de 60 °C. La presencia de madera como materia orgánica limita su eficacia desinfectante; es activo contra todas las bacterias, pero menos contra las levaduras, los mohos y las esporas.

-Las sales de peróxidos producen soluciones de oxígeno activo comparables al peróxido de hidrógeno líquido con la ventaja que se pueden preparar justo en el momento de usar, siendo más estables.

-En comparación con el agua oxigenada clásica, el ácido peracético presenta un efecto esporicida y antilevaduras más importante y sin necesitar una temperatura tan elevada para ser activo. Tiene además una eficacia superior y obtenida con tiempos de contacto más reducidos, una temperatura más baja, a una concentración más baja, y una mayor estabilidad. Se descompone en oxígeno y ácido acético, pero a las concentraciones empleadas, el riesgo de residuos excesivos de ácido acético es nulo. El producto diluido es fácilmente aclarable y es inodoro. Su utilización debe evitarse en contacto con el bronce, pero no corroe el aluminio ni el acero inoxidable.

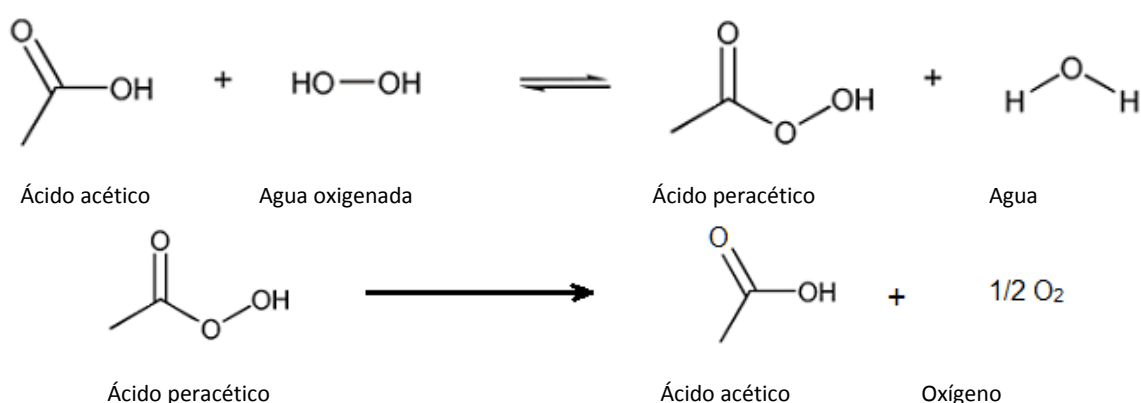


Figura 44: Formación y descomposición del ácido peracético (Chatonnet, 2007)

-El permanganato de potasio (KMnO_4) se utiliza desde hace mucho tiempo en la desinfección de continentes de vino. Posee propiedades oxidantes importantes en medio ácido, por lo que se utiliza sobre todo como desodorante, pero sus propiedades desinfectantes son bastante limitadas en comparación con los oxidantes ya citados y además necesita tiempos de contacto bastante largos. Colorea el agua de rosa, pero en soluciones diluidas no provoca cambios de color de la madera. Sus residuos producen contaminación por el manganeso.

-El ozono (O_3) es un gas con propiedades oxidantes muy potentes de gran utilidad para la desinfección del agua potable y además de uso enológico. Debido a su vida relativamente corta, el ozono siempre se genera "*in situ*" mediante un generador de ozono. Hay dos grandes fuentes de generación de ozono: las luces UV y las descargas eléctricas (corona). La generación de ozono mediante descarga corona es la más habitual hoy. El ozono se produce a partir del oxígeno como resultado directo de la descarga eléctrica que rompe la molécula estable de oxígeno, liberando dos átomos de oxígeno y calor. Estos átomos de oxígeno se combinan con moléculas de oxígeno para formar ozono.

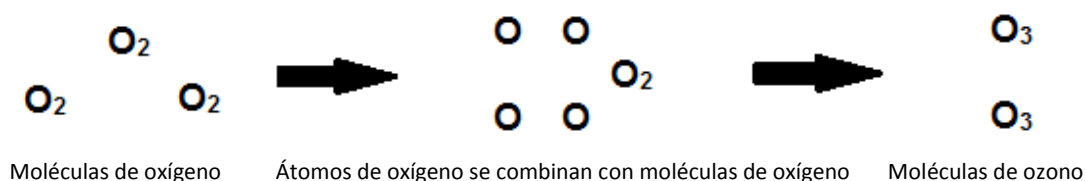


Figura 45: Generación de ozono (O_3) (Chatonnet, 2007)

El ozono es un gas muy oxidante, tóxico y explosivo. Por eso su utilización se realiza después de la disolución en agua fría a la salida de la célula de descarga. El ozono produce una desinfección rápida a pH neutro por acción directa del O_3 y de sus productos de degradación en el agua, especialmente los radicales libres O^* y HO^* . Su principal modo de acción se da por la oxidación directa de las membranas celulares de los microorganismos, permitiendo que los constituyentes celulares salgan al exterior de la célula. Sin embargo, los daños producidos por el ozono sobre los microorganismos no se limitan a la oxidación de su membrana; el ozono también causa daños a los ácidos nucleicos (ADN y ARN), con la ruptura de enlaces carbono-nitrógeno, lo que da lugar a una despolimerización. Los microorganismos, por lo tanto no son capaces de desarrollar inmunidad al ozono como hacen frente a otros compuestos.



Figura 46: Utilización de ozono en bodega (Vinos y viñedos, 2012)

El ozono es sólo un desinfectante, constituye una técnica muy eficaz para el tratamiento en frío de las cubas de acero inoxidable, de resinas epoxi, de las canalizaciones, de la línea de embotellado. Sin embargo, su rendimiento se ve afectado negativamente cuando hay una carga microbiana elevada. En el caso de los recipientes de madera, debido a que la superficie a tratar es orgánica, ésta reacciona con el ozono, por lo tanto el tratamiento sólo es eficaz a nivel superficial. El ozono no puede penetrar ni actuar en profundidad en el interior de la madera, porque el propio material a tratar lo “consume”, en parte.

En definitiva, entre las materias activas oxidantes disponibles, las sales de peróxidos y el ácido peracético son las más apropiadas para la desinfección de la madera.

Adaptando los tiempos a las condiciones de trabajo y al grado de suciedad, todo protocolo de higiene debe seguir las siguientes etapas:

- Enjuague con agua fría a baja presión, para eliminar los sedimentos más grandes no adheridos.
- Limpieza en caliente (60 – 80 °C). A alta presión con una cabeza rotativa, con ayuda o no de detergente alcalino a base de carbonato de sodio para una suciedad media o de hidróxido de sodio si hay un tártaro grueso. A baja presión con cabeza de lavado y en reciclado para el caso de recipientes grandes.
- Enjuague rápido con agua.

- Desinfección a base de peróxido, en medio neutro o ácido, en lavado a alta presión para los continentes pequeños o a baja presión para los grandes.
- Enjuague rápido con agua a baja presión.
- Enjuague final con agua sulfatada (Chatonnet, 2007).

Sin la intervención del agua sulfatada, la acidez del nuevo vino aumentaría en detrimento de la calidad (Vinos y viñedos, 2010).

- Ecurrido si el procedimiento se para en esta etapa antes de azufrar, si no puede realizarse luego una desinfección térmica.

-Desinfección por vías físicas. La desinfección térmica permite evitar el empleo de sustancias químicas exógenas. La fase de limpieza previa, con o sin la ayuda de detergentes, no precisa de una temperatura superior a 80 °C. Al contrario, a partir de este nivel ciertos compuestos pierden su eficacia (amonios cuaternarios). Pero, para garantizar la eliminación de los gérmenes presentes en la superficie y más en profundidad, en el interior de las duelas, la aplicación de una temperatura elevada asegura la eficacia reduciendo la duración del tratamiento. Si bien, sobre la madera no se puede utilizar una temperatura demasiado elevada durante mucho tiempo, porque produciría la alteración del continente. El tratamiento térmico de la madera puede realizarse bien con agua caliente (entre 85 – 90 °C), con vapor fluyente (105 – 120 °C), pero difícilmente con vapor recalentado (más de 160 °C). El principal interés de la desinfección térmica es poder acceder a capas profundas de la madera que son inaccesibles a los tratamientos químicos. Sin embargo, dada la naturaleza de la madera que no conduce el calor, la desinfección térmica es muy lenta.

Todos los casos de desinfección térmica de la madera requieren de tiempos de tratamiento prolongados para ser eficaz.

También es posible calentar la madera mediante radiaciones de alta frecuencia, el calentamiento se realiza en seco sobre la barrica drenada, después de la limpieza. Permite el calentamiento de la madera desde el centro de las duelas, a través de la excitación del agua contenida en el material. Con la barrica puesta en rotación y en contacto con las aplicaciones de ondas, se puede calentar la madera en profundidad acelerando la vibración atómica de las moléculas dipolares y de las moléculas de agua presentes en la madera y en las células de los microorganismos, produciendo su destrucción por efecto térmico directo o indirecto (Chatonnet, 2007).

La gran ventaja de la aplicación de microondas es que inactiva los microorganismos sin calentar la madera. El máximo de temperatura en el exterior de las duelas no supera los 45 °C, por lo que es un tratamiento térmico muy inofensivo frente a la composición de la madera (Palacios, *et al.*, 2012).

Los procedimientos de desinfección térmica se usan en las instalaciones de crianza más nuevas, lo habitual es que sólo se realice una desinfección superficial. Si existen contaminaciones con levaduras, la duración del tratamiento debe alargarse para garantizar una desinfección profunda de la madera.

-A fin de lograr la eliminación de la fracción más sucia y agotada de las barricas, puede realizarse también el cepillado de las duelas. La técnica se basa en la eliminación de una capa de madera, de 1 a 2 mm como máximo, en aquellas barricas en las que se ha formado un depósito sobre las paredes y el fondo. Luego de este proceso el vino tiene fácil acceso a la capa más profunda de la madera, las aportaciones de compuestos extraíbles como los taninos elágicos, indispensables para la evolución oxidativa, son más intensas. Sin embargo, el cepillado superficial, de 0,5 a 1 mm, modifica muy poco el aporte de sustancias volátiles y odorantes, dado que a este nivel de cepillado, las sustancias de las capas de madera descubiertas ya han sido extraídas por el vino. Además, este proceso, no permite desinfectar la madera.

-El arenado, la inyección de arena fina al interior de la barrica, mediante un dispositivo adaptado a su boca, permite rebajar la superficie de la madera eliminando la mayoría de los sedimentos que se han precipitado sobre las duelas y también la capa de madera que ha absorbido esos sedimentos. Después del tratamiento, mejora la interacción del vino con las capas más profundas, y la evolución oxidativa, no sólo porque el oxígeno penetra mucho más fácilmente a través de la duela, sino porque las capas de madera más ricas en taninos elágicos indispensables para las reacciones de oxidación vuelven a estar en contacto con el vino. El arenado de la madera no produce ningún tipo de desinfección, no permite eliminar todos los sedimentos, por lo tanto es necesario combinar esta técnica con otros métodos físicos y/o químicos.

-El calentamiento de las capas de madera puestas al descubierto propone aportar nuevos compuestos volátiles y odorantes producidos por la degradación térmica de la madera. El calentamiento de la barrica usada tras su cepillado permite efectivamente aportar de nuevo productos aromáticos típicos de la madera aumentando considerablemente la complejidad de la cata. Pero, al mismo tiempo, se detecta la presencia de proporciones más elevadas de numerosos fenoles volátiles, que no provienen en su totalidad de la degradación térmica de la lignina de la madera; algunas de estas moléculas las produce el calentamiento de los polifenoles del vino impregnados en la duela y comunican al vino conservado en estos recipientes un carácter aromático particular y desagradable, a "quemado" o "ahumado". En resumen, el tostado de las barricas usadas puede producir una desinfección profunda con

aspectos positivos, pero también puede provocar en el vino resultados desagradables a nivel sensorial (Chatonnet, 2007).

Como conclusión:

- El mantenimiento de las barricas para el vino es una tarea indispensable tendiente a incrementar y mejorar la calidad de los vinos a corto, mediano y largo plazo.
- La conservación en recipientes limpios y desinfectados permite al vino desarrollarse de manera armoniosa a lo largo de su proceso de envejecimiento en botella sin necesidad de tratamientos previos. En caso contrario, será necesario estabilizarlo de forma enérgica en el momento del embotellado para evitar la alteración de su calidad.
- Es indispensable respetar reglas simples y elementales para conseguir una limpieza y desinfección eficaces. Incluso si se ha realizado un trabajo perfecto, la desinfección es siempre temporal.
- No es posible esterilizar la madera y su estructura particular hace difícil una desinfección perfecta.
- Cuando se ha realizado de manera química, la desinfección no es sino superficial, ya que es imposible hacer penetrar los agentes desinfectantes profundamente sin riesgo de dejar residuos peligrosos o de alterar la calidad de las interacciones madera-vino.
- Únicamente los procedimientos térmicos más nuevos permiten eliminar la contaminación profunda, pero es necesario el empleo de tecnología y procesos de trabajo lentos.
- Las técnicas de renovación de las barricas que consisten en la eliminación, mediante procedimientos físicos de la capa superficial de las duelas en contacto con el vino, producen una limpieza más profunda pero no desinfectan.
- Los intercambios madera-vino son, sin duda, mejorados, pero no recuperan los niveles de las barricas nuevas.
- Si no se controla la higiene de los recipientes de madera, o si no se puede controlar, es preferible evitar la madera como material de conservación. Los riesgos de alteración son demasiado importantes y aumentan exponencialmente con el envejecimiento del material.

- En enología, la higiene de los continentes de madera debe atender a controlar la limpieza y desinfección, mejorando los aportes de la madera de roble en el transcurso del tiempo (Chatonnet, 2007), (Palacios, *et al.*, 2012).