

ELABORACIÓN DE VINOS BLANCOS Y TINTOS CON PLATA COLOIDAL COMO ALTERNATIVA AL USO DE SO₂ EN ENOLOGÍA.

Investigador Responsable: Dr. D. Pedro Miguel Izquierdo Cañas.

Investigadores: Dr. Esteban García Romero, Dr. Sergio Gómez Alonso, Laura García Martín

Acuerdo de Investigación con: Laboratorios Argenol.

Financiación: 11.200,00 €. Año 2010: 9.200,00 €

Duración: 2009-2011

1. INTRODUCCIÓN

El dióxido de azufre (SO₂) es un compuesto químico de trascendental importancia en enología por sus muchas y complejas propiedades. Hasta la fecha es un aditivo prácticamente irremplazable en Enología y, pese a sus desventajas, sólo se ha conseguido reducir las dosis de empleo. En los mostos y vinos son de destacar las siguientes propiedades:

-Inhíbe el crecimiento de levaduras y bacterias de manera que la fermentación no se produzca de forma tumultuosa e incontrolada. Se ha probado que su acción antiséptica es selectiva y actúa específicamente contra bacterias acéticas y lácticas e inhibe el crecimiento de levaduras apiculadas a concentraciones por debajo de 50 mg/L mientras que las levaduras elípticas, especialmente *S. cerevisiae* presentan alta resistencia, sobreviviendo a niveles de 1200 mg/L (Lustrato et al. 2003).

-Efecto antioxidante protegiendo al mosto del oxígeno del aire ya que el SO₂ por su carácter reductor lo acapara.

-Destruye las oxidasas de la uva (tirosinasa, presente en todas las uvas, en mayor medida que la lacasa, que aparece en uvas podridas) enzimas catalizadoras de la oxidación de los fenoles y el aroma de los mostos (Romano et al. 1993).

-Facilita la extracción de fenoles y materias colorantes de las células del hollejo de la uva durante la maceración y estabiliza el color del vino durante la crianza (Bakker et al. 1998).

-Activa las reacciones de transformación de glucosa y fructosa de la uva en alcohol.

Las propiedades del sulfuroso en los vinos, además de las anteriores, se pueden enumerar como:

- Se observan mejoras gustativas al unirse con el acetaldehído lo que evita el aroma a oxidación de éste. La frescura se conserva e incluso mejora.
- Actúa como antiferménto y asegura la estabilidad microbiana del vino en su estancia en bodega y/o botella.

En el vino se autoriza su utilización en proporciones muy pequeñas (200 mg/l en vinos blancos secos, 160 mg/l en vinos tintos secos). El sulfuroso se encuentra en el vino bajo dos formas: sulfuroso combinado inactivo y sulfuroso libre; este último es el que ejerce las acciones positivas antes comentadas.

No obstante, el sulfitado en la vinificación puede tener también consecuencias desfavorables como retrasar o impedir la fermentación maloláctica, decolorar parcialmente el vino tinto debido a que al unirse el SO₂ a los antocianos éstos pierden su color rojo. También puede originar, metabolizado por las levaduras sabores y olores a sulfhídrico y mercaptano y si la dosis de SO₂ adicionada es demasiado elevada el vino adquiere un olor picante característico de este producto y un dejo desagradable.

Por otro lado se ha demostrado que la presencia de sulfitos en alimentos puede dar lugar a reacciones pseudoalérgicas con la aparición de broncoespasmo, urticaria y broncoconstricción

(Gastaminza et al., 1995). La legislación relativa a la presencia de este compuesto en alimentos y su etiquetado es cada día más restrictiva, la World Health Organization (WHO) ha recomendado limitar en lo posible o incluso suprimir completamente el uso del SO₂ (WHO, 2009) y la OIV ha establecido límites precisos para el contenido de este compuesto en vinos comerciales (OIV, 2011). Además la legislación de la Unión Europea establece normas de etiquetado precisas para los productos alimenticios que contengan SO₂ (Reglamento (CE) N° 1333/2008; Directiva 2003/89/CE).

Estos hechos han propiciado la investigación de sustancias o técnicas alternativas al uso del SO₂ que tengan similares propiedades antisépticas pero sin producir los negativos efectos en la salud humana. Se han ensayado corrientes eléctricas (Low Electric Current –LEC-, Lustrato et al. 2003), campos eléctricos pulsados (Pulsed Electric Field –PEF-, Garde-Cerdán et al. 2008) y el uso de lisozima y taninos enológicos combinados o por separado (Sonni et al. 2008).

El empleo de la plata como biocida es conocido desde hace más de 20 siglos. Ya las antiguas civilizaciones griegas y romanas utilizaban recipientes de plata para conservar la leche y el vino. Posteriormente, en las cruzadas, era una práctica habitual añadir una moneda de plata en los recipientes con el fin de conservar los líquidos. En el siglo XIX su uso en medicina estaba ampliamente generalizado (Silver et al. 2006), pero cuando se descubrió la penicilina y comenzó la era de los antibióticos el uso de la plata por sus propiedades antimicrobianas descendió (Klasen 2000a).

Sin embargo los problemas derivados de la aparición de cepas resistentes a los antibióticos ha hecho que se renueve el interés por la plata, especialmente en forma de nanopartículas como agente antibiótico (Klasen 2000b). Estudios recientes han mostrado que las nanopartículas de plata tienen efectos antibióticos frente a un amplio espectro de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas y también presentan cierta actividad antifúngica y antiviral.

Los mecanismos de actuación más comúnmente aceptados por los que la plata ejerce su acción tóxica son varios (Marambio-Jones et al. 2010). Por un lado actúa sobre las enzimas respiratorias y los componentes del sistema microbiano de transporte de electrones. También se adhiere a la superficie bacteriana, alterando las funciones de membrana (Percival y col. 2005) y a las bases del ADN, inhibiendo la replicación celular (Wright y col. 1994). También puede actuar por generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) que produce daños en las estructuras de las células por estrés oxidativo. Algunos autores han demostrado su efecto tóxico sobre distintos serotipos de *Escherichia coli* y *Streptococcus faecalis* (Zhao y Stevens 1998; Sondi y Salopek-Sondi 2004).

Actualmente, los compuestos de plata se están empleando en multitud de aplicaciones para controlar la proliferación microbiana (Wadhwa y Fung, 2005). Algunos ejemplos de sus aplicaciones son el recubrimiento de catéteres y material quirúrgico, la preparación de compuestos sintéticos para odontología, el tratamiento de quemaduras, la medicina homeopática e incluso depuración de aguas (Spencer 1999; Klasen 2000; Wadhwa y Fung 2005; Atiyeh et al., 2007; Hwang et al., 2007).

En los años 50 se llegó a emplear la plata coloidal como aditivo zootécnico en dietas para avicultura, pero su elevado coste de producción en esos años impidió que pudiera competir con el menor coste de los APC (Aditivos Promotores del Crecimiento). Sin embargo, como consecuencia de la entrada en vigor en enero de 2006 de la prohibición por parte de la Unión Europea del uso de antibióticos como promotores del crecimiento (APC) en dietas para animales en producción, la utilización de la plata metálica ha vuelto a surgir como una importante alternativa debido a los efectos positivos que se han observado (Fondevila et al. 2009).

En los últimos años, el mayor efecto antimicrobiano de las partículas de plata metálica y su mayor estabilidad, han priorizado el uso de esta forma de plata frente a sus distintas sales, como

nitrate, sulfate or chloride (Atiyeh et al., 2007). In vitro, it has been demonstrated the antifungal (Wright et al., 1999) and antibacterial (Yin et al., 1999) effect of silver particles, even against antibiotic-resistant bacteria (Wright et al., 1998).

It has been demonstrated in different assays that silver metal acts as an inert metal without reacting with the mucous membranes of the human organism, so that, once it performs its biocidal function by contact, it is eliminated by natural ways without being retained. According to Lansdown, due to the fact that silver in its metallic form is inert and not absorbed by eukaryotic cells of mammals (2006), the toxic effect that silver exerts on humans is null.

In the food industry silver nanoparticles are being used for the purification of water (Pradeep et al. 2009) and for the design of new packaging systems with antimicrobial properties (Tankhiwale et al. 2010).

The use of silver metal or its compounds in food and pharmaceutical products, is regulated by different norms:

- Colloidal Silver: compound described and defined in the European Pharmacopoeia, being recognized as an active principle and ingredient in pharmaceutical products. European Pharmacopoeia 5.3, 01/2006:2281
- Colloidal Silver: compound catalogued by the FDA with the n° of Food Additive Master File (FMF) N° 830.
- Silver metal (E-174): according to Regulation (CE) 1465/2009, accepted as a colorant in food products.
- Silver chloride: according to the Resolution of the OIV/OENO 145/2009, it is accepted the treatment with Silver chloride to reduce the defects of aroma due to hydrogen sulfide and to some mercaptans.
 - According to the WHO, it is permitted a consumption of 0.1 mg /liter per day (Guidelines for Drinking-Water Quality, 2nd Edition, 1993)

2. OBJETIVOS

In this project it is planned to study the use of silver metal in the form of silver nanoparticles deposited on kaolin, (called silver colloidal kaolin (CPC), also silver colloidal complex) as a microbicide substitute for SO₂ in the elaboration of wines.

During the years 2009 and 2010 different experimental vinifications were carried out comparing the use of CPC with that of SO₂, adjusting different experimental parameters and using different techniques usually employed in the current enology.

3. ACTIVIDADES REALIZADAS

3.1. Elaboraciones

In the harvests of 2009 and 2010 different vinifications were carried out on a pilot scale with the varieties of red grape Monastrell (2009) and Tempranillo (2010) and white grape Merseguera (2009) and Airén (2010). All the assays were carried out in duplicate.

3.1.1. Elaboraciones de vino blanco

The fermentations were carried out in a volume of about 100 liters of must and were carried out in stainless steel tanks of 125 L capacity at a temperature of 17 °C. It was used

como cultivo iniciador la cepa de levadura seleccionada en el IVICAM y comercializada por la empresa Lallemand denominada Uvaferm VN. Las dosis de SO₂ utilizadas en este caso fueron de 80 mg/L, mientras que las de CPC fueron 1 g/kg. Diariamente se controló la evolución de la densidad. Cuando ésta era del orden de 1005, se realizó el descube. Los vinos terminaron de degradar los azúcares a temperatura ambiente de la bodega y el final de la fermentación alcohólica se puso de manifiesto determinando el contenido en glucosa y fructosa.

Una vez acabada la fermentación alcohólica, se trasegaron los vinos determinándose el contenido en sulfuroso libre en aquellos en los que se habían tratado inicialmente con este conservante y se corrigieron a 30 mg/L de SO₂. En el caso de los vinos tratados con CPC, tras el primer trasiego se llevaron inmediatamente a refrigeración a 5 °C. Los vinos usados como control también se mantuvieron a 5 °C.

Posteriormente los vinos fueron nuevamente trasegados y estabilizados a -5°C, tras lo cuál volvió a corregirse el sulfuroso libre a 30 mg/L en los vinos en los que se había empleado este conservante, se filtraron amicrobicamente y se embotellaron.

En el año 2010 se completó el experimento realizando vinificaciones adicionales. En primer lugar se empleó el aditivo CPC en distintas dosis, 1 gr/L y 0,1 gr/L (CPC-1 y CPC-0,1). También



se utilizó el aditivo CPC en dosis de 1g/L pero en distintas formas de dosificación, adicionado en su totalidad en los mostos (CPC-1), añadido 0,5 g/L en mostos y 0,5 g/L al final de la fermentación alcohólica (CPC-0,5+0,5) y por último en bolsa o infusión (CPC-1-infusión). En último lugar también se ha estudiado el efecto combinado del producto CPC junto con la acción antioxidante del ácido ascórbico (CPC-1+ascórbico).

Imagen 1: Elaboraciones de vinos blancos

3.1.2. Elaboraciones de vino tinto

Las uvas se vendimiaron en cajas de 20 kg, se despalillaron y estrujaron, y la pasta (mosto más orujo) se dividió en las fracciones correspondientes, de 110 kg cada una. En el año 2009 se realizó un control adicionando a la pasta dosis de 50 mg/Kg de SO₂, y se comparó con la vinificación a la que se añadió 1 g/Kg de CPC, según las instrucciones del fabricante.

La fermentación-maceración se llevó a cabo en depósitos de acero inoxidable a una temperatura de 22°C. Se empleó como cultivo iniciador la misma cepa de levadura empleada en las vinificaciones en blanco. Diariamente se realizaron remontados y se controló la evolución de la densidad. Cuando ésta era de aproximadamente 995 g/L, se llevó a cabo el descube. Los vinos terminaron de degradar los azúcares a temperatura ambiente de la bodega y el final de la fermentación alcohólica se puso de manifiesto determinando el contenido en glucosa y fructosa.

Una vez acabada la fermentación alcohólica, se trasegaron los vinos y se provocó la fermentación maloláctica en todos ellos, sembrándose con una cepa comercial de *Oenococcus oeni* (cepa PN4 comercializada por Lallemand). La fermentación maloláctica se realizó a una temperatura de 20°C, efectuándose controles periódicos de la evolución del ácido málico. Una vez degradado el ácido málico se llevó a cabo el segundo trasiego, determinándose el contenido en sulfuroso libre en los vinos en los que se habían tratado inicialmente con este conservante y se corrigieron a 30 mg/L de SO₂. En el caso de los vinos tratados con CPC, tras el segundo trasiego

se llevaron inmediatamente a refrigeración a 5°C. Los vinos usados como control también se mantuvieron a 5°C.

Posteriormente los vinos fueron nuevamente trasegados y estabilizados a -5°C, tras lo cuál volvió a corregirse el sulfuroso libre a 30 mg/L en los vinos en los que se había empleado este conservante, se filtraron amicrobicamente y embotellaron.

En la vendimia de 2010 se repitió el mismo esquema experimental al que se le añadieron los mismos ensayos realizados en los vinos blancos a excepción del ensayo de producto CPC combinado con ácido ascórbico.

Por la particularidad de las elaboraciones de vino tinto se incluyó en este caso un nuevo ensayo en el que se comparaba los vinos elaborados con CPC-1 en los que la fermentación maloláctica se realizaba de manera secuencial y en coinoculación (CPC-1-coinoculación).



Imagen 2: Elaboraciones de vinos tintos

3.2. Recuentos microbiológicos

Los recuentos microbiológicos se hicieron en diferentes momentos del proceso, al inicio de la fermentación alcohólica tras la inoculación con la cepa de levadura comercial, en plena fermentación tumultuosa y a final de la fermentación alcohólica. En el caso de los vinos tintos también se realizaron recuentos durante la fermentación maloláctica. Todos los recuentos se expresaron en unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL).

3.2.1. Levaduras

Se tomaron muestras de los mostos en fermentación en condiciones asépticas y tras hacer diluciones seriadas en solución salina se sembraron en Agar Extracto de Malta. Las placas se incubaron en aerobiosis a 30 °C durante dos días.

3.2.2. Bacterias lácticas

Se tomaron muestras de los mostos en fermentación en condiciones asépticas y tras hacer diluciones seriadas en solución salina se sembraron en Agar MLO al que se le adiciono un 10% (v/v) de zumo de tomate, 50 mg/mL azida sódica y 100 mg/mL de cicloheximida para inhibir el crecimiento de bacterias acéticas y levaduras respectivamente. Las placas fueron incubadas en anaerobiosis a 30 °C durante cinco días.

3.2.3. Bacterias acéticas

Se tomaron muestras de los mostos en fermentación en condiciones asépticas y tras hacer diluciones seriadas en solución salina se sembraron en Agar GYC (5% glucosa, 1% extracto de levadura, 0.5% de carbonato cálcico) al que se le añadió 100mg/L de piramicina para inhibir el crecimiento de las bacterias lácticas. Las placas se incubaron en aerobiosis a 30 °C durante cinco días.



Imagen 3: Colonias de bacterias acéticas

3.3. Métodos de análisis químico

3.3.1. Análisis de parámetros físico-químicos

Los parámetros fisicoquímicos habituales en mostos y vinos se analizaron de acuerdo con los métodos oficiales de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2004): grado Baumé, alcohol, masa volúmica, pH, acidez total, acidez volátil, glucosa+fructosa, ácido L-málico y ácido L-láctico, concentración de plata.

El contenido en Plata se determinó mediante espectrometría de absorción atómica con cámara de grafito y corrección por efecto Zeeman en un equipo modelo AA240Z de la marca Varian.

3.3.2. Análisis de los compuestos relacionados con la estructura fenólica y el color

Los *Antocianos* se analizaron mediante el método de decoloración por el ácido sulfuroso (Ribereau-Gayon y Stronestreet, 1965). Los *Polifenoles Totales* se obtuvieron por medida de la absorbancia a 280 nm tras la dilución conveniente de la muestra (Somers y Evans 1976). Por su parte los *Flavan-3-ol totales* (Procianidinas) se determinaron según el método de reacción con el dimetilaminocinamaldehído (DMACH) y medida a 640 nm (Ángel y Glories, 1991; Vivas et al. 1994) y los *Taninos* mediante hidrólisis ácida catalizada por sulfato férrico, estabilización con 1-butanol y medida a 550 nm (Porter et al., 1986).

Los parámetros CIELab: a*, b*, L*, C*, y H* se analizaron en un espectrofotómetro de array de diodos Agilent-8453 con un programa de tratamiento de espectros propio del laboratorio. Las condiciones de medida fueron las aconsejadas por el método oficial OIV. Los resultados se expresaron referidos a 1 cm de paso óptico (OIV, 2006).

Los parámetros de color convencionales de bodega, Intensidad Colorante y Tonalidad, definidos como la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm y la relación de las absorbancias a 420 y 520 respectivamente, se analizaron según los métodos internacionales (Sudraud, 1954; Glories, 1984). El color total del vino tinto (TWC: Total Wine Color) y las contribuciones de la copigmentación y de la polimerización al color se han analizado según el método de Boulton, 2001)

3.3.3. Análisis de los compuestos volátiles

Los compuestos volátiles se analizaron mediante GC/MS en un cromatógrafo de gases TraceGC ultra acoplado a un espectrómetro de masas DSQ II con fuente de ionización de impacto electrónico y analizador cuadrupolar, equipado con un inyector automático TriPlus, todo de la marca ThermoQuest. Condiciones de trabajo del detector fueron: voltaje del detector: 250 V., corriente de emisión: 150 μ V., energía de impacto: 70 eV., rango de barrido de masas 39-400 uma.

Los compuestos separados se indentificaron por su espectro de masas y por sus tiempos de retención cromatograficos usando estándar comerciales. La cuantificación se realizó en base a los fragmentos m/z característicos de cada compuesto empleando el método del patrón interno. Los compuestos de los que se carecía de patrón comercial se expresan como área de compuesto respecto a área de patrón interno.

3.3.3.1. Compuestos volatiles mayoritarios

Para determinar los compuestos volátiles mayoritarios se destilaron 200 mL de vino mediante arrastre de vapor hasta un volumen de 200 mL. Se inyectó 1 µL de vino destilado con 4-metil-2-pentanol como patrón interno. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: columna CP-Wax 57 CB (Varian Inc.) 50 m x 0.32 mm y 0.2 µm de espesor de fase, con Helio como gas portador (1.7 mL/min, split 1/25); temperatura de inyector, 220°C; y temperatura del horno, 43°C (5 min) - 4°C/min - 100°C - 20°C/min - 190°C - (1 min).

3.3.3.2. Compuestos volátiles minoritarios

Para analizar los compuestos volátiles minoritarios, 500 mL de vino conteniendo 100 µL de patrón interno 4-nonanol de 10g/L fue concentrado durante 24 h a 250 mL con una mezcla 60:40 de pentano y diclorometano. El extracto fue concentrado por destilación en columna Vigreux hasta 2 mL y se mantuvo a -20 °C hasta su análisis. 2 µL del extracto se inyectaron en la columna. Las condiciones cromatograficas fueron: temperatura del horno 43 °C (15 min); 2 °C/min hasta 125 °C; 1 °C/min hasta 150 °C; 4 °C/min hasta 200 °C mantenido durante 45 min. El gas portador fue Helio (1.4 mL/min, split 1/15, splitless time 0.5 min).

3.4. Análisis sensorial

3.4.1. Análisis sensorial descriptivo

El análisis sensorial descriptivo de cada uno de los vinos se realizó mediante un panel de cata formado por 8 catadores expertos. Se confeccionó una ficha de cata para cada uno de los tipos de vinos (blancos y tintos). En estas fichas, cada catador debía evaluar cada uno de los atributos en una escala graduada de 1 a 8.

3.4.2. Pruebas triangulares

Para la realización de las pruebas triangulares se siguió la Norma UNE 97-006-92, formándose un panel de cata integrado por 18 catadores a cada uno de los cuales se le presentaban 3 copas, dos de ellas contenían dos vinos con el mismo tratamiento (SO₂ o CPC-1, CPC-0,1... etc) y la tercera el vino con el otro tratamiento. Cada uno de los catadores debía diferenciar cual era el distinto de cada serie de tres vinos a nivel olfativo y gustativo. Además se le pedía indicará cual de los vinos con distinto tratamiento prefería. Esta prueba triangular se realizó con copas tapadas para evitar que las diferencias de color entre los vinos pudieran sesgar el resultado de las pruebas olfativa y gustativa, que se realizaron por separado

4. RESULTADOS OBTENIDOS

4.1. Desarrollo de la fermentación alcohólica

En la **Figura 1** se representa la evolución del valor medio de la densidad de los mostos a lo largo de la fermentación alcohólica de los vinos blancos y tintos de 2009 y 2010. En el caso de la vinificación en blanco se observa que los mostos del tratamiento con CPC-1 realizan la fermentación alcohólica de manera algo más rápida que los adicionados de SO₂. Es conocido que el sulfuroso retarda el inicio de la fermentación dependiendo de la dosis debido a sus propiedades antifúngicas.

En la vinificación en tinto no se observan diferencias en la velocidad de fermentación de los mostos en función del aditivo ensayado. Este diferente comportamiento con respecto a la vinificación en blanco es posiblemente debido a que el efecto retardante del SO₂ se contrarresta en la vinificación en tinto debido al aporte de oxígeno al mosto en fermentación en los sucesivos

bazuqueos del sombrero y a la gran disponibilidad de nutriente nitrogenado disponible en el hollejo macerado. También se ha de subrayar que se alcanzaron los mismos valores de densidad final del vino en todos los casos lo que indica que la adición de CPC no impide que la fermentación se produzca de forma completa hasta el agotamiento de los azúcares.

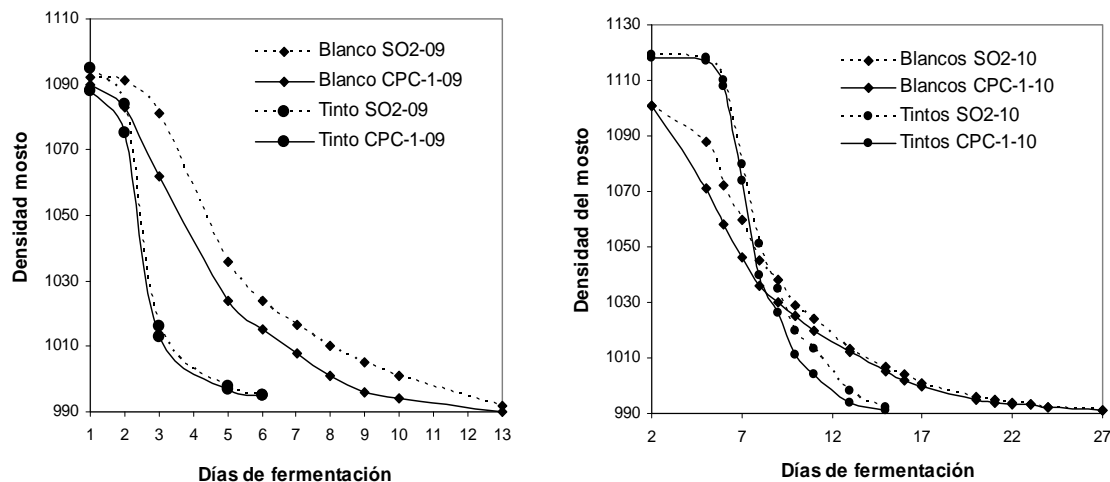


Figura 1: Evolución de la densidad de los mostos en las elaboraciones de vinos blancos y tintos 2009 y 2010.

Los resultados obtenidos en 2010 son muy similares a los del año 2009, aunque si hay que destacar una mayor duración de la fermentación alcohólica con respecto a los del 2009. Por un lado se partió de mostos con mayor contenido en azúcar y por consiguiente el grado alcohólico final de los vinos fue mayor y en los vinos tintos se realizó una maceración prefermentativa de 3 días.

4.2. Evolución de los microorganismos durante la fermentación

Otra de las aportaciones fundamentales del SO₂ en la vinificación es la regulación de la flora microbiana del mosto. Por ello se ha estudiado la evolución de los diferentes microorganismos durante la fermentación.

En la **Figura 2, 3 y 4** se presentan respectivamente la evolución de la población de levaduras, bacterias lácticas y acéticas en ufc/mL en los vinos blancos y tintos elaborados durante la vendimia 2009. En ellas se observa que el SO₂ y el CPC-1 tienen un efecto idéntico sobre el crecimiento de la población de los microorganismos presentes en el mosto en fermentación. Se muestra en la **Figura 2** que la evolución de la población de levaduras es muy similar en los dos tratamientos realizados, a partir de la siembra de la levadura seca activa comercial y mientras hay azúcares disponibles en el medio, la población se mantiene para disminuir cuando estos se han agotado.

Con respecto a la población de bacterias lácticas (**Figura 3**) se puede observar que, la adición de CPC-1 no limita el crecimiento de las bacterias lácticas y puede ocasionar el inicio de la fermentación maloláctica espontánea en los vinos blancos, hecho poco deseable ya que conlleva una pérdida excesiva de acidez y de frescura en los mismos. La inmediata estabilización de los vinos por frío, impide esta desacidificación biológica. Otra opción que puede ser muy adecuada al emplear CPC-1 para vinificaciones en blanco, es la adición de Lisozyma a los mostos al inicio de la fermentación alcohólica para impedir el crecimiento de las bacterias lácticas.

Con respecto a la población de bacterias lácticas en la vinificación en tinto 2009, sin embargo, sí se observan diferencias (**Figura 3**). Inicialmente la población de bacterias es la aportada por la uva, presentando valores muy bajos, y en los primeros días de fermentación desciende debido al efecto competitivo de las levaduras. Sin embargo, en los vinos tintos en los que se empleó CPC a partir del día 5, cuando el contenido en azúcares era ya bajo, la población de bacterias lácticas en el vino CPC se incrementa exponencialmente, mientras que en el vino SO₂ sólo lo hizo cuando se sembraron con cepas seleccionadas comerciales. Por tanto hay que concluir que el CPC no ejerció prácticamente ningún control sobre la población de estos microorganismos, desarrollándose la fermentación maloláctica solapada con los últimos estadios de la fermentación alcohólica. Por ello, si se quiere emplear alguna cepa de bacteria láctica comercial habría que hacer uso de la práctica de la coinoculación o el empleo de lisozima en los mostos para controlar la población autóctona de bacterias lácticas.

Por último, en la **Figura 4** se observa que la población de bacterias acéticas fue muy baja al inicio de la fermentación alcohólica y que ambos aditivos consiguieron controlar su crecimiento hasta hacerlas desaparecer. Esto se corrobora con los valores bajos de acidez volátil obtenidos en los vinos estudiados (ver **Tabla 1**).

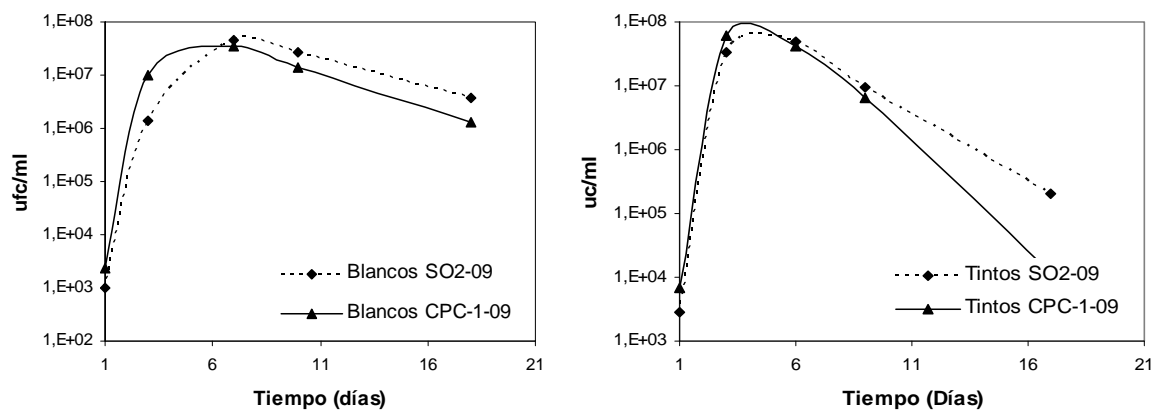


Figura 2: Evolución de la población de levaduras en ufc/mL en las elaboraciones de vino 2009.

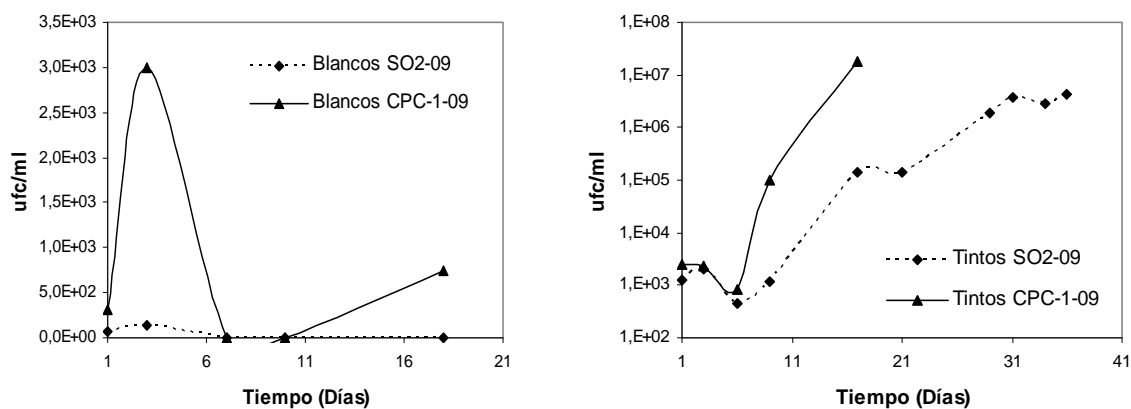


Figura 3: Evolución de la población de bacterias lácticas en ufc/mL en las elaboraciones de vino 2009.

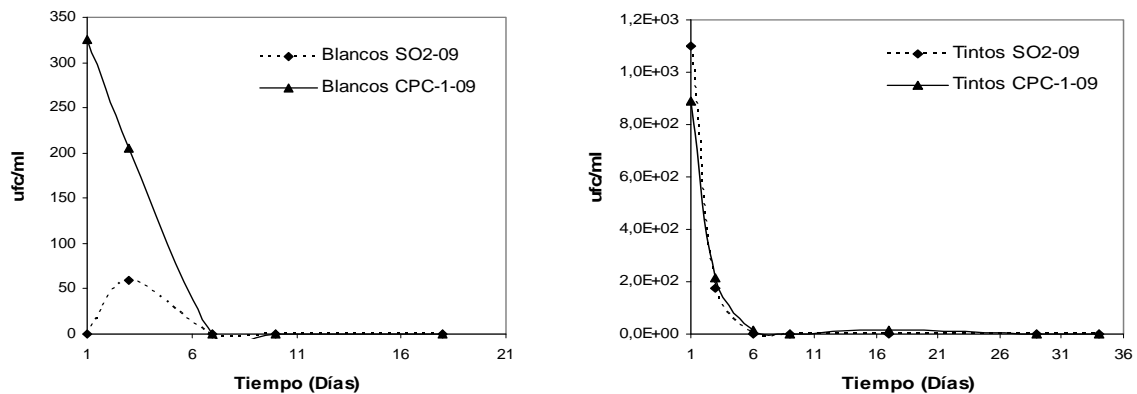


Figura 4: Evolución de la población de bacterias acéticas en ufc/mL en las elaboraciones de vino 2009.

En las **Figuras 5, 6 y 7** se presentan respectivamente las evoluciones de las poblaciones de levaduras, bacterias lácticas y acéticas en ufc/mL de los vinos elaborados en el año 2010. Como en el caso del año 2009 en la **Figura 5** se observa que el SO₂ ejerce un control ligeramente mayor sobre la población de levaduras y por ello los recuentos son algo mas bajos.

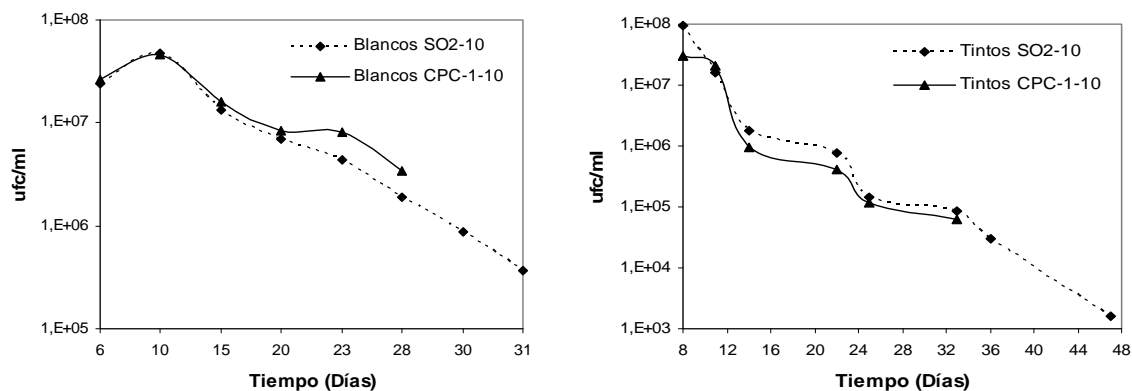


Figura 5: Evolución de la población de levaduras en ufc/mL en las elaboraciones de vino 2010.

En la **Figura 6** se observa que los recuentos de bacterias lácticas en los vinos blancos 2010 son de 1,00E+00 ufc/mL desde el día 10 al 30. De estos resultados se desprende que el SO₂ ejerce un buen control de la población de bacterias lácticas durante la fermentación alcohólica mientras que el CPC-1 no parece ejercer tanto control aunque los recuentos obtenidos en estos vinos durante estos días son también bajos, y oscilan entre 1,E+02 y 1,E+03 ufc/mL. En el caso de los vinos tintos 2010 la cepa comercial de *Oenococcus oeni* se sembró a los 17 días del encubado y como se observa en la **Figura 6** la FML se desarrollo de manera más rápida en los vinos CPC-1 del año 2010, durando unos 21 días menos que en el caso de los vinos SO₂.

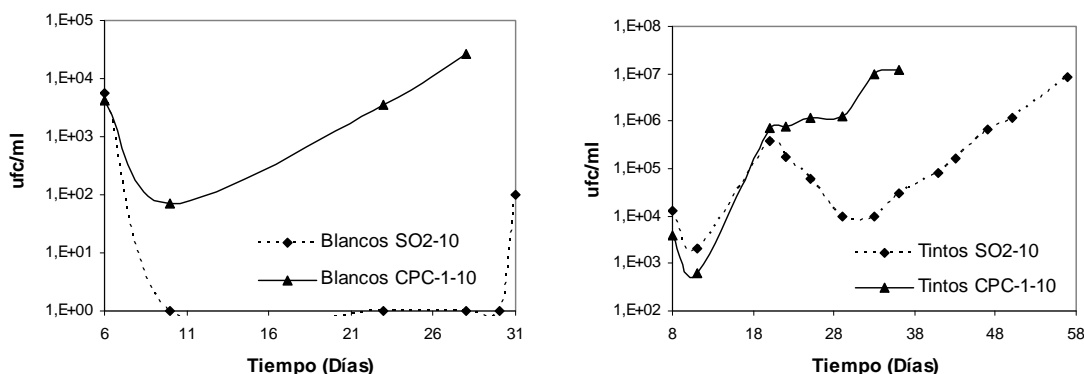


Figura 6: Evolución de la población de bacterias lácticas en ufc/mL en las elaboraciones de vino 2010.

En cuanto a la población de bacterias acéticas (**Figura 7**), inicialmente se observa que el producto CPC ejerce un buen control sobre las poblaciones de bacterias acéticas y similar al efecto del SO₂.

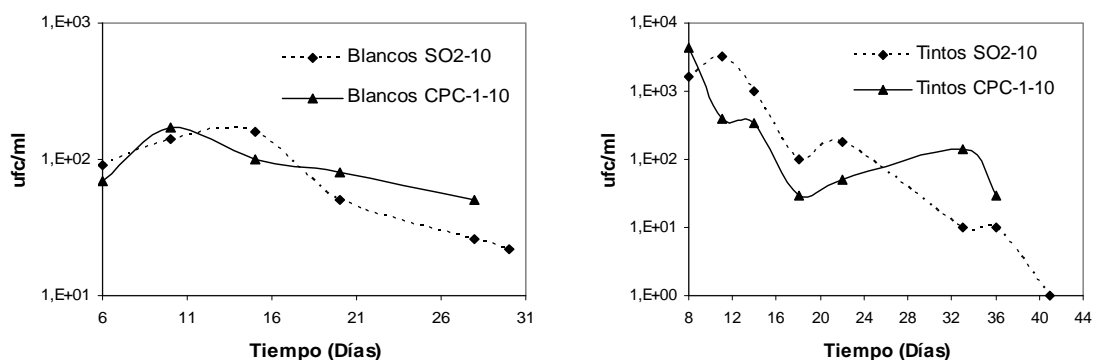


Figura 7: Evolución de la población de bacterias acéticas en ufc/mL en las elaboraciones de vino 2010.

4.3. Análisis de los vinos.

Una vez embotellados los vinos, se analizaron los parámetros más importantes con objeto de poder comparar los efectos producidos por el uso del CPC con respecto a la tradicional vinificación con SO₂. En todos los casos se realizó una comparación de los resultados utilizando el test estadístico de la *t* de Student o el de comparación múltiple de medias de Studen-Neumann-Kleus y en las tablas en las que se muestran los resultados se denota con un asterisco o con distinto superíndice aquellos valores cuyas diferencias son estadísticamente significativas al nivel de probabilidad del 95%. Para facilitar la discusión de los resultados se han agrupado los resultados según la relación de cada parámetro con las fases de la elaboración o con las características de los vinos.

4.3.1. Parámetros físico-químicos

En la **Tabla 1** se muestran los parámetros enológicos más importantes de los vinos de 2009, junto con la concentración de plata. Los vinos elaborados con CPC presentan una densidad final muy

similar y un extracto seco sin diferencias entre tratamientos. Así mismo, estos vinos CPC tienen una acidez total más alta de entre 0,3 y 0,4 g de ácido tartárico/L, aunque esto no se traduce en un pH más bajo. La acidez volátil se mantiene baja en todas las vinificaciones lo que corrobora el control eficaz que ejerce el CPC-1 sobre la población de bacterias acéticas hasta el embotellado.

Es importante hacer notar que, aunque se constata una mayor concentración de ión Plata en las vinificaciones realizadas con CPC-1, los valores determinados están muy por debajo de los 100 µg/L que la OIV ha establecido como límite legal en su norma de tratamiento de vinos con cloruro de plata (OIV, 2009. Resolution Oeno 45/2009).

Tabla 1: *Parámetros físico-químicos analizados en los vinos 2009.*

	Blancos 2009					Tintos 2009				
	SO ₂		CPC-1			SO ₂		CPC-1		
	Media	SD	Media	SD		Media	SD	Media	SD	
Masa volúmica	0,9867	0,00	0,9872	0,00		0,9906	0,00	0,9908	0,00	
Extracto	15,43	0,17	15,57	0,01		23,37	0,81	22,24	0,20	
Acidez total (g/L)	4,45	0,13	4,73	0,08	*	4,56	0,06	4,90	0,03	*
Acidez volátil (g/L)	0,46	0,00	0,38	0,01	*	0,32	0,03	0,34	0,04	
pH	3,08	0,01	3,08	0,03		3,50	0,03	3,52	0,01	
SO ₂ total (mg/L)	134	12	9	0,0	*	68	4	5	1,0	*
SO ₂ libre (mg/L)	14,5	0,5	0,0	0,0	*	29,5	8,5	0,0	0,0	*
Plata (µg/L)	6,15	0,85	18,35	1,05	*	2,65	0,45	6,45	0,15	*

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

En la **Tabla 2** se presentan los parámetros físico-químicos de los vinos elaborados en el año 2010. Al igual que en 2009 se observa en los vinos blancos CPC-1 un aumento de la acidez total aunque menor que en el año anterior, que no se refleja en un menor pH, en ambas vendimias. El contenido en Plata es ligeramente inferior al de los vinos 2009 y del mismo orden en los vinos tintos.

Tabla 2: *Parámetros físico-químicos analizados en los vinos 2010.*

	Blancos 2010					Tintos 2010				
	SO ₂		CPC-1			SO ₂		CPC-1		
	Media	SD	Media	SD		Media	SD	Media	SD	
Masa Volúmica	0,9890	0,00	0,9883	0,00	*	0,9906	0,00	0,9837	0,00	*
Acidez total (g/L)	4,80	0,15	5,03	0,08	*	3,84	0,01	3,93	0,01	*
Acidez volátil g/L)	0,53	0,04	0,56	0,05		0,57	0,04	0,47	0,00	
pH	3,83	0,01	3,84	0,01		4,39	0,00	4,39	0,00	
SO ₂ total (mg/L)	94,00	14,14	5,50	0,71	*	50,00	5,66	5,50	3,54	*
SO ₂ libre (mg/L)	18,50	4,95	2,00	0,00	*	36,00	8,49	3,00	1,41	*
Plata (µg/L)	3,00	1,41	5,00	0,00	*	2,00	1,41	1,00	0,00	

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

4.3.2. Compuestos relacionados con la estructura fenólica y el color

El SO₂ contribuye a la extracción de los fenoles de las células vegetales lo que se traduce, tal y como se muestra en la **Tabla 3**, en que los vinos obtenidos con este producto presenten mayores concentraciones de antocianos (en el caso de los tintos), catequinas, taninos y fenoles totales en general, aunque no en todos los casos las diferencias sean estadísticamente significativas. Sin embargo estas diferencias tan evidentes no se traducen en diferencias significativas en el color

final de los vinos debido al efecto decolorante del SO₂. Estos resultados se repitieron en las vinificaciones de 2010 e incluso, tal y como se puede observar en la **Tabla 4**, los vinos tintos CPC-1 presentan una Intensidad Colorante más alta.

Tabla 3: Compuestos relacionados con la estructura fenólica y el color analizados en los vinos 2009.

	Blancos 2009					Tintos 2009				
	SO ₂		CPC-1			SO ₂		CPC-1		
	Media	SD	Media	SD		Media	SD	Media	SD	
Antocianos libres (mg/l)						505	39	462	102	
Antocianos polímeros (mg/L)						43	6	34	10	
Catequinas (mg/L)	15,44	0,85	8,77	0,33	*	181	7	174	21	
Taninos (g/L)	0,12	0,02	0,07	0,00	*	0,82	0,19	0,68	0,03	
IPT	4,54	0,09	4,03	0,13	*	39,27	0,06	28,79	0,52	*
% Copigmentación						55,91	0,33	39,43	1,69	*
% Polimerización						36,85	1,17	27,46	0,25	*
TWC						6,78	0,32	3,81	0,40	*
L*	97,71	2,07	88,51	2,27	*	23,59	0,39	27,64	1,98	*
a*	-2,82	0,31	2,92	0,37	*	55,24	0,20	59,52	1,38	*
b*	28,52	0,99	40,01	0,10	*	39,45	0,05	36,62	5,62	
C*	28,66	0,96	40,12	0,13	*	67,88	0,19	70,10	1,76	
H*	95,66	0,82	85,83	0,51	*	35,53	0,06	31,49	4,51	
Intensidad colorante						6,40	0,12	6,16	0,52	
Tonalidad						0,60	0,00	0,53	0,01	*

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo



Los vinos blancos CPC-1 tienen una menor luminosidad, mayores valores de los parámetros CIELab* a* y b* (mayores contenido en rojos y amarillos) debido a que el SO₂ ejerce un efecto antioxidante que no ha sido observado en el producto CPC-1.

Imagen 4: Fase visual blancos 2009 SO₂ y CPC-1

Tabla 4: Compuestos relacionados con la estructura fenólica y el color analizados en los vinos 2010.

	Blancos 2010					Tintos 2010				
	SO ₂		CPC-1		*	SO ₂		CPC-1		*
	Media	SD	Media	SD		Media	SD	Media	SD	
Antocianos libres (mg/L malv.)						354,45	36,13	296,70	8,63	*
Antocianos polímeros (mg/L malv.)						78,65	12,94	61,80	4,81	*
Catequinas (mg/L cat.)	42,65	1,48	15,80	2,83	*	232,65	0,78	223,05	6,15	*
Taninos (g/L)	0,27	0,02	0,17	0,03	*	1,81	0,05	1,96	0,30	
IPT	4,55	0,21	4,10	0,00	*	69,75	0,78	67,25	4,74	
% Copigmentación						15,93	2,28	5,39	1,27	
% Polimerización						25,57	7,46	22,92	1,61	
TWC						7,18	0,17	5,91	0,10	
L*	97,93	0,95	92,48	0,98	*	10,77	0,36	5,77	0,89	*
a*	0,11	0,09	4,30	0,51	*	42,42	0,33	33,02	2,58	*
b*	4,58	0,55	14,51	0,96	*	18,54	0,60	9,91	1,52	*
C*	4,58	0,55	15,14	1,07	*	46,30	0,54	34,48	2,90	*
H*	88,65	0,99	73,53	0,81	*	23,60	0,51	16,66	1,19	*
Intensidad colorante						11,93	0,67	12,74	0,60	
Tonalidad						0,89	0,01	0,83	0,01	*

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

Como era de esperar, estos efectos oxidativos no se observan en los vinos tintos, al menos de forma tan clara como en los blancos. En las vinificaciones en tinto los parámetros relacionados con el color no presentan grandes diferencias, observándose solo que los vinos elaborados con CPC-1 son ligeramente más luminosos y con algo más de color rojo.



Imagen 5: Fase visual vinos tintos 2009 SO₂ y CPC-1

Por último, en este apartado hemos de destacar que existen diferencias significativas en el % de color debido a la polimerización, % de color debido a la copigmentación y en el color total (color del vino una vez eliminados los efectos del pH y del SO₂). Los valores de estos tres parámetros son más elevados en los vinos elaborados con SO₂ en las dos vendimias.

4.3.3. Compuestos relacionados con la fermentación alcohólica

En la **Tabla 5**, se presentan los compuestos relacionados con la fermentación alcohólica determinados en los vinos del año 2009. Tras la fermentación alcohólica, el grado alcohólico de los vinos tratados con SO₂ es ligeramente superior a los de CPC-1. Por otra parte, en ambas vinificaciones se consiguen fermentar todos los azúcares presentes tal y como se comprueba por los valores de glucosa más fructosa residuales.

El contenido en acetaldehído presenta diferencias estadísticamente significativas, pudiéndose observar en todos los casos concentraciones mayores en los vinos elaborados con SO₂. Ello es debido a que esta molécula se une al acetaldehído y favorece su producción a partir de la correspondiente ruta metabólica. El carácter oxidativo que aporta al aroma de los vinos el acetaldehído constituye una ventaja en los vinos con menor concentración de este compuesto, los elaborados con CPC-1.

Tabla 5: *Compuestos relacionados con el desarrollo de la fermentación alcohólica en los vinos 2009.*

	Blancos 2009				*	Tintos 2009				
	SO ₂		CPC-1			SO ₂		CPC-1		
	Media	SD	Media	SD		Media	SD	Media	SD	
Grado alcohólico (% v/v)	13,47	0,06	13,12	0,04		12,87	0,03	12,18	0,15	*
Glucosa+Fructosa (g/L)	0,31	0,04	0,37	0,04		0,05	0,00	0,01	0,00	
Glicerina (g/L)	6,79	0,17	6,58	0,13		8,33	0,59	7,60	0,35	
Acetaldehído (mg/L)	56,93	0,29	14,25	0,10	*	8,98	3,16	2,66	1,05	*
Acetato de etilo (mg/L)	64,23	3,86	77,72	8,15		53,60	0,07	53,35	4,69	
Butirato de etilo (mg/L)	0,86	0,03	0,96	0,11		0,68	0,05	0,70	0,02	
Propanol (mg/l)	28,82	1,65	33,21	3,07		34,95	1,35	31,55	2,45	
Isobutanol (mg/l)	40,41	0,44	44,77	0,80	*	80,14	5,96	80,66	5,63	
Acetato isoamilo (mg/l)	3,49	0,04	4,28	0,38	*	2,59	0,12	2,83	0,12	
1-butanol (mg/l)	0,92	0,04	0,82	0,02	*	1,17	0,03	1,75	0,14	*
Isoamílicos (mg/l)	238,3	20,5	335,28	8,35	*	512,8	30,2	487,0	24,6	
Metanol (mg/l)	22,85	0,05	22,1	1,1		109,5	0,8	96,45	7,45	

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

Con respecto al resto de alcoholes y ésteres de fermentación, en la **Tabla 5** se puede observar que las diferencias significativas que se aprecian en el caso de los vinos blancos, no se repiten en los tintos. Se comprueba además que existen diferencias significativas en algunos de los metabolitos resultantes de la fermentación alcohólica. Es evidente que el SO₂ produce cierto estrés en las levaduras, distinto del producido por el CPC-1 y ello afecta a las distintas rutas metabólicas responsables de la producción de estos compuestos: etanol, alcoholes superiores y ésteres. Este efecto no es tan pronunciado en la fermentación en tinto porque, como ya se ha indicado, la aireación debida al bazuqueo y la mayor disponibilidad de fuentes nutritivas nitrogenadas homogeneizan las condiciones de desarrollo de la fermentación alcohólica.

En los vinos blancos merece la pena destacar el mayor contenido en ésteres de los vinos CPC-1, responsables de los aromas afrutados tan buscados en los vinos de calidad.

En la **Tabla 6** se muestran los resultados de los compuestos relacionados con la fermentación alcohólica de los vinos 2010. En los vinos blancos la levadura no ha metabolizado los azúcares en su totalidad, aunque los vinos CPC-1 han agotado algo más la glucosa y fructosa que los SO₂ (de ahí su menor masa volúmica de la **Tabla 2**) a pesar de que el grado alcohólico es el mismo. Este resultado corrobora que al utilizar CPC-1 el rendimiento en alcohol es inferior, es decir se constata una menor producción de alcohol para la misma cantidad de azúcares fermentados.

En cuanto al resto de componentes volátiles producidos durante la fermentación alcohólica del mismo modo que en el año 2009 se observa que los vinos CPC-1 contenían un menor contenido en acetaldehído, acetato de isoamilo y alcoholes isoamílicos y mayor contenido en propanol y butanol. Por el contrario en el caso de los vinos tintos las diferencias en la producción de acetaldehído no son tan importantes como en los vinos blancos porque este compuesto se consume durante la fermentación maloláctica. En el caso de los vinos tintos, aunque se aprecian

diferencias estadísticamente significativas en los parámetros relacionados con la fermentación estas son de muy poca importancia.

Tabla 6: Compuestos relacionados con el desarrollo de la fermentación alcohólica en los vinos 2010.

	Blancos 2010					Tintos 2010				
	SO ₂		CPC-1			SO ₂		CPC-1		
	Media	SD	Media	SD		Media	SD	Media	SD	
Grado alcohólico (% v/v)	14,04	0,08	14,01	0,03		15,99	0,07	15,95	0,04	
Glucosa+Fructosa (g/L)	3,28	0,03	1,55	0,65	*	0,10	0,04	0,05	0,02	
Glicerina (g/L)	6,97	0,13	7,39	0,45		10,38	0,18	10,82	0,43	
Acetaldehído (mg/L)	33,10	6,13	14,35	0,18	*	4,60	0,01	4,47	0,01	*
Acetato de etilo (mg/L)	37,24	1,36	38,99	2,08		25,75	0,31	30,20	0,91	*
Butirato de etilo (mg/L)	0,34	0,01	0,30	0,01	*	0,20	0,00	0,20	0,01	
Propanol (mg/L)	16,53	0,10	18,02	0,25	*	32,93	2,71	30,73	1,36	
Isobutanol (mg/L)	43,77	2,91	39,90	1,82	*	49,46	3,03	52,49	1,43	
Acetato de Isoamilo (mg/L)	1,87	0,06	1,55	0,02	*	0,67	0,10	0,80	0,04	*
1-butanol (mg/L)	0,93	0,05	1,10	0,11	*	2,01	0,09	2,12	0,07	
Isoamilicos (mg/L)	233,13	15,63	211,96	2,64	*	307,04	17,91	329,11	0,13	*
Metanol (mg/L)	43,89	1,00	43,75	3,31		66,07	9,00	60,82	0,04	

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

4.3.4. Compuestos relacionados con la fermentación maloláctica

En la **Tabla 7** se presentan los resultados de los compuestos relacionados con la fermentación maloláctica de los vinos elaborados en 2009. En los vinos blancos no se desarrolló este proceso (sólo se produjo ácido láctico en concentración traza procedente de la fermentación alcohólica) por lo que los compuestos relacionados con la misma no presentan diferencias importantes.

Tabla 7: Compuestos relacionados con el desarrollo de la fermentación maloláctica en los vinos 2009.

	Blancos 2009					Tintos 2009				
	SO ₂		CPC-1			SO ₂		CPC-1		
	Media	SD	Media	SD		Media	SD	Media	SD	
Acido málico (g/L)	0,26	0,03	0,26	0,02		0,08	0,01	0,07	0,01	
Acido láctico (g/L)	0,02	0,01	0,02	0,01		0,75	0,01	0,84	0,01	*
Acido cítrico (g/L)	0,09	0,01	0,10	0,03		0,21	0,01	0,05	0,02	*
2,3-butanodiona (mg/L)						1,48	0,15	3,11	0,53	*
3-OH-2-butanona (mg/L)	0,83	0,00	0,52	0,06	*	1,78	0,15	5,53	0,96	*
Lactato de etilo (mg/L)	2,75	0,08	1,97	0,69		47,96	2,22	26,44	2,33	*

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

Sin embargo en los vinos tintos sí se observan diferencias estadísticamente significativas salvo en lo que respecta al ácido málico residual. En los vinos tintos CPC-1 se produjo más ácido láctico y concentraciones mucho menores de lactato de etilo; además se metabolizó el ácido cítrico lo que se reflejó en mayores concentraciones de 2,3-butanodiona y 3-hidroxi-2-butanona. Estas diferencias se explican por el hecho que el CPC-1 parece que no fue capaz de detener el crecimiento de la flora láctica del mosto y la fermentación maloláctica se produjo de forma casi simultánea a la fermentación alcohólica (de hecho el ácido málico había desaparecido ya en el

día 15 de fermentación, como se observa en la **Figura 8**). La siembra de la bacteria láctica seleccionada, se realizó el día 12, cuando ya casi la mitad del ácido málico había sido metabolizado por bacterias indígenas que podrían ser las causantes de las concentraciones más elevadas de estos compuestos volátiles no deseados.

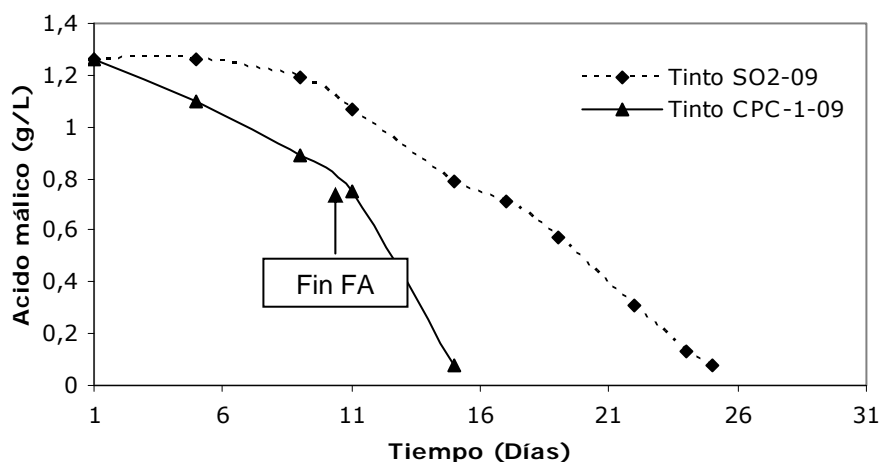


Figura 8: Evolución de la fermentación maloláctica en las elaboraciones en tinto 2009.

En la **Tabla 8** se presentan los resultados de los compuestos relacionados con la fermentación maloláctica de los vinos elaborados en 2010. A diferencia del año anterior, no se ha observado el desarrollo de la fermentación maloláctica con la biota indígena simultáneamente a la fermentación alcohólica, lo que pudiera ser debido al elevado grado alcohólico de los vinos tintos de este año. Ello nos permite que con estos resultados se puedan comparar los efectos de los dos conservantes sobre la fermentación maloláctica en las mismas condiciones de desarrollo de este proceso.

Tabla 8: Compuestos relacionados con el desarrollo de la fermentación maloláctica en los vinos 2010.

	Blancos 2010				Tintos 2010			
	SO ₂		CPC-1		SO ₂		CPC-1	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Acido málico (g/L)	1,42	0,04	1,43	0,01	0,10	0,00	0,20	0,01
Acido láctico (g/L)	0,01	0,00	0,05	0,01	1,64	0,03	1,74	0,07
2,3-butanodiona (mg/L)					5,51	1,10	0,85	0,11 *
3-OH-2-butanona (mg/L)	0,34	0,03	0,35	0,08	2,30	0,13	1,67	0,03 *
Lactato de etilo (mg/L)	0,65	0,07	1,10	0,35 *	16,52	0,38	18,73	0,46 *

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

En los vinos CPC-1 se produce algo más de ácido láctico aunque la cantidad de ácido málico metabolizado es algo menor. Estas diferencias metabólicas se observan también en los productos de degradación del ácido cítrico, comprobándose que las vinificaciones con SO₂ presentan concentraciones más elevadas de 2,3-butanodiona y 3-hidroxi-2-butanona, lo que se traduciría en una mejor calidad sensorial dadas las notas aromáticas negativas que aportan estos dos compuestos.

Dado que no queda claro que el CPC-1 pueda impedir el desarrollo de las bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica y lo importante que es el control de este proceso en los vinos tintos, sobretodo en lo que respecta al control del metabolismo del ácido cítrico cuyos productos derivados rebajan la calidad aromática de los vinos, se podría utilizar la técnica de coinoculación para poder asegurar la presencia de cepas de bacterias lácticas en el medio que lleven a cabo el proceso. Este ensayo se ha realizado en 2010 y los resultados se exponen en el apartado **4.8**. Además, en el caso de la fermentación de vinos blancos en los que se debe impedir este proceso, habría que seguir el protocolo aquí realizado y estabilizar por frío nada más terminada la fermentación alcohólica o recomendar la adición de lisozima que impide el desarrollo de estas bacterias.

4.3.5. Compuestos volátiles minoritarios 2009

En la **Tabla 9** se presentan los compuestos volátiles mayoritarios de los vinos elaborados en el año 2009 agrupados en familias. Mayor contenido en acetatos fue observado en todos los vinos CPC-1. Estos compuestos son muy importantes desde el punto de vista aromático ya que son los responsables de comunicar notas afrutadas a los vinos. Un menor contenido en compuestos de la familia de la vainillina fue también observado en todos los vinos CPC-1. En cuanto a los alcoholes C6 y fenoles volátiles se han observado diferencias significativas entre los dos tipos de vino en función del aditivo empleado. Sin embargo no se puede establecer una tendencia general y los contenidos finales de estos compuestos dependen del tipo de elaboración (blanco o tinto). Así para los vinos blancos CPC-1 se apreció un menor contenido en alcoholes C6 y fenoles volátiles, mientras que para los tintos CPC-1 se observó lo contrario.

En cuanto al resto de familias de compuestos volátiles analizadas no se han observado diferencias entre los tratamientos.

Tabla 9: Compuestos volátiles minoritarios analizados en los vinos 2009.

	Blancos 2009					Tintos 2009				
	SO2		CPC-1			SO2		CPC-1		
	Media	SD	Media	SD		Media	SD	Media	SD	
Acetatos sin Acetato de etilo (µg/L)	671,30	18,10	704,34	31,70	*	321,87	3,42	440,05	27,98	*
Esteres etilicos (mg/L)	2,66	0,32	2,25	0,19		0,83	0,01	0,78	0,07	*
Malato de dietilo (µg/L)	18,19	0,12	15,80	0,17		12,25	0,13	43,19	6,18	*
Succinatos (mg/L)	18,91	3,17	19,39	2,02		23,08	5,02	44,21	5,07	*
Alcoholes lineales (mg/L)	308,53	21,84	414,07	10,60	*	629,07	37,63	601,02	27,98	
Alcoholes C6 (mg/L)	46,55	2,34	9,54	0,01	*	22,68	2,98	31,28	2,75	*
Tioalcoholes (mg/L)	0,53	0,10	0,78	0,01	*	2,98	0,22	2,87	0,24	
Norisoprenoides (µg/L)	51,39	2,93	51,62	0,48		221,69	1,44	205,94	11,66	
Ácidos (mg/L)	112,55	5,55	80,21	8,75	*	27,53	1,79	27,19	3,14	
Terpenos (µg/L)	22,67	2,00	23,63	2,37		37,14	1,54	34,19	2,82	
γ Lactonas (mg/L)	1,87	0,16	2,09	0,02		4,38	0,31	4,64	0,44	
δ Lactonas (µg/L)	107,81	2,21	94,76	8,52		61,82	6,21	59,25	4,73	
Derivados bencénicos (mg/L)	20,39	2,10	30,25	1,02		67,26	0,74	67,54	3,53	
Derivados de la vainillina (µg/L)	116,53	3,86	102,61	0,55	*	264,70	6,70	244,01	5,54	*
Fenoles volátiles (mg/L)	1,30	0,11	1,08	0,06	*	0,09	0,01	0,13	0,02	*

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

4.3.6. Análisis Sensorial

4.3.6.1. Análisis sensorial descriptivo de los vinos 2009

El análisis sensorial descriptivo de cada uno de los vinos se realizó mediante un panel de cata formado por 8 catadores expertos. Se confeccionó una ficha de cata para cada uno de los tipos de vinos (blancos y tintos). En estas fichas, cada catador debía evaluar cada uno de los atributos en una escala graduada de 1 a 8.

En el caso de los vinos blancos en la fase visual se valoraba el aspecto, la intensidad y el matiz. En la fase olfativa los atributos a valorar fueron intensidad aromática, cítrico, fruta fresca, fruta tropical, fruta pasificada, especias, floral y vegetal. En la fase gustativa se valoró el dulzor, la acidez, el amargor, punzante y la calidad del deajo.

Para los vinos tintos en la fase visual se valoraron los mismos atributos que para el caso de los blancos, mientras que en la fase olfativa fueron distintos por las diferentes características sensoriales de estos vinos. Así se valoraba la fruta roja, la fruta fresca, la fruta de hueso, la fruta pasificada, los frutos secos, las especias, el carácter floral, el carácter vegetal, las notas caramelizadas, las lácteas y balsámicas. En la fase gustativa además de los atributos valorados para los blancos también se considero la astringencia y el cuerpo.

En las **Figuras 9 y 10** se muestra el perfil sensorial de los vinos de 2009, blancos y tintos respectivamente, en los que se ha empleado CPC y SO₂.

En la fase visual de los vinos blancos (datos no mostrados) los catadores apreciaron una mayor intensidad de color y con notas mucho más doradas en los vinos CPC-1 que en los vinos en los que se utilizó SO₂, que presentaban un color más pálido y verdoso todo ello consecuencia de la oxidación puesta anteriormente de manifiesto. Por el contrario en los vinos tintos no se pudieron apreciar diferencias en el color de los vinos elaborados con ambos tratamientos.

Como se puede observar en la **Figura 9** los vinos blancos CPC-1 en la fase aromática fueron puntuados por los catadores con menor carácter cítrico, menos notas vegetales y con mayor contenido en fruta tropical, mientras que en la fase gustativa los catadores los destacaron como más dulces, con mayor acidez, menos amargor y punzante y una mayor calidad del deajo.

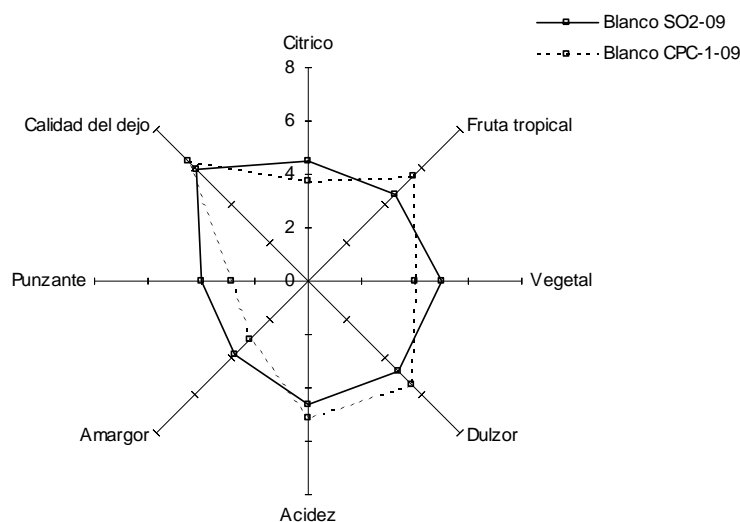


Figura 9: Perfil Sensorial vinos blancos 2009

En lo que respecta a los vinos tintos de 2009, en la fase olfativa se observa que en los tratados con CPC-1 tienen un mayor carácter balsámico, lácteo, floral y especiado. En la fase gustativa se observa que los vinos CPC-1 fueron puntuados por los catadores con menor acidez (a diferencia de los blancos) y menor amargor.

No obstante, con respecto al perfil sensorial aromático y gustativo de los vinos blancos y tintos, habría que destacar que las telas de araña obtenidas para SO₂ y CPC-1 son muy similares y las pequeñas diferencias que se observan no son en ningún caso estadísticamente significativas.

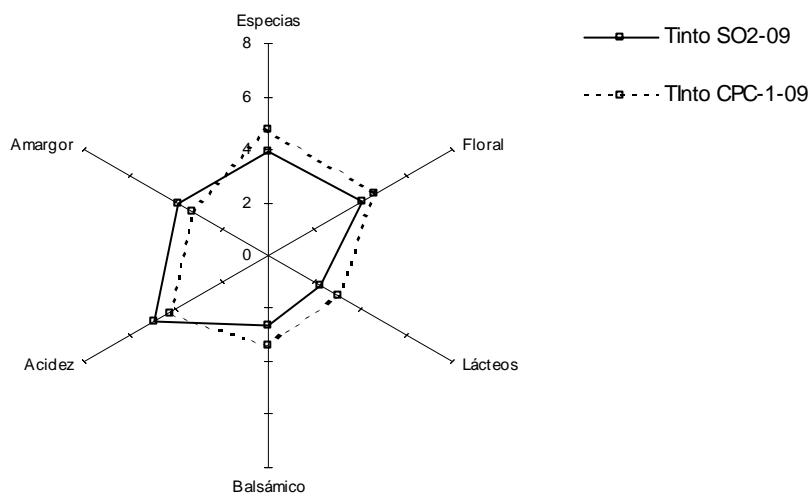


Figura 10: Perfil Sensorial vinos tintos 2009

4.3.6.2. Prueba triangular

Los resultados obtenidos de los vinos 2009 mostraron que tanto para los blancos como para los tintos, en la fase olfativa y gustativa no se pudieron apreciar diferencias significativas entre los dos tratamientos al nivel de significación del 95%.

En cuanto a la preferencia de los catadores, teniendo en cuenta sólo los resultados de los que distinguieron correctamente los vinos de ambos tratamientos, es de destacar que en la fase olfativa los vinos tintos Monastrell en los que se empleó CPC-1 fueron los preferidos frente a los vinos en los que se empleó SO₂.

Sin embargo en los vinos elaborados en 2010, los resultados de la prueba triangular sí han mostrado diferencias significativas en la fase olfativa de vinos tintos y blancos y la fase gustativa de vinos blancos, y solo no se encontraron diferencias en el caso de la fase gustativa de los vinos tintos. Con respecto a las preferencias no existen resultados significativos, sólo indicar que en general algo más del 50% de los catadores prefirieron en la fase olfativa los vinos SO₂ mientras que para la fase gustativa los preferidos fueron los CPC.

4.4. Estabilidad en botella

Se ha realizado un seguimiento de los vinos elaborados en el año 2009 desde su embotellado en diciembre de 2009 hasta mayo de 2011, analizando la acidez volátil y realizando un análisis sensorial descriptivo de los mismos. En la **Tabla 10** se presenta la evolución de la acidez volátil de estos vinos en distintas fechas y se demuestra que al menos en este parámetro, los vinos CPC-1 permanecen estables durante largo tiempo después del embotellado.

El análisis sensorial mostró que los vinos tintos mantenían perfectamente sus cualidades y seguían siendo indistinguibles en base al compuesto antimicrobiano utilizado. Por su lado en las catas de los vinos blancos se fue observando que los vinos obtenidos con CPC evolucionaban más despacio y mejor que los obtenidos con SO₂, ya que estos últimos tras 15 meses en botella empezaban a presentar notas reductoras de compuestos de azufre.

Tabla 10: Evolución de la acidez volátil de los vinos 2009 después del embotellado.

	Blancos		Tintos	
	SO ₂	CPC-1	SO ₂	CPC-1
Embotellado 15 diciembre 2009	0,46	0,38	0,32	0,34
31 marzo 2010	0,51	0,52	0,33	0,37
28 julio 2010	0,53	0,52	0,39	0,30
11 noviembre 2010	0,38	0,40	0,26	0,36
8 febrero de 2011	0,38	0,39	0,27	0,37
2 mayo de 2011	0,44	0,42	0,32	0,41

4.5. Empleo de CPC en diferentes dosis

Tal y como se señaló en el apartado 3.1 en 2010 se ha experimentado con dosis de 0,1 gr/L de CPC (CPC-01). En la **Figura 11** se representa la evolución del valor medio de la densidad de los mostos a lo largo de la fermentación alcohólica de los vinos blancos y tintos de 2010 en los que se empleó el aditivo CPC en dos dosis diferentes (CPC-1 y CPC-0,1). Como se puede observar la evolución es idéntica en todos los casos.

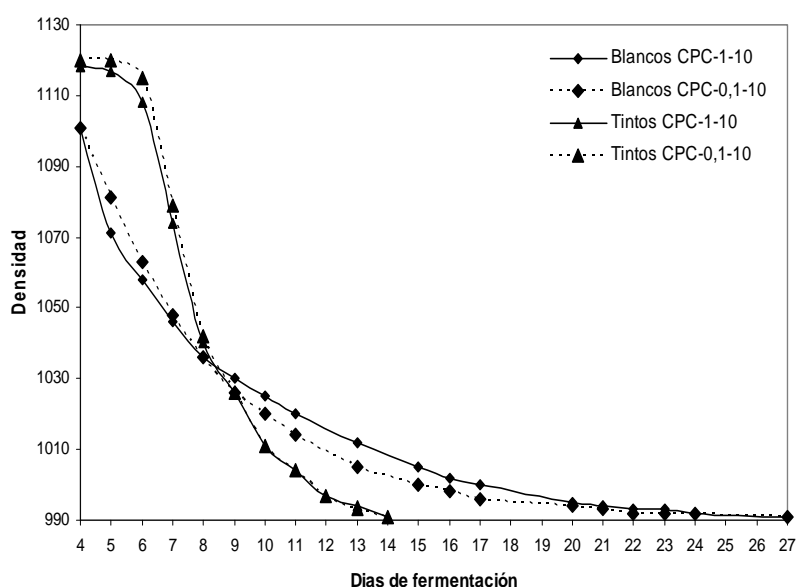


Figura 11: Evolución de la densidad de los mostos en las elaboraciones de 2010 empleando CPC en dosis de 1g/kg y 0,1 g/kg.

En la **Tabla 11** se presentan los resultados de los recuentos microbiológicos de levaduras, bacterias lácticas y acéticas de los vinos blancos y tintos elaborados en el año 2010 en los que se

empleo como aditivo CPC en dos dosis diferentes CPC-1 y CPC-0,1, no observándose diferencias apreciables entre los dos tratamientos.

Tabla 11: Poblaciones microbianas en tres momentos distintos de las elaboraciones de los vinos en los que se ha empleado CPC en dos dosis distintas (1gr/Kg y 0,1 g/kg).

	Blancos 2010			Tintos 2010		
	F. tumultuosa	Descube	Final FA	F. tumultuosa	Final FA	Final FML
Levaduras CPC-1	2,60E+07	8,30E+06	3,42E+06	3,00E+07	1,56E+05	1,00E+01
Levaduras CPC-0,1	3,90E+07	5,50E+06	1,65E+06	2,60E+07	6,10E+05	1,00E+03
B. Lácticas CPC-1	4,10E+03	1,08E+03	2,70E+04	4,00E+03	7,40E+05	1,18E+07
B. Lácticas CPC-0,1	6,50E+02	1,29E+04	5,40E+04	8,80E+03	6,60E+05	6,50E+06
B. Acéticas CPC-1	7,00E+01	8,00E+01	5,00E+01	4,40E+03	1,00E+01	3,00E+01
B. Acéticas CPC-0,1	4,00E+01	6,00E+01	5,00E+01	1,00E+03	1,00E+01	4,00E+01

Resultados expresados en ufc/mL

En la **Tabla 12** se presentan los resultados de los análisis de los vinos obtenidos. En los vinos blancos se apreciaron aumentos de la concentración de Plata que no son lógicos y que pueden ser debidos a la imprecisión del método de análisis en estos rangos de microgramos.

Cuando se emplea 1 g/L de CPC (también se constata este resultado cuando se emplean 0,5+0,5 e infusión) quedan menos azúcares residuales que con SO₂ pero también que con 0,1 g/L de CPC. Esto podría indicar que CPC potenciaría el metabolismo de las levaduras en lo que respecta al consumo de azúcares. También se observan pequeñas diferencias en la acidez y el pH, de forma que la dosis de 1gr/L produce vinos con más acidez y menos pH, lo que es favorable para las características sensoriales y para su conservación.

Un dato que hay que destacar es que en uno de los vinos blancos tratados con 0,1 gr de CPC se desencadenó la fermentación maloláctica; de ahí que se obtengan concentraciones más bajas de ácido málico y más altas de ácido láctico y que las desviaciones estándar sean del orden de la media. Este resultado de nuevo ha de hacernos pensar que el CPC no limita totalmente el desarrollo espontáneo de bacterias lácticas, al menos en su forma de dosificación por espolvoreo.

Con respecto al color en los vinos blancos al utilizar CPC en dosis de 0,1 gr/L aumentó el parámetro CIELab b*, obteniéndose vinos con colores amarillos más intensos, y con menor luminosidad (L*) que indica un mayor pardeamiento. Realmente no encontramos una explicación coherente de este fenómeno ya que si la plata no actúa como antioxidante, la dosis empleada no debería tener incidencia con respecto al pardeamiento de los vinos blancos (como no la tiene en el caso de los vinos tintos) y si por el contrario favoreciera o catalizara las reacciones de oxidación, serían los vinos obtenidos con mayor dosis de CPC los que presentarían más pardeamiento. También se han observado diferencias estadísticamente significativas en los polifenoles totales y algún metabolito pero estas no son importantes. En cuanto a los vinos tintos aunque la estadística presenta diferencias significativas en muchos parámetros, la realidad es que desde el punto de vista enológico no son a tener en cuenta.

Sometidos a la prueba triangular, los vinos blancos y tintos obtenidos con dosis de 0,1 gr de CPC no han mostrado a nivel organoléptico diferencias estadísticamente significativas respecto de los obtenidos con 1 gr/L de CPC, salvo en el caso de la fase olfativa en vinos tintos en los que se encontraron diferencias al nivel del 95 % de probabilidad.

Tomando los resultados en su conjunto se puede afirmar que los vinos obtenidos con dosis de 0,1 gr/L de CPC son bastante parecidos los elaborados con 1 gr/L de CPC (a excepción del pardeamiento no esperado en los vinos blancos). Estos resultados nos llevan a preguntarnos si la dosis de 0,1 gr/L de CPC es suficiente o si los resultados se deben a que no se ha producido ningún desarrollo bacteriano en los vinos debido a su alto grado alcohólico. Habría por tanto que profundizar en este aspecto en próximas experiencias.

Tabla 12: Análisis de los vinos 2010 en los que se han empleado CPC en dosis de 1gr/L y 0,1 gr/L.

	Blancos 2010				Tintos 2010					
	CPC-1		CPC-0,1		CPC-1		CPC-0,1			
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD		
Masa Volúmica	0,9882	0,00	0,9893	0,00	*	0,9837	0,00	0,9899	0,00	*
Grado alcohólico (% v/v)	14,01	0,03	13,77	0,09	*	15,95	0,04	16,17	0,02	*
Glucosa+Fructosa (g/L)	1,55	0,65	2,82	1,23		0,05	0,02	0,06	0,01	
Acidez total (g/L)	5,03	0,08	4,64	0,26	*	3,93	0,01	3,76	0,11	*
pH	3,84	0,01	3,89	0,04	*	4,39	0,00	4,47	0,01	*
Acidez volátil (g/L)	0,56	0,05	0,56	0,00		0,47	0,00	0,56	0,04	*
Acido málico (g/L)	1,43	0,01	0,85	0,80		0,20	0,01	0,08	0,00	*
Acido láctico (g/L)	0,05	0,01	0,58	0,67		1,74	0,07	1,88	0,07	*
Glicerina (g/L)	7,39	0,45	7,50	0,18		10,82	0,43	11,07	0,12	
Plata (µg/L)	5,00	0,00	10,00	4,24	*	1,00	0,00	1,00	0,00	
L*	92,48	0,98	90,25	2,56		5,77	0,89	5,32	0,25	
a*	4,30	0,51	4,49	0,91		33,02	2,58	32,02	0,74	
b*	14,51	0,96	20,85	4,34	*	9,91	1,52	9,16	0,42	
C*	15,14	1,07	21,37	4,04	*	34,48	2,90	33,31	0,83	
H*	73,53	0,81	77,38	4,93		16,66	1,19	15,96	0,35	
Intensidad colorante						12,74	0,60	13,70	0,47	*
Tonalidad						0,83	0,01	0,86	0,00	*
Antocianos libres (mg/L malv.)						296,70	8,63	312,85	2,90	*
Antocianos polímeros (mg/L malv.)						61,80	4,81	72,95	7,28	*
Catequinas (mg/L cat.)	15,80	2,83	17,45	2,76		223,05	6,15	213,30	1,70	*
Taninos (g/L)	0,17	0,03	0,16	0,04		1,96	0,30	1,61	0,11	
IPT	4,10	0,00	4,65	0,21	*	67,25	4,74	67,75	2,19	
% Copigmentación						5,39	1,27	1,25	1,62	*
% Polimerización						22,92	1,61	40,43	1,19	*
TWC						5,91	0,10	6,31	0,20	*
Acetaldehído (mg/L)	14,35	0,18	14,39	3,87		4,47	0,01	3,84	0,40	*
Acetato de etilo (mg/L)	38,99	2,08	34,51	0,08	*	30,20	0,91	22,99	1,18	*
Metanol (mg/L)	43,75	3,31	40,70	3,68		60,82	0,04	64,62	5,37	
2,3-butanodiona (mg/L)						0,85	0,11	0,88	0,14	
Butirato de etilo (mg/L)	0,30	0,01	0,28	0,00	*	0,20	0,01	0,15	0,03	*
Propanol (mg/L)	18,02	0,25	18,15	0,47		30,73	1,36	32,18	2,03	
Isobutanol (mg/L)	39,90	1,82	34,69	2,00	*	52,49	1,43	48,65	0,74	*
Acetato de Isoamilo (mg/L)	1,55	0,02	1,27	0,04	*	0,80	0,04	0,52	0,12	*
1-Butanol (mg/L)	1,10	0,11	1,19	0,09		2,12	0,07	2,19	0,02	
Isoamilicos (mg/L)	211,96	2,64	195,47	9,16	*	329,11	0,13	305,18	17,23	*
3-OH-2-butanona (mg/L)	0,35	0,08	0,99	0,72		1,67	0,03	2,02	0,06	*
Lactato de etilo (mg/L)	1,10	0,35	3,43	3,55		18,73	0,46	18,15	1,02	

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

4.6. Empleo del CPC en distintas formas de dosificación

En el año 2010 se empleo el producto a base de plata coloidal en dosis de 1 gr/Kg de uva, pero en distintas formas de dosificación, por un lado la adición en polvo de la totalidad del producto CPC tras el estrujado y prensado de la uva (CPC-1), la adición de 0,5 gr/Kg tras el estrujado y

prensado de la uva y otros 0,5 gr/L al final de la fermentación alcohólica (CPC-0,5+0,5) y por último en forma de infusión (CPC-infusión).

En la **Figura 12** se representa la evolución del valor medio de la densidad de los mostos a lo largo de la fermentación alcohólica de los vinos blancos y tintos de 2010 en los que se empleó el aditivo CPC en dosis de 1g/L pero en distintas formas de dosificación. Puede observarse que no existen grandes diferencias entre tratamientos.

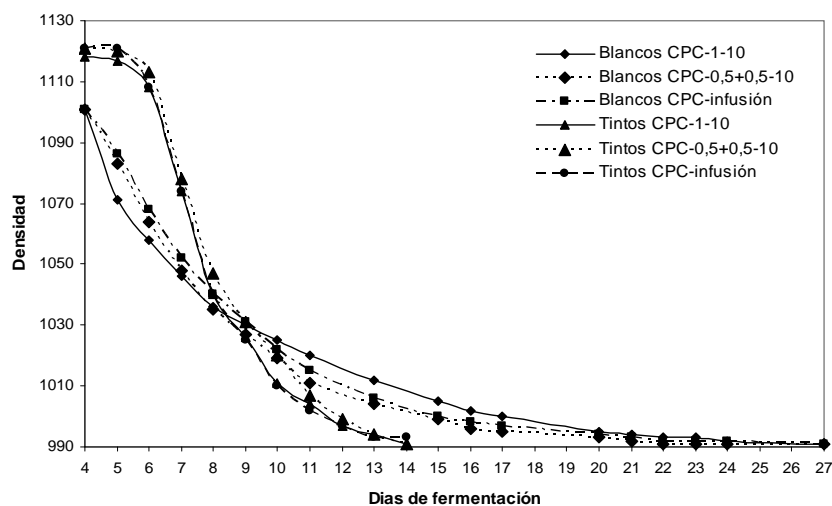


Figura 12: Evolución de la densidad de los mostos en las elaboraciones de 2010 empleando CPC en tres formas distintas de dosificación.

En la **Tabla 13** se presentan los resultados de los recuentos microbiológicos de levaduras, bacterias lácticas y acéticas de los vinos blancos y tintos elaborados en 2010 en los que se empleó como aditivo CPC-1 en tres formas distintas de dosificación. No se aprecian diferencias importantes en los recuentos en función de la forma de dosificación del CPC-1.

Tabla 13: Poblaciones microbianas en tres momentos distintos de las elaboraciones de los vinos elaborados en el año 2010 empleando CPC en tres formas de dosificación.

	Blancos 2010			Tintos 2010		
	F. tumultuosa	Descube	Final FA	F. tumultuosa	Final FA	Final FML
Levaduras CPC-1	2,60E+07	8,30E+06	3,42E+06	3,00E+07	1,56E+05	1,00E+01
Levaduras CPC-0,5+0,5	3,40E+07	6,60E+06	1,09E+06		1,02E+05	2,30E+04
Levaduras CPC-infusión	2,20E+07	5,40E+06	2,79E+06	3,60E+07	1,10E+05	5,90E+03
B. Lácticas CPC-1	4,10E+03	1,08E+03	2,70E+04	4,00E+03	7,40E+05	1,18E+07
B. Lácticas CPC-0,5+0,5	7,20E+02	2,90E+02	2,70E+03	4,30E+03	4,60E+05	4,84E+06
B. Lácticas CPC-infusión	1,20E+03	1,10E+02	1,30E+03	2,00E+03	3,60E+05	3,75E+06
B. Acéticas CPC-1	7,00E+01	8,00E+01	5,00E+01	4,40E+03	1,00E+01	3,00E+01
B. Acéticas CPC-0,5+0,5	6,00E+02	1,00E+02	2,00E+01	7,80E+03	1,00E+01	2,00E+01
B. Acéticas CPC-infusión	3,00E+02	5,00E+01	1,70E+02	3,50E+03	1,00E+01	3,00E+01

Resultados expresados en ufc/mL

En la **Tabla 14** se presentan los análisis de los vinos 2010 en los que se empleó CPC en dosis de 1 gr/L en distintas formas de dosificación.

En cuanto al contenido en Plata de los vinos blancos se observa menor concentración final en los vinos CPC1 que en los otros dos tratamientos. La posible razón es que, en este caso, el producto a base de plata es adicionado totalmente a los mostos al principio y por tanto hay una mayor precipitación del mismo sobre todo en el desfangado.

La dosis de 1 gr/L en polvo produce más acidez total tanto en blancos como en tintos. Respecto de los parámetros de color de los vinos blancos, se han encontrado diferencias estadísticamente significativas. Los vinos obtenidos con dosis de 1 gr de CPC en polvo inicial tienen menos tonos pardos, aunque el valor absoluto de las diferencias no es importante. En el caso de los vinos tintos, son los obtenidos con producto confinado en bolsita (infusión) los que presentan menor luminosidad y por tanto mayor intensidad colorante y menores valores de los parámetros CIELab* a* y b*.

Tabla 14: Análisis de los vinos 2010 en los que se han empleado CPC en distintas formas de dosificación.

	Blancos 2010						Tintos 2010					
	CPC-1		CPC 0,5+0,5		CPC infusión		CPC-1		CPC 0,5+0,5		CPC infusión	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Masa volúmica	0,9882 ^a	0,00	0,9887 ^b	0,00	0,9882 ^a	0,00	0,9837 ^a	0,00	0,9899 ^b	0,00	0,9897 ^b	0,00
Grado alcohólico (% v/v)	14,01 ^b	0,03	13,86 ^a	0,13	13,90 ^{ab}	0,06	15,95 ^a	0,04	15,98 ^a	0,06	16,06 ^b	0,05
Glucosa+Fructosa (g/L)	1,55	0,65	1,85	0,27	1,73	0,02	0,05	0,02	0,05	0,04	0,06	0,01
Acidez total (g/L)	5,03 ^c	0,08	4,63 ^b	0,10	4,44 ^a	0,05	3,93 ^c	0,01	3,89 ^c	0,11	3,68 ^a	0,01
pH	3,84 ^a	0,01	3,84 ^a	0,02	3,89 ^b	0,00	4,39	0,00	4,44	0,01	4,47	0,02
Acidez volátil (g/L)	0,56	0,05	0,54	0,03	0,61	0,06	0,47 ^a	0,00	0,55 ^b	0,09	0,46 ^a	0,06
Acido málico (g/L)	1,43 ^a	0,01	1,57 ^c	0,03	1,47 ^b	0,01	0,20 ^b	0,01	0,09 ^a	0,02	0,10 ^a	0,04
Acido láctico (g/L)	0,05 ^a	0,01	0,10 ^b	0,01	0,09 ^b	0,01	1,74 ^a	0,07	1,94 ^b	0,05	1,78 ^a	0,08
Plata (µg/L)	5,00 ^a	0,00	22,50 ^b	2,12	24,50 ^b	4,95	1,00	0,00	1,50	0,71	4,00	4,24
L*	92,48 ^c	0,98	89,33 ^a	1,20	90,87 ^b	0,11	5,77 ^b	0,89	5,08 ^b	0,65	3,56 ^a	0,49
a*	4,30 ^a	0,51	6,22 ^b	0,41	6,21 ^b	0,14	33,02 ^b	2,58	31,03 ^b	2,23	24,18 ^a	2,77
b*	14,51 ^a	0,96	23,36 ^c	3,38	17,82 ^b	0,67	9,91 ^b	1,52	8,75 ^b	1,12	6,14 ^a	0,84
C*	15,14 ^a	1,07	24,18 ^c	3,37	18,87 ^b	0,59	34,48 ^b	2,90	32,24 ^b	2,45	24,95 ^a	2,90
H*	73,53 ^b	0,81	75,02 ^c	1,14	70,77 ^a	1,06	16,66 ^b	1,19	15,71 ^b	0,85	14,22 ^a	0,30
Antocianos libres (mg/L)							296,70 ^a	8,63	316,30 ^b	17,82	319,50 ^b	6,79
Antocianos polímeros (mg/L)							61,80 ^a	4,81	74,65 ^b	6,15	75,40 ^b	3,68
Catequinas (mg/L cat.)	15,80	2,83	15,55	0,92	18,75	3,46	223,05	6,15	212,60	7,07	217,40	9,33
Taninos (g/L)	0,17	0,03	0,11	0,01	0,13	0,00	1,96	0,30	1,93	0,11	1,95	0,03
IPT	4,10 ^a	0,00	4,65 ^c	0,07	4,30 ^b	0,14	67,25	4,74	69,70	4,95	70,50	1,56
% Copigmentación							5,39 ^c	1,27	0,39 ^b	0,15	0,00 ^a	0,83
% Polimerización							22,92 ^a	1,61	39,38 ^b	0,86	41,03 ^c	0,83
TWC							5,91 ^a	0,10	6,25 ^b	0,29	6,74 ^c	0,21
Intensidad colorante							12,74 ^a	0,60	13,59 ^b	0,59	14,96 ^c	0,33
Tonalidad							0,83 ^a	0,01	0,85 ^b	0,01	0,86 ^c	0,00
Acetaldehído (mg/L)	14,35 ^a	0,18	13,95 ^a	0,48	16,01 ^b	0,37	4,47 ^c	0,01	4,13 ^b	0,00	3,94 ^a	0,18
Acetato de etilo (mg/L)	38,99 ^{ab}	2,08	33,41 ^a	6,76	42,38 ^b	3,21	30,20 ^b	0,91	22,19 ^a	1,91	23,92 ^a	0,32
Metanol (mg/L)	43,75	3,31	39,68	1,63	40,73	3,65	60,82 ^a	0,04	62,52 ^b	1,03	60,58 ^a	0,42
2,3-butanodiona (mg/L)							0,85 ^b	0,11	0,90 ^b	0,05	0,38 ^a	0,33
Butirato de etilo (mg/L)	0,30	0,01	0,28	0,04	0,31	0,01	0,20 ^b	0,01	0,17 ^a	0,00	0,16 ^a	0,02
Propanol (mg/L)	18,02 ^a	0,25	17,99 ^a	0,39	19,18 ^b	0,82	30,73	1,36	33,18	1,83	31,41	1,78
Isobutanol (mg/L)	39,90 ^b	1,82	38,37 ^b	1,53	35,10 ^a	0,81	52,49 ^b	1,43	51,53 ^b	5,99	43,07 ^a	1,85
Acetato de Isoamilol (mg/L)	1,55	0,02	1,31	0,27	1,41	0,04	0,80 ^b	0,04	0,63 ^a	0,02	0,55 ^a	0,15
1-Butanol (mg/L)	1,10	0,11	1,22	0,13	1,28	0,17	2,12	0,07	2,19	0,08	2,01	0,17
Isoamilicos (mg/L)	211,96 ^b	2,64	223,71 ^b	17,18	189,62 ^a	9,27	329,11 ^b	0,13	331,33 ^b	34,95	277,57 ^a	17,29
3-OH-2-butanona (mg/L)	0,35 ^{ab}	0,08	0,41 ^b	0,01	0,30 ^a	0,04	1,67 ^a	0,03	2,02 ^b	0,05	1,71 ^a	0,05
Lactato de etilo (mg/L)	1,10 ^b	0,35	0,84 ^{ab}	0,03	0,60 ^a	0,04	18,73	0,46	17,68	1,33	18,37	0,14

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

En cuanto a los compuestos fenólicos, los resultados son muy parecidos para todos los vinos. Alguna pequeña diferencia sin embargo puede apreciarse, los vinos CPC-1 tienen un menor contenido en antocianos, menor polimerización y total wine color y mayor copigmentación.

Las concentraciones de los compuestos volátiles analizados presentan ciertas diferencias estadísticamente significativas, pero como en los casos anteriores, no son importantes desde el punto de vista práctico.

Al someter a estos vinos a pruebas triangulares de análisis sensorial resultó que, como se podía prever a partir de los resultados fisicoquímicos, los catadores no encontraron diferencias en las características organolépticas de los vinos en función de cada una de las formas de dosificación ensayadas, presentadas de dos en dos. Como excepción se encontraron diferencias en la fase olfativa al nivel del 99% entre los vinos CPC-1 y los CPC-0,5+0,5, y en la fase gustativa entre los CPC-1 y los CPC-infusión al nivel del 95 %.

Tomando estos resultados en conjunto, se observa que la dosificación en forma de infusión produce vinos similares a los obtenidos con las otras dos formas de dosificación y tiene la ventaja de que el producto está en contacto con el vino en todas las fases de la elaboración (no se pierde por precipitación) y además podría ser reutilizable.

4.7. Empleo de CPC con ácido ascórbico en vinos blancos

Se ha estudiado el efecto combinado de la adición de CPC-1 junto con ácido ascórbico, para ello se llevaron a cabo elaboraciones en las que se empleo CPC-1 a las que se le añadía tras el desfangado de los mostos ácido ascórbico en dosis de 100 mg/L. En la **Figura 13** se presenta la evolución de la densidad de los vinos blancos elaborados en el año 2010 en los que se utilizo como aditivo CPC-1 y CPC-1 adicionado de ácido ascórbico. Se ha observado que el empleo de ácido ascórbico retarda ligeramente la fermentación alcohólica.

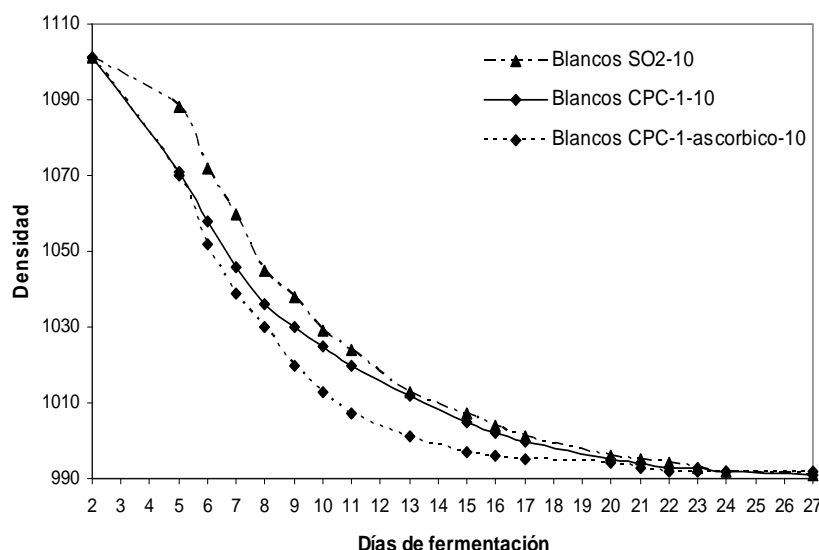


Figura 13: Evolución de la densidad de los mostos en vinos blancos 2010 en las que se ha empleado el producto CPC adicionando de ácido ascórbico en dosis de 100 mg/L.

En la **Tabla 15** se presentan los resultados de los recuentos microbiológicos de levaduras, bacterias lácticas y acéticas de los vinos blancos elaborados en el año 2010 en los que se empleo como aditivo CPC-1 y CPC-1 adicionado de 100mg/l de ácido ascórbico. Se aprecia además al final del proceso un menor contenido en levaduras y bacterias lácticas, aunque estas diferencias observadas son poco importantes.

Tabla 15: Poblaciones microbianas en tres momentos distintos de las elaboraciones de los vinos blancos elaborados en el año 2010 en los que se ha empleado SO₂, CPC y CPC adicionado de 100mg/L de ácido ascórbico.

	Blancos 2010		
	F. tumultuosa	Descube	Final FA
Levaduras SO ₂	2,40E+07	7,00E+06	1,87E+06
Levaduras CPC-1	2,60E+07	8,30E+06	3,42E+06
Levaduras CPC-1-asc	3,60E+07	3,70E+06	7,20E+05
B. Lácticas SO ₂	5,70E+03	1,00E+01	1,00E+01
B. Lácticas CPC-1	4,10E+03	1,08E+03	2,70E+04
B. Lácticas CPC-1-asc	2,00E+01	9,10E+03	5,00E+02
B. Acéticas SO ₂	9,00E+01	5,00E+01	2,60E+01
B. Acéticas CPC-1	7,00E+01	8,00E+01	5,00E+01
B. Acéticas CPC-1-asc	4,00E+01	5,00E+01	3,00E+01

Resultados expresados en ufc/mL

En la **Tabla 16** se presentan los análisis de los vinos blancos 2010 en los que se utilizó como aditivo CPC-1 y CPC-1 adicionado de ácido ascórbico (100mg/L). Con respecto al desarrollo de la fermentación alcohólica, los vinos CPC-1+ácido ascórbico presentan mayor masa volúmica debido a que tienen mas azúcares residuales y por tanto son los de grado alcohólico más bajo lo que podía relacionarse con recuentos más bajos de levaduras.

En cuanto a los ácidos málico y láctico, aunque no se han observado diferencias significativas, entre los tres tratamientos, sí parece apreciarse un inicio de fermentación maloláctica en los vinos CPC-1+ ácido ascórbico, lo que además provoca su menor contenido en acidez total y un mayor pH, y de nuevo nos plantea la incertidumbre sobre el control de este proceso.



La adición de ácido ascórbico aumenta la luminosidad y disminuye el parámetro CIELab a* (menor color rojo) lo que indica que los vinos en los que se empleó el ácido ascórbico tienen menos notas pardas, aunque no evita el aumento del parámetro CIELab b* (color amarillo). En cuanto al ángulo de tono H* no se han observado diferencias significativas entre los vinos tratados con SO₂ y los de CPC-1 con ácido ascórbico.

Imagen 6: Fase visual vinos blancos 2010 SO₂, CPC-1 y CPC-1+ascórbico.

En lo que respecta a los polifenoles, los vinos tratados con CPC tienen menos taninos y catequinas que los de SO₂. Este hecho ya fue observado en la vendimia 2009. Sin embargo al añadir junto al CPC ácido ascórbico el descenso de estos compuestos es menos acusado.

Las pruebas triangulares realizadas para estudiar las consecuencias organolépticas del empleo del ácido ascórbico han indicado que cuando se comparan los vinos blancos CPC-1 con los CPC-1+ascórbico, los catadores no encontraron diferencias significativas en las fases olfativa y gustativa. Cuando se compararon los vinos CPC-1 con los SO₂ se obtuvieron diferencias

significativas al nivel del 99 y 95 % en las fases olfativa y gustativa respectivamente, mientras que al añadir ácido ascórbico, los catadores ya no pudieron diferenciar los vinos de los de SO₂ en la fase gustativa y las diferencias en la fase olfativa bajaron al 95 %.

El ácido ascórbico mejora por tanto las características visuales del vino final, tal y como se esperaba, sin modificar de forma significativa el resto de parámetros.

Tabla 16: Análisis de los vinos blancos 2010 en los que se han empleado CPC y CPC junto con ácido ascórbico.

	Blancos 2010					
	SO ₂		CPC-1		CPC-1 + Ascórbico	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
Masa Volúmica	0,9890 ^b	0,00	0,98825 ^a	0,00	0,98955 ^c	0,00
Grado alcohólico (% v/v)	14,04 ^b	0,08	14,01 ^b	0,03	13,69 ^a	0,06
Glucosa+Fructosa (g/L)	3,28 ^b	0,03	1,55 ^a	0,65	4,48 ^c	0,98
Acidez total (g/L)	4,80 ^b	0,15	5,03 ^b	0,08	4,27 ^a	0,28
pH	3,83 ^a	0,01	3,84 ^a	0,01	3,92 ^b	0,08
Acidez volátil (g/L)	0,53	0,04	0,56	0,05	0,55	0,01
Acido málico (g/L)	1,42	0,04	1,43	0,01	0,79	1,05
Acido láctico (g/L)	0,01	0,00	0,05	0,01	0,68	0,75
Glicerina (g/L)	6,97	0,13	7,39	0,45	7,31	0,29
Plata (µg/L)	3,00 ^a	1,41	5,00 ^{ab}	0,00	6,50 ^b	2,12
L*	97,93 ^c	0,95	92,48 ^a	0,98	94,63 ^b	2,09
a*	0,11 ^a	0,09	4,30 ^b	0,51	0,38 ^a	0,78
b*	4,58 ^a	0,55	14,51 ^b	0,96	12,74 ^b	3,17
C*	4,58 ^a	0,55	15,14 ^b	1,07	12,76 ^b	3,19
H*	88,65 ^b	0,99	73,53 ^a	0,81	88,68 ^b	3,18
Catequinas (mg/L cat.)	42,65 ^c	1,48	15,80 ^a	2,83	29,25 ^b	1,48
Taninos (g/L)	0,27 ^b	0,02	0,17 ^a	0,03	0,24 ^{ab}	0,08
IPT	4,55 ^b	0,21	4,10 ^a	0,00	5,05 ^c	0,07
Acetaldehído (mg/L)	33,10 ^b	6,13	14,35 ^a	0,18	15,57 ^a	5,49
Acetato de etilo (mg/L)	37,24	1,36	38,99	2,08	34,72	3,66
Metanol (mg/L)	43,89	1,00	43,75	3,31	44,86	1,31
Butirato de etilo (mg/L)	0,34 ^b	0,01	0,30 ^a	0,01	0,28 ^a	0,03
Propanol (mg/L)	16,53 ^a	0,10	18,02 ^b	0,25	17,03 ^a	0,98
Isobutanol (mg/L)	43,77 ^b	2,91	39,90 ^a	1,82	38,11 ^a	1,39
Acetato de Isoamilo (mg/L)	1,87 ^c	0,06	1,55 ^b	0,02	1,28 ^a	0,12
1-Butanol (mg/L)	0,93 ^a	0,05	1,10 ^b	0,11	1,11 ^b	0,13
Isoamilicos (mg/L)	233,13 ^b	15,63	211,96 ^a	2,64	205,57 ^a	2,52
3-OH-2-butanona (mg/L)	0,34	0,03	0,35	0,08	0,83	0,59
Lactato de etilo (mg/L)	0,65	0,07	1,10	0,35	3,74	4,38

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos obtenidos con distinto aditivo

4.8. Fermentación maloláctica en coinoculación

Se ha comparado los vinos elaborados con CPC-1 en los que la fermentación maloláctica se ha realizado de manera secuencial (siembra de la bacteria láctica encargada de realizar la fermentación maloláctica al final de la fermentación alcohólica) y en coinoculación (siembra de la bacteria láctica en los mostos después de la siembra de la levadura) (CPC-1-coinoc).

En la **Tabla 17** se presentan los análisis de los vinos. Durante la vendimia 2010 no hubo problemas en el desarrollo de la fermentación maloláctica, salvo para el caso de algún vino blanco (datos anteriormente mostrados).

Tabla 17: Análisis de los vinos tintos en los que se realizó la fermentación maloláctica de manera secuencial y en coinoculación.

	Tintos 2010				
	CPC-1		CPC-1 coino		
	Media	SD	Media	SD	
Masa Volúmica	0,9837	0,00	0,9898	0,00	*
Grado alcohólico (% v/v)	15,95	0,04	16,40	0,21	*
Glucosa+Fructosa (g/L)	0,05	0,02	0,04	0,04	
Acidez total (g/L)	3,93	0,01	3,88	0,05	
pH	4,39	0,00	4,49	0,01	*
Acidez volátil (g/L)	0,47	0,00	0,52	0,07	
Acido málico (g/L)	0,20	0,01	0,18	0,03	
Acido láctico (g/L)	1,74	0,07	1,68	0,01	
Glicerina (g/L)	10,82	0,43	11,29	0,03	
Plata (µg/L)	1,00	0,00	1,00	0,00	
L*	5,77	0,89	4,92	0,08	
a*	33,02	2,58	30,56	0,31	
b*	9,91	1,52	8,45	0,14	
C*	34,48	2,90	31,70	0,33	
H*	16,66	1,19	15,45	0,11	
Intensidad colorante	12,74	0,60	13,09	0,02	
Tonalidad	0,83	0,01	0,82	0,01	
Antocianos libres (mg/L malv.)	296,70	8,63	327,60	0,99	*
Antocianos polímeros (mg/L malv.)	61,80	4,81	72,40	7,50	*
Catequinas (mg/L cat.)	223,05	6,15	210,20	9,90	
Taninos (g/L)	1,96	0,30	1,66	0,16	
IPT	67,25	4,74	69,40	4,10	
% Copigmentación	5,39	1,27	0,65	0,53	*
% Polimerización	22,92	1,61	29,04	13,48	
TWC	5,91	0,10	5,97	0,04	
Acetaldehído (mg/L)	4,47	0,01	4,47	0,68	
Acetato de etilo (mg/L)	30,20	0,91	32,48	1,22	*
Metanol (mg/L)	60,82	0,04	63,14	7,25	
2,3-butanodiona (mg/L)	0,85	0,11	1,72	0,69	*
Butirato de etilo (mg/L)	0,20	0,01	0,16	0,05	
Propanol (mg/L)	30,73	1,36	32,70	2,39	
Isobutanol (mg/L)	52,49	1,43	43,65	1,67	*
Acetato de Isoamilo (mg/L)	0,80	0,04	0,50	0,12	*
1-Butanol (mg/L)	2,12	0,07	1,98	0,08	*
Isoamilicos (mg/L)	329,11	0,13	282,84	2,67	*
3-OH-2-butanona (mg/L)	1,67	0,03	1,74	0,07	
Lactato de etilo (mg/L)	18,73	0,46	18,66	0,43	

* Indica la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los vinos

Se observa que los vinos CPC-1 en los que se realizó la fermentación maloláctica en co inoculación tienen mayor grado alcohólico (igual que ocurre con los vinos control elaborados con SO₂; datos no mostrados).

En relación a los parámetros relacionados con el color los vinos CPC coinoculados tienen mayor contenido en antocianos pero estos están menos copigmentados, presentando el resto de parámetros valores muy similares.

En cuanto a los componentes volátiles pocas diferencias han sido observadas en los vinos tintos CPC-1 en función de la forma de realizarse la fermentación maloláctica (secuencial o en coinoculación), y las obtenidas no son enológicamente importantes.

Estos resultados nos permiten concluir que el producto CPC es compatible con la técnica de la coinoculación de bacterias lácticas durante la fermentación alcohólica, lo que además permite

controlar la cepa de bacteria láctica responsable de la fermentación maloláctica dadas las incertidumbres sobre el control de estos microorganismos por el CPC.

4.9. Evolución de los vinos a temperatura ambiente con CPC

Para estudiar el efecto que ejerce el producto de plata coloidal (CPC) en la conservación de los vinos a temperatura ambiente se ha llevado a cabo una experiencia adicional. Se tomo una fracción de todos los vinos elaborados en el año 2010 y se conservaron en bodega a temperatura ambiente durante aproximadamente 7 meses. Estos vinos se dividieron en dos lotes, por un lado aquellos en los que se añadía CPC en infusión en dosis de 1gr/L y los mismos que se conservaban tal cual.

En las **Figuras 15**, se muestran la evolución de la acidez volátil de los vinos blancos y tintos respectivamente durante la conservación en bodega a temperatura ambiente.

Al comparar los vinos SO_2 en los que se llevo a cabo la corrección del sulfuroso libre tras la fermentación alcohólica con respecto a los vinos SO_2 que no fueron corregidos se observa que se produce un incremento de acidez volátil mayor en estos últimos, hecho que era esperable ya que los vinos estaban desprotegidos de SO_2 . Para el tratamiento CPC-1 se aprecian aumentos de acidez volátil mayores que en el caso de los vinos SO_2 y estos son aún mayores en los vinos en los que no se añadió CPC en forma de infusión durante su conservación.

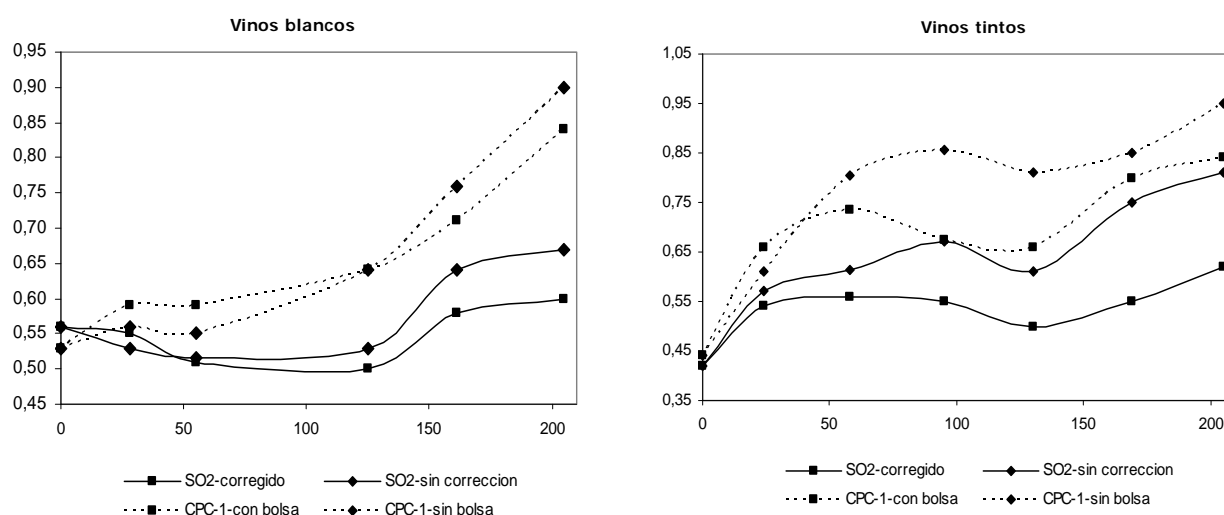


Figura 15: Evolución de la acidez volátil de los vinos blancos y tintos durante la conservación a temperatura ambiente empleando CPC en infusión comparando los vinos SO_2 con los CPC-1.

Con respecto al resto de experimentos (dosis de CPC, adición de ascórbico, coinoculación, forma de dosificación) no se observan diferencias importantes.

Para confirmar si el origen de los aumentos de acidez volátil observados procedía del crecimiento de bacterias acéticas durante la conservación de los vinos o eran debidos únicamente a fenómenos de oxidación se realizaron recuentos microbiológicos de bacterias acéticas en el momento final de la conservación de los vinos. En la **Tabla 18** se presentan los resultados de los recuentos de bacterias acéticas obtenidos. Se observa que salvo en el caso de los vinos tintos CPC-0,1 cuyos recuentos fueron de $7,00E+04$, en el resto de los casos no se apreciaron poblaciones de bacterias acéticas, lo que confirma que los incrementos de acidez volátil

observados durante la conservación de los vinos a temperatura ambiente fueron debidos a la oxidación. Estos resultados nos indican que tras la fermentación los vinos quedan protegidos ya que no se observan crecimientos de bacterias acéticas durante su conservación a temperatura ambiente ni en los vinos conservados con CPC en forma de infusión ni en los vinos conservados sin CPC y nos vuelve a confirmar que el producto CPC ejerce un control adecuado frente a las bacterias acéticas.

Tabla 18: Recuentos de bacterias acéticas en los vinos en los que se ha empleado durante su conservación a temperatura ambiente CPC en infusión.

	Blancos		Tintos	
	Con CPC-infusión	Sin CPC-infusión	Con CPC-infusión	Sin CPC-infusión
Vinos control SO ₂	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
CPC-1	3,40E+03	0,00E+00	1,00E+01	0,00E+00
CPC-0,1	0,00E+00	0,00E+00	7,00E+04	0,00E+00
CPC-0,5+0,5	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	7,00E+03
CPC-1-infusión	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

4.10. Control de la población de levaduras y bacterias con distintas dosis de CPC

Con el propósito de estudiar y optimizar las dosis de CPC que ejercen el control más adecuado sobre las poblaciones de levaduras, bacterias lácticas y acéticas se han realizado durante el año 2010 microvinificaciones a escala de laboratorio en mostos blancos y vinos tintos. Estas experiencias se han realizado en volúmenes de 50 mL de mosto y 250 mL de vino.

4.10.1. Levaduras

Se han realizado microvinificaciones en 50 mL de mosto ensayándose dosis de CPC que oscilan entre 1 a 100 gr/L. Estos mostos se inoculaban con levadura comercial LSA con poblaciones de 1,00E+06, 1,00E+03 y 1,00E+02 ufc/mL. Además estos mostos se incubaban a temperaturas de 25 y de 10°C.

La evolución de la fermentación se determinó analizando el contenido en glucosa y fructosa por métodos enzimáticos y en todos los casos se agotaron completamente los azúcares del mosto de partida.

Estos resultados indican que la adición de CPC no limita el crecimiento de las levaduras, aunque estas se encuentren en el mosto en baja población. Hay que hacer constar sin embargo que la cepa comercial de levadura que hemos utilizado en estos ensayos es del género y especie *Saccharomyces cerevisiae*, altamente fermentativa y resistente a la dosis elevadas de sulfuroso. Sería importante en este apartado estudiar el comportamiento del producto CPC con respecto a otras cepas de levaduras que puedan encontrarse en mostos y vinos en mucha menor proporción y mucho más sensibles al sulfuroso pero que sean perjudiciales como pueda ser el caso de *Brettanomyces* en vinos tintos durante su conservación, o levaduras de primera fase de fermentación *Hansenula*, *Pichia* etc.

4.10.2. Bacterias lácticas

Para realizar estos ensayos se partió de vino tinto de final de fermentación alcohólica con un contenido en ácido málico de 1,78 g/L. Se realizaron fermentaciones malolácticas en un volumen de 50 mL, sembrándose con la cepa comercial de *Oenococcus oeni* PN4 según indicaciones de la casa comercial para conseguir poblaciones en el vino de 1,00E+06 ufc/mL. Las dosis de CPC

utilizadas fueron de, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 gr/L de CPC. Como control positivo se utilizó el mismo vino, cuyo contenido en sulfuroso libre era de 2 mg/L y como control negativo el vino corregido con sulfuroso libre con 1 g/L. Las fermentaciones malolácticas se realizaron a temperatura de 20°C.

Se realizaron determinaciones periódicas del contenido de ácido málico. A los 20 días el vino usado como control positivo había realizado la degradación completa del ácido málico mientras que el vino usado como control negativo y todos los vinos a los que se adicionó CPC no habían realizado el proceso.

Estos resultados indican que el producto CPC ejerce una acción importante sobre el control de las bacterias lácticas, y que a partir de 10 g/L limita el crecimiento en este caso de *Oenococcus oeni*.

Estos resultados no apoyan, al menos aparentemente, las observaciones de desarrollo no controlado de la fermentación maloláctica en algunos vinos de 2009 y 2010. Una posible explicación puede aventurarse teniendo en cuenta que en todos los casos estas fermentaciones malolácticas no deseadas se desarrollaron en vinos a los que el CPC se había añadido en forma de polvo en el encubado. Dada la rápida floculación y precipitación del producto, el medio podría quedar desprotegido frente al crecimiento de la biota láctica, mientras que en los vinos con CPC en infusión, el producto está permanentemente en contacto con el medio.

4.10.3. Bacterias acéticas

Para estudiar el efecto del CPC sobre las bacterias acéticas se empleó vino tinto al que se le determinó el contenido inicial de acidez volátil (0,44 g/L expresado en ácido acético). Estas experiencias se llevaron a cabo en volúmenes de 200 mL de vino. Como control positivo se empleó el vino tal cual (14 mg/L de sulfuroso libre) y como controles positivos los vinos corregidos a 30 y 60 mg/L de sulfuroso libre. Las dosis empleadas de CPC fueron: 0,1, 0,5, 1, 5 y 10 g/L de CPC. El cultivo comercial de bacterias acéticas se sembró en dos concentraciones $1,00E+06$ y $1,00E+03$ ufc/mL.

La evolución del proceso se siguió determinado periódicamente la acidez volátil de estos vinos. Cuando se empleó el cultivo comercial de bacterias acéticas en dosis de $1,00E+06$ ufc/mL (dosis habituales empleadas en vinagreras) a los tres días todos los vinos mostraron valores de acidez volátil del orden de 1,20 g/L de ácido acético. Por el contrario al sembrar el cultivo comercial con una población inicial de $1,00E+03$ ufc/mL (la que podría tener de forma natural un mosto o vino en bodega) tras 15 días de seguimiento de los valores de la acidez volátil todos los vinos, tanto los tratados con CPC como el vino usado como control positivo como los controles negativos corregidos con SO_2 mostraban idénticos valores de acidez volátil que el vino inicial.

Esto vuelve a confirmar los resultados comentados anteriormente en esta memoria que indica que el CPC ejerce un efecto parecido al sulfuro en el control de las poblaciones de bacterias acéticas.

5. CONCLUSIONES

Tras los resultados expuestos a lo largo de esta memoria, se pueden enumerar una serie de conclusiones finales que se consideran las más importantes sobre las propiedades y efectos del CPC y al mismo tiempo algunas recomendaciones.

1.- El complejo de plata coloidal ensayado es capaz de controlar la población microbiana (levaduras, bacterias lácticas y bacterias acéticas) presente en las elaboraciones de vinos blancos

y tintos de forma similar a como lo hace el SO₂. Sin embargo el desencadenamiento de la fermentación maloláctica en algunos de los vinos obtenidos en 2009 y 2010 (en contra de los resultados de las experiencias “*in vitro*” con bacterias lácticas), obligan a realizar más observaciones en experiencias en las que el CPC se encuentre en contacto permanente con el medio (infusión).

2.- No se observan grandes diferencias en la velocidad de fermentación de los mostos en función del aditivo ensayado.

3.- Aunque se constata una mayor concentración de ión Plata en las vinificaciones realizadas con CPC, los valores alcanzados están muy por debajo de los 100 µg/L que la OIV ha establecido como límite legal en su norma de tratamiento de vinos con cloruro de plata (OIV, 2009. Resolution Oeno 45/2009) y en la versión del Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis.

4.- Los vinos tintos jóvenes obtenidos con CPC presentan características químicas y sensoriales muy semejantes a los obtenidos con el conservante tradicional. Las diferencias más importantes se encuentran en la concentración de las distintas familias de compuestos fenólicos, más altas en los vinos elaborados con SO₂ a pesar de lo cual la intensidad colorante es más alta en los vinos CPC.

5.- Los vinos blancos obtenidos con CPC han resultado ser muy parecidos en lo que respecta a parámetros relacionados con la fermentación pero desde el punto de vista del color están claramente más oxidados que los obtenidos con SO₂. Esta oxidación puede ser evitada el menos en parte empleando ácido ascórbico aunque habría que estudiar el momento más oportuno de su adición.

6.- La utilización del CPC en forma de bolsa de infusión se ha mostrado como la más efectiva al asegurarse el contacto permanente del producto con el vino durante todo el proceso. Ello permitiría además su reutilización, aunque para asegurar este hecho habría que realizar algún experimento adicional.

6. PUBLICACIONES, CONGRESOS, JORNADAS REALIZADAS.

Autores: Izquierdo Cañas, P. M., García Romero, E., Huertas Nebreda, B., Gómez Alonso, S.
Título: **Colloidal silver complex as alternative to sulfur dioxide in winemaking.**
Revista: Food Control (enviado)

Izquierdo Cañas, P. M., García Romero, E., Huertas Nebreda, B., Gómez Alonso, S.
Título: **Replacing sulfur dioxide with a colloidal silver complex in winemaking: Chemical and sensory changes in wine aroma.**
Tipo de participación: Póster
Congreso: Macrowine
Publicación: Actas del Congreso
Lugar de celebración: Turín Fecha: 16 al 18 de junio 2010

Autores: García Romero, E., Izquierdo Cañas, P. M., Huertas Nebreda, B., Gómez Alonso, S.,
Título: **Wine phenolic compounds: Effects of replacing sulfur dioxide with a colloidal silver complex during winemaking.**

Tipo de participación: Póster

Congreso: Macrowine

Publicación: Actas del Congreso

Lugar de celebración: Turín Fecha: 16 al 18 de junio 2010

Autores: Izquierdo Cañas, P. M., García Romero, E., Gómez Alonso, S., García Martín, L.

Título: **Effects of replacing sulphur dioxide with colloidal silver during winemaking**

Tipo de participación: Póster

Congreso: XXXIV Congreso Mundial de la Viña y el Vino

Publicación: Actas del Congreso

Lugar de celebración: Oporto Fecha: 20 al 27 de junio 2011

7. BIBLIOGRAFIA.

Abe, Y., Ueshige, M., Takeuchi, M., Ishii, M., Akagawa, Y., (2003). Cytotoxicity of antimicrobial tissue conditioners containing silver-zeolite. *Int. J. Prosthodont.* 16, 141-144.

Aerny, J., (1996). Composés azotes des moûts et de vins. *Revue Suisse de Viticulture d'Arboriculture et horticulture*, 28, 161-165.

Atiyeh, B.S., Costagliola, M., Hayek, S.N., Dibo, S.A., (2007). Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns*, 33, 139-148.

Bakker J., Bridle P., Bellworthy, S.J., Garcia-Viguera, C., Reader, H.P., Watkins, S.J. (1998). Effect of Sulphur Dioxide and Must Extraction on Colour, Phenolic Composition and Sensory Quality of Red Table Wine. *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 78, 297-307.

Boulton, R.B. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 52, 67-87.

Brandt, D., Park, B., Hoang, M., Jacobe, H.T., (2005). Argiria secondary to ingestion of homemade silver solution. *J. Am. Acad. Dermatol*, 53, S105-S107.

Directiva 2003/89/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 10 de noviembre de 2003, por la que se modifica la Directiva 2000/13/CE en lo que respecta a la indicación de los ingredientes presentes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea de 25.11.2003 N° L308/15.

Fondevila, M., Herrer, R., Casallas, M.C., Abecia, L., Ducha, J.J. (2009). Silver nanoparticles as a potencial antimicrobial additive for weaned pigs. *Animal Feed science and Technology*, 150, 3-4, 163-336.

Garde-Cerdán, T., Marsellés-Fontanet, A.R., Arias-Gil, M., Ancín-Azpilicueta, C., Martín-Belloso, O. (2008). Influence of SO₂ on the evolution of volatile compounds through alcoholic fermentation of must stabilized by pulsed electric fields. *European Food Research and Technology* 227, 401-408.

Gastaminza, G., Quirce, S., Torres, M., Tabar, A., Echechipía, S., Muñoz, D., Fernandez De Corres, L. (1995), Pickled onion-induced asthma: a model of sulfite-sensitive asthma? *Clin. Exp. Allergy* 25, 698-703.

Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2° partie. *Conn. Vigne Vin*, 18, 253-271.

Hwang, M.G., Katayama, H., Ohgaki, S., (2007). Inactivation of *Legionella pneumophila* and *Pseudomonas aeruginosa*: evaluation of the bactericidal ability of silver cations. *Water Res.* 41, 4097-4104.

- Klasen, H.J. (2000a). Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26, 117-130.
- Klasen, H. J., (2000b). A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 26, 131–138
- Lam, P.K., Chan, E.S., Ho, W.S., Liew, C.T., (2004). In vitro cytotoxicity testing of nanocrystalline silver dressing (Acticoat) on cultured keratinocytes. *Br. J. Biomed. Sci.*, 61. 125-127.
- Lansdown, A.B., (2006). Silver in health care: antimicrobial effects and safety in use. *Curr. Probl. Dermatol.*, 33, 17-34.
- Lustrato, G., Alfano, G., Belli, C., Grazia, L., Iorizzo, M., Maiuro, L., Massarella, F., Zanardini, E., Ranalli, G. (2003). Controlling grape must fermentation in early winemaking phases: the role of electrochemical treatment. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 1087–1095.
- Marambio-Jones, C., Hoek, E.M.V. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research* 12, 1531-1551.
- Nagel, C.W., Glories, Y. (1991) Use a modified dimethylaminocinnamaldehyde reagent for analysis of flavanols. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 4, 364-366
- Office International de la Vigne et du Vin, 2004. Recueil des Methodes Internationales d'Analyse des Vins et des Mouts. OIV, Paris, 2004
- OIV, 2006. Resolution Oeno 1/2006. Determination of the Chromatic Characteristics of Wine According to Cielab
- OIV, 2009. Resolution Oeno 45/2009. Treatment with silver chloride.
- OIV 2010. OIV-MA-C1-01 Maximum Acceptable Limits of Various Substances. In: Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Edition 2011.
- Percival S.L., Bowler P.G., Russell D., (2005). Bacterial resistance to silver in wound care. *Journal of Hospital Infection*, 60, 1-7.
- Porter, L. J., Hrstich, L.N., Chan B.G. (1986). The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry*, 25, 223-230.
- Pradeep T., Anshup 2009. Noble metal nanoparticles for water purification: A critical review. *Thin Solid Films*, 517, 6441-6478.
- Reglamento (Ce) N° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008 sobre aditivos alimentarios. Diario Oficial de la Unión Europea de 31.12.2008 N° L354/16.
- Ribereau-Gayon, P., Stronestreet, E. (1965). Le dosage des anthocyanes dans les vins rouges. *Bulletin de la Société de Chimie*, 9, 2649-2652.
- Ribereau-Gayon J., Peynaud E., Sudraud P., Ribereau-Gayon, P. (1989). Tratado de Enología, Ciencias y Técnicas del Vino”. Ed. Hemisferio Sur. Argentina.
- Romano, P., Suzzi, G. (1993). Sulfur dioxide and wine microorganisms. In: Fleet GH (ed) Wine microbiology and biotechnology. Harwood Academic Publishers, Victoria, 373–393.
- Silver, S, Phung, LT, Silver, G. (2006). Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind. Microbiol Biotechnol*, 33, 627–634.
- Somers, T.C. Evans, M.E. (1976). Spectral evaluation of young red wines: anthocyanin equilibria, total phenolics, free and molecular SO₂, “Chemical age”. *J.Sci. Food Agric.*, 28, 279-287.
- Sonni F., Cejudo-Bastante, M.J., Chinnici, F., Natalia, N., Riponia, N. (2009). Replacement of sulfur dioxide by lysozyme and oenological tannins during fermentation: influence on volatile composition of white wines. *Journal of the Science of the Food and Agriculture*, 89, 688-696.
- Spencer, R.C., (1999). Novel methods for the prevention of infection of intravascular devices. *J. Hosp. Infect*, 43, S127-S135.

- Sudraud, P. (1958). Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *An Technol. Agric.*, 7, 203-208.
- Tankhiwale, R., Bajpai, S.K. (2010). Silver-nanoparticle-loaded chitosan lactate films with fair antibacterial properties. *Journal of Applied Polymer Science*, 115, 1894-1900.
- UNE 97-006-92. AENOR. Análisis sensorial. Prueba triangular.
- Vivas, N., Glories, V., Lagune, L., Sancier, C., Augustin, M. (1994). Estimation de degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-diméthylaminocinnamaldéhyde. *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 28, 4, 319-336,
- Wadhera A., Fung M., (2005). Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver. *Dermatol. Online J.* 11 (1),12 (<http://dermatology.cdlib.org/111>).
- Warriner R., Burrell R.E., (2005). Infection and the chronic wound: a focus on silver. *Adv. Skin Wound Care*, 18, 2-12.
- World Health Organization (2009). Evaluation of certain food additives: Sixty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series No 952.
- Wright J.B., Lam K., Burrell, R.E., (1994). Wound management in an era of increasing bacterial antibiotic resistance: a role for topical silver treatment. *Am. J. Inf. Control*, 26, 15-21