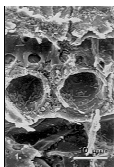


Estudio comparativo de sistemas de desinfección de barricas de vino como alternativas al empleo del sulfuroso

Antonio Palacios; Ixone Borinaga y David Castillo
Laboratorios Excell Ibérica. Polígono La Portalada. C/ Planillo Nº 12, 26006 Logroño, La Rioja (apalacios@labexcell.com). Tel. 941 445106 – www.labexcell.com

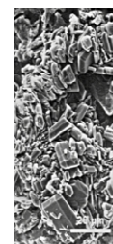
1-. Introducción:

El uso de barricas de roble en la elaboración y crianza de los vinos es una práctica que se considera como un elemento muy favorable en la participación y evolución organoléptica de los vinos. Durante la crianza en barricas, los intercambios vino/madera enriquecen en aromas y sensaciones gustativas el producto, además de favorecer una micro-oxigenación que provoca una estabilidad física y química en el producto y le confiere la delicadeza, equilibrio y complejidad aromática tan apreciadas por el consumidor. La barrica usada, no posee el mismo potencial que el de una nueva, pero encierra todavía un excelente valor de utilización para numerosos vinos y productos alcohólicos a un coste menor, por lo que su buen mantenimiento es imprescindible para este fin.



Los problemas que se presentan durante la crianza del vino están esencialmente asociados a las contaminaciones microbiológicas o químicas. En ocasiones, el desarrollo de una flora indeseable puede alterar el producto de manera importante, incluso volverlo inapropiado para su consumo. La utilización de barricas usadas, mal mantenidas, aumenta dicho riesgo, pudiendo dar lugar a la aparición del picado acético, el carácter fenolado o “Brett”, el picado láctico, enfermedad de la grasa o la enfermedad del amargor.

Además, los depósitos de tartrato formados durante la crianza se acumulan adheridos en las paredes internas de la barrica y sirven de refugio a los procesos microbianos como potenciales contaminantes. Se ha establecido que una barrica usada de 225 litros contiene alrededor de 5 litros de vino retenidos en los primeros milímetros de las duelas, lo que representa un volumen de vino muy importante nada desdeñable. La estructura micro-porosa de la madera, sobre todo en el roble francés, favorece la penetración de los microorganismos en profundidad y vuelve su limpieza y desinfección particularmente en tareas de difícil resolución, especialmente crítico en el caso de contaminación por parte de *Brettanomyces*, levadura causante del carácter fenolado del vino.



En este sentido, el carácter fenolado del vino es un problema sensorial importante, ya que ciertos compuestos fenólicos volátiles tienen umbrales de detección bajos y se hacen dominantes de los aromas del vino, escondiendo el carácter varietal, afrutado e incluso de la madera. *Brettanomyces* produce fenoles volátiles como el 4-vinilguayacol y el 4-vinilfenol a partir de ácidos hidroxicinámicos, como ferúlico y p-cumárico respectivamente. Los vinilderivados igualmente pueden acabar convirtiéndose en etil-derivados.

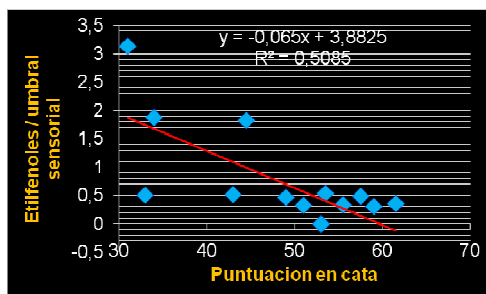
Los fenoles volátiles tienen un aroma característico que en muchos casos se considera un defecto en los vinos. Se les denomina según la terminología inglesa “phenolic off-flavour” (POF). Se ha comprobado que el género *Saccharomyces* solo llega a producir los vinilfenoles, pero si en el proceso de elaboración posteriormente aparecen levaduras contaminantes del tipo *Brettanomyces/Dekkera*, estos pueden ser transformados a etilfenoles.

La problemática sensorial de los fenoles volátiles es un tema muy tratado en la actualidad. Esta problemática afecta especialmente a vinos de crianza o que pasan cierto tiempo en barrica. De modo genérico, los vinos que contienen niveles apreciables de fenoles volátiles se les describen con carácter “Brett”. Los descriptores típicos del carácter fenolado del vino son: plástico, goma quemada, tirta, medicina (farmacia), aromas animales, estiércol, boñiga, cuadra, establo, sudor de caballo, perro mojado, calcetín usado.

En la gráfica inferior (*figura 1*) se representa un estudio sensorial de vinos Crianza de Rioja, tomando en consideración 13 vinos representativos de la región que fueron analizados organolépticamente por 4 expertos en el ámbito internacional a nivel de mercados. En el eje horizontal se representan las puntuaciones de preferencia hedónica y en el eje vertical las unidades olfativas de etilfenoles de los vinos catados (concentración de etilfenoles en µg/L de los vinos/umbral sensorial). Lo que podemos deducir de

este estudio es que si parece necesaria la ausencia o baja concentración por debajo del umbral sensorial de los etilfenoles para poder obtener una alta valoración por los expertos, sin embargo, la ausencia de los mismos, no garantiza el éxito en cata. Es necesario y entonces posible, construir valor sensorial mediante buenas prácticas enológicas sobre vinos, pero siempre y cuando éstos estén “limpios”. Como podemos observar, el coeficiente de correlación no es muy elevado, debido precisamente a que en bajas valoraciones de cata existen vinos tanto con altos contenidos en etilfenoles como bajos.

Figura 1: recta de correlación entre etilfenoles y análisis sensorial en vinos crianza de Rioja.



El mechado de sulfuroso ha sido una práctica tradicional muy utilizada en las bodegas para la desinfección de barricas. Es una práctica que se ha utilizado desde la época de los romanos y que ayuda a mantener el parque de barricas en buen estado frente a microorganismos alterantes. La forma tradicional consiste en la quema de una pastilla de azufre en el interior de las barricas vacías, la combustión del azufre produce el dióxido de azufre, que es el que tiene efectos biocidas sobre la madera.

La problemática actual proviene de la Directiva 98/8 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de Febrero de 1998 sobre Biocidas, transpuesta en España mediante el Real Decreto 1054/2002. El objetivo de la norma, es la protección de la salud de las personas, de los trabajadores, y del medioambiente. Se han establecido una serie de fechas y procedimientos de revisión y/o evaluación del riesgo de las nuevas sustancias activas consideradas como biocidas, y de las ya existentes para distintos usos o categorías también preestablecidos, y que están contenidas en los anexos. Se ha establecido además un Programa de Evaluación del Riesgo que tiene varios pasos: identificación de las sustancias activas existentes, notificación de la industria del interés de la inclusión de alguna de estas sustancias en alguno de los anexos y la revisión de la permanencia o no, para alguno de los usos concretos que se establecen, y en el que entra el SO_2 como biocida. La normativa se enmarca en el proceso de revisión de la legislación comunitaria y nada tiene que ver con el contenido en esta sustancia en los vinos de forma natural, ni con la práctica enológica de adición de sulfuroso para proteger a los vinos de la oxidación o como conservante.

Si se quiere continuar utilizando el SO_2 para la limpieza de barricas; el sector, tiene que defender su registro y autorización, por razones industriales, comerciales o económicas, y demostrar que no presenta problemas de seguridad e higiene en el trabajo, ni que presenta impactos negativos en el medioambiente, que impidan continuar utilizándolo. Nos parezca absurda la norma o no, que a priori lo parece, el sector debe reaccionar en dos direcciones, ambas necesarias y muy complementarias. La primera en la realización del estudio previamente mencionado para anular y/o retrasar la aplicación de la directiva, y la segunda, en el estudio de técnicas alternativas que puedan sustituir al SO_2 en la desinfección de barricas. En el presente artículo se presentan estudios comparativos realizados en bodegas durante más de dos años de trabajo y seguimiento.

2.- Pasos imprescindibles y tecnologías posibles en el mantenimiento de barricas de madera:

Para un buen mantenimiento de las barricas de madera en bodega es necesario llevar a cabo un trabajo exhaustivo, secuencial, ordenado y profesionalizado como se expone a continuación.

2.1.- Enjuague: eliminación de manchas macroscópicas poco o no adheridas a la superficie. Para ello se utilizan tubos de enjuague, que trabajan a presión baja o media (2-15 bares) con caudales que pueden variar entre los 10 y los 45 l/min y permiten únicamente la eliminación de las manchas más burdas o de los residuos de productos de limpieza, bien por disolución o mediante su arrastre.

2.2-. Limpieza: eliminación de las manchas adheridas y de los gérmenes gracias a la acción mecánica y/o química de los detergentes. Para ello se utiliza agua caliente (65-85°C), lo que acelera y aumenta la eficacia del proceso de limpieza; la temperatura debe ser adaptada a la eventual presencia de productos de limpieza y alta presión (100-120 bares) para facilitar la acción mecánica sobre los depósitos incrustados; existe riesgo de destrucción de la estructura de la madera, inexistente si < 120 bares; necesita la utilización de cabezales rotatorios multi-direccionales y tubos de aspersión adaptados para cubrir toda la superficie de la barrica en poco tiempo y con el mínimo consumo posible de agua, junto con una fuerte aspiración de las aguas residuales de lavado, por lo que se aconseja lavar con equipos que laven con la boca de la barrica hacia abajo, lo que facilita una limpieza más segura y eficaz.

En la madera, incluso la limpieza más eficaz es superficial. Es imposible limpiar realmente más allá de los 0,5 a los 1,5 mm de profundidad simplemente con agua, aunque sea a alta presión. La acción del detergente permite acelerar la limpieza ayudando a desincrustar los depósitos presentes en los micro poros abiertos de las duelas de los toneles. Pero estos detergentes bajo ningún concepto deben penetrar demasiado profundamente en la madera, ya que en tal caso sería imposible garantizar su eliminación total mediante el aclarado. La acción del detergente debe limitarse a la superficie de las duelas y la penetración no debe exceder los 2 ó 3 mm. Los agentes químicos empleados son alcalinos fuertes (hidróxido de sodio), alcalinos moderados (carbonato de sodio), tensio-activos y agentes quelantes, también llamados secuestradores o complejantes.

2.3-. Desinfección: la desinfección no equivale a esterilización (total eliminación de gérmenes). Supone la destrucción de gérmenes viables para reducir en profundidad las poblaciones residuales mediante la acción química y/o física.

2.3.1-. Desinfección por vías químicas: se realiza mediante *agentes acidificantes* como el dióxido de azufre, empleado en forma líquida sobre el vino en solución de metabisulfito de sodio y en forma gaseosa sobre la madera y el vino, mediante combustión de azufre o la utilización de gas licuado.

También mediante *agentes oxidantes*, aunque su utilización puede alterar la composición de la madera. Los oxidantes halogenados (clorados y bromados) han de evitarse debido al riesgo de formación de fenoles halógenados precursores de halo-anisoles como el 2,4,6-tricloroanisol (TCA) y el 2,4,6-tribromoanisol (TBA).

Se emplean entonces peróxidos, como el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada; H_2O_2), con acción lenta y poco eficaz a menos de 60°C; sales de peróxido (percarbonato de sodio, $Na_2CO_3 \cdot 5H_2O_2$) o persulfato de potasio ($KHSO_5$); ácido peracético, con acción desinfectante en frío a partir de un 1%. El *permanganato* (permanganato de potasio $KMnO_4$) con acción desodorizante pero escasamente desinfectante. El *ozono* (O_3) es una gas muy oxidante, tóxico (límites de exposición en fase gaseosa de 120 $\mu g/m^3/24h$, 200 $\mu g/m^3$ en el lugar de trabajo, 400 $\mu g/m^3/h$ suelo de toxicidad) y explosivo. Su utilización sólo es posible tras su disolución en agua fría para producir una solución de ozono activo que contenga entre 3 y 5 mg/L de O_3 .

El ozono produce una desinfección rápida a pH neutro por acción directa y por sus productos de degradación en el agua, en concreto de los radicales libres $O^\cdot$ y $HO^\cdot$. El ozono es un desinfectante, no tiene propiedades limpiadoras. Teniendo en cuenta su modo de actuación, es indispensable emplearlo sobre superficies perfectamente limpias para poder desinfectar. El uso de ozono constituye una técnica perfectamente eficaz para la desinfección en frío de las cubas de acero inoxidable, resinas epóxicas, canalizaciones y cadenas de embotellado. En el caso de recipientes de madera, reacciona parcialmente enfrentada al ozono limitando su acción, en concreto, en profundidad.

El problema suscitado en la actualidad deriva de la buena eficacia en el efecto biocida y antioxidante que la práctica del mechado tiene en el sistema tradicional de la limpieza de barricas. Como vemos en la *tabla 1*, la utilización de una pastilla de 7,5 g mediante combustión, lo que permite consumir el oxígeno del interior de la barrica, facilita el mantenimiento de la fracción de sulfuroso libre al cabo de los 4 meses y medio, lo que ayuda a inhibir el crecimiento de *Brettanomyces* y tener una baja concentración de etilfenoles al final de las pruebas, comparando con el mechado tradicional y con la corrección directa en vino.

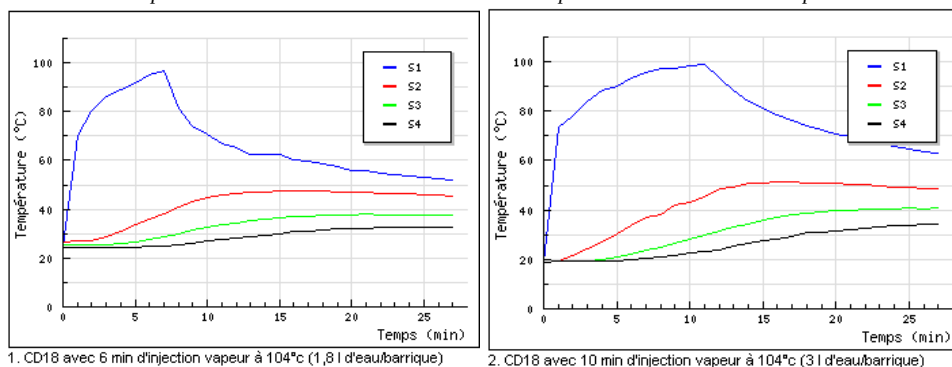
Tabla 1: comparativa en la aplicación de sulfuroso directamente en vino y en barrica mediante mechado de cilindros de 5 y 7,5 gramos.

Condiciones de adición de sulfitos	Parámetro medido	t=0	t= 3 meses	t= 4,5 meses
Pastilla de 7,5 g de azufre por barrica	SO ₂ libre (mg/l) Brettanomyces/ml Etil-fenol (µg/l)	22 6 285	16 0 285	13 1 293
Pastilla de 5 g de azufre por barrica	SO ₂ libre (mg/l) Brettanomyces/ml Etil-fenol (µg/l)	14 6 285	11 0 285	8 0 288
Solución sulfurosa Añadida directamente al vino 2g/Hl	SO ₂ libre (mg/l) Brettanomyces/ml Etil-fenol (µg/l)	13 6 285	10 510 296	6 1200 652

2.3.2-. Desinfección por vías físicas:

La vía térmica más empleada es el uso de generadores de *agua caliente* móviles mediante compresor, que pueden producir agua a 80-90°C entre 80 y 210 bares. La utilización a temperaturas más altas es ilusoria, ya que en tal caso los caudales son muy débiles. Una presión de 100-120 bares es suficientemente respetuosa con la madera. Este dispositivo permite limpiar sin detergentes y desinfectar la superficie; la eficacia desinfectante está limitada en profundidad, ya que el aumento de la temperatura es demasiado lento. El *vapor de agua* a 105°C debido a la baja conductividad térmica de la madera exige tratamientos prolongados para que sean eficaces; la aplicación de vapor debe, por tanto, ser efectuada inmediatamente después de la limpieza con agua caliente para aprovechar el calor absorbido por la madera; después de un lavado de 5 min a 85°C, calentando la madera a 35°C a 5 mm de profundidad, se ha de aplicar el vapor a 105°C durante más de 4 min para desinfectar a 5 mm de profundidad (temperatura > 55°C) y a más de 7,5 min para desinfectar a 15 mm, (ver *figura 2*).

Figura 2: Temperaturas que alcanza la madera en diferentes puntos de profundidad. **S1:** temperatura del aire en la barrica **S2:** temperatura a 5 mm. dentro de la madera. **S3:** temperatura a 15 mm. **S4:** Temperatura a 25 mm.



El tratamiento *electro-magnético por microondas* permite el calentamiento de la madera a través de la excitación del agua contenida en el material; la selección de la longitud de onda permite calentar la madera desde el centro de las duelas con poca energía; la forma y disposición del magnetron y la rotación de la barrica permiten un irradiación homogénea dentro de la Caja metálica de Faraday que refleja las ondas.

En la aplicación de *ultrasonidos* se introduce un sonotrón dentro de la barrica llena de agua a 60°C reciclada; los ultrasonidos (150 kHz) producen en la superficie de la madera y en los primeros milímetros altas presiones al nivel microscópico (>2000 bares) por cavitación del agua, eliminando los compuestos que impregnan la madera y destruyen los micro-organismos al mismo tiempo que provoca su desinfección.

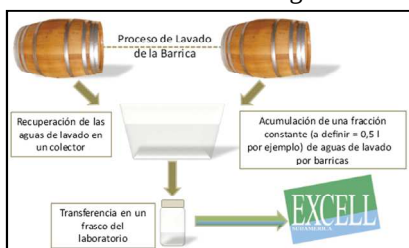
La proyección de *hielo seco* utiliza el contraste térmico entre la madera y el hielo seco (-80°C) con ausencia de uso de agua (tratamiento seco), permitiendo eliminar todos los compuestos precipitados en la superficie de la madera; se necesita sacar uno de los fondos para tener acceso a toda la superficie interna de la barrica y trabajar con mucha ventilación para no acumular el gas

carbónico; es bastante eficiente y rápido, pero también caro y no garantiza la desinfección al nivel de profundidad de las duelas.

El empleo de *oxígeno negativo* lleva algún tiempo estudiándose en Francia. Los iones negativos de oxígeno O_2^- se generan de la siguiente forma: $O_2 + 2e^-$ lo transforman en $2O_2^-$ (iones negativos de dioxígeno O_2^-), que posteriormente continúan según el siguiente esquema: $O_2^- + e^- \rightarrow O_2^{2-}$. Se trata de un fenómeno de ionización de moléculas de oxígeno del aire, tal y como ocurre en la atmósfera durante una tormenta eléctrica. Los iones negativos de oxígeno originados contribuyen a la limpieza natural del aire, ya que el oxígeno negativo posee un efecto fungicida y bactericida (mediante destrucción por oxidación) y un efecto químico (destrucción de olores por efecto eléctrico). Sobre la barrica tiene un efecto superficial interesante, siendo inocuo sobre la calidad de la madera.

4-. Resultados de los ensayos de desinfección de barricas llevados a cabo en bodegas:

En esta sección se van a presentar los resultados de los análisis microbiológicos y de las aguas de lavado de barricas usadas obtenidos antes y después de la aplicación de vapor, ozono, microondas y ultrasonidos sobre barricas o duelas siguiendo la metodología de tomas de muestras patentado por Excell (*Brevet Français N° 0851143*).



Los análisis microbiológicos se han realizado mediante siembra de las aguas de lavado de las barricas usadas sobre medios de cultivo selectivo con su correspondiente incubación y también mediante PCR a tiempo real. Los análisis químicos de contaminantes procedentes del metabolismo microbiano se han realizado mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas sobre las mismas aguas de lavado de barricas usadas obtenidas en el muestreo mencionado.

4.1-. Aplicación de vapor: En este ensayo se ha realizado una comparación de un lavado tipo estándar con agua caliente sobre un lote de 5 barricas homogéneas con vino que presentaba problemas de desviaciones microbianas por actividad bacteriana frente a ese mismo lavado pero incorporando una aplicación de vapor de agua sobre las barricas. Como se puede observar en la *tabla 2*, gracias a la aplicación de vapor se consigue erradicar el problema de contaminación microbiana por parte de bacterias lácticas y acéticas.

Tabla 2: resultados del análisis microbiológico sobre aguas de lavado de 5 barricas homogéneas.

Tipo de lavado de barricas	Bacterias acéticas (UFC/100 mL)	Bacterias lácticas (UFC/100 mL)	Levaduras (UFC/mL)
Barrica lavado estandar sin vapor	15	4	nd
Barrica lavado estandar con vapor	nd	nd	nd

4.2-. Aplicación de ozono: En este ensayo se ha realizado una comparación de un lavado tipo estándar (agua caliente + vapor) sobre un lote de 10 barricas homogéneas con vino que presentaba problemas de desviaciones microbianas por actividad bacteriana y de levaduras tipo *Brettanomyces* frente a ese mismo lavado pero incorporando una aplicación de ozonización a 5 ppm en agua durante 3 minutos sobre las barricas. Como se puede observar en la *tabla 3*, dichos contaminantes desaparecen después de la aplicación del ozono, aunque queda una pequeña población residual de *Brettanomyces*.

Tabla 3: resultados del análisis microbiológico sobre aguas de lavado de 10 barricas homogéneas.

Tipo de lavado de barricas	Bacterias acéticas (UFC/100 mL)	Bacterias lácticas (UFC/100 mL)	<i>Brettanomyces</i> (UFC/100 mL)
Lavado normal	40	nd	14
Lavado normal + aplicación de O_3	nd	nd	3

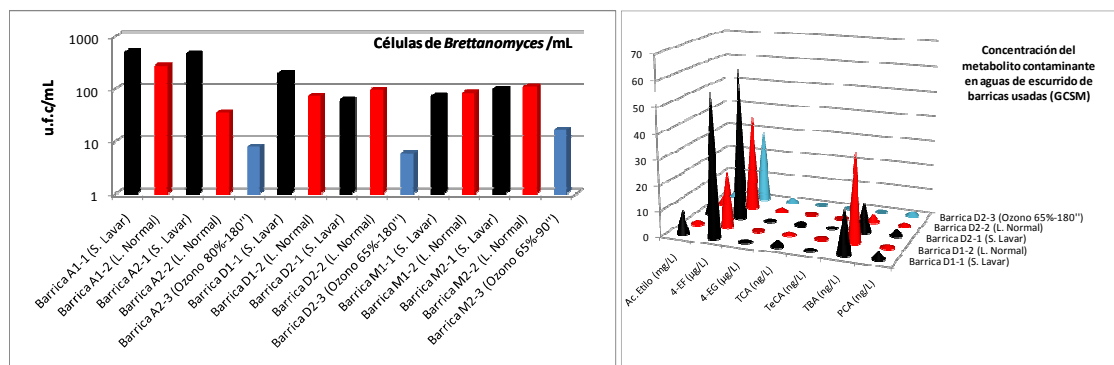
En este caso también se ha realizado análisis químicos de los contaminantes derivados del metabolismo microbiano para ver las posibilidades de limpieza química. Como se puede observar en la *tabla 4* dichos contaminantes no desaparecen, pero disminuyen de forma significativa.

Tabla 4: resultados del análisis microbiológico sobre aguas de lavado de 5 barricas homogéneas.

Tipo de contaminante químico	Lavado normal	Lavado normal + aplicación de O ₃
Acetato de etilo (mg/L)	0,5	0,1
4-EF (µg/L)	33,7	11
4-EG (µg/L)	4,3	0,4
TCA (ng/L)	nd	nd
TeCA (ng/L)	nd	nd
TBA (ng/L)	nd	nd
PCA (ng/L)	nd	nd

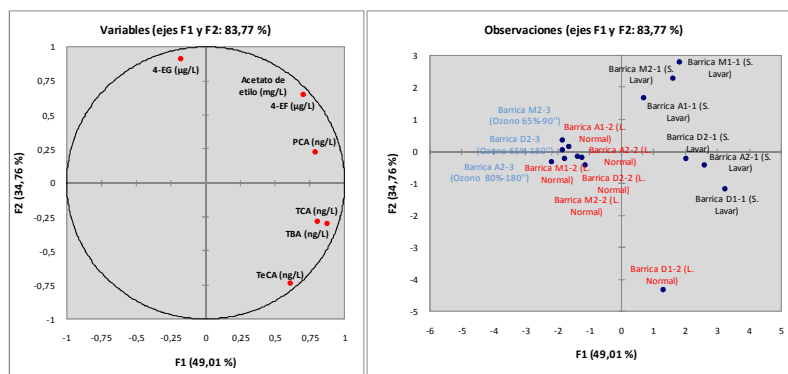
En un segundo ensayo, se aplicó ozono en agua a diferentes concentraciones en 3 lotes diferentes de barricas: Barricas A con ozono al 65% aplicado durante 180 segundos (5 ppm), Barricas D con ozono al 80% aplicado durante 180 segundos (5 ppm) y Barricas M con ozono al 65% aplicado durante 90 segundos (3 ppm). Se comparó el lavado tradicional con la combinación de agua caliente y vapor en el mismo lavado, incluyendo posteriormente el ozono en agua. Se puede observar un efecto más potente sobre la muerte de *Brettanomyces* con esta última combinación (barras en azul). De forma colateral se puede observar en el mismo gráfico la desaparición de anisoles encontrados impregnando la madera, (ver figura 3).

Figura 3: resultados del análisis microbiológico mediante medios de cultivo selectivos de *Brettanomyces* partiendo de aguas de lavado de los 3 lotes de barricas (A, D y M), gráfico izquierda y análisis mediante cromatografía de gases de metabolitos contaminantes, gráfico de la derecha.



Aprovechando los datos de análisis de metabolitos, se realizó un estudio estadístico mediante Análisis de Componentes Principales (ACP) cuya representación se puede observar en la figura 4, donde las barricas sin lavar en negro de todos los lotes se encuentran muy cercanas a todas las variables que representan contaminación por etilfenoles, acetato de etilo y anisoles. Las lavadas mediante la técnica tradicional en rojo ocupan una posición intermedia y las lavadas en combinación con ozono en azul se sitúan en las posiciones más lejanas de los contaminantes en el plano factorial.

Figura 4: resultados del análisis estadística mediante ACP de los análisis de metabolitos en aguas de lavado de todos los lotes de barricas analizadas por CG/SM.



Uno de los temores reincidentes en la aplicación de ozono sobre la madera es la posible incidencia sobre su composición y la actividad residual oxidante que pueda quedar sobre la barrica y que pueda afectar

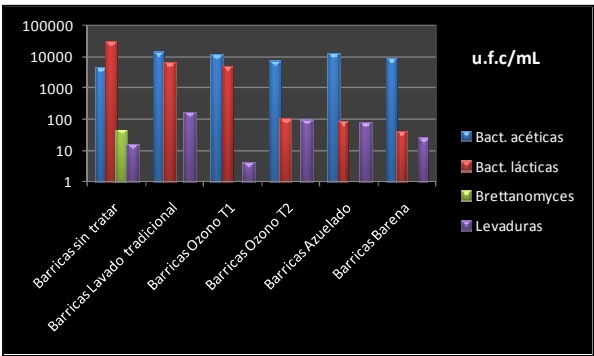
posteriormente al vino. En este segundo ensayo se evaluó el acetaldehído formado en el vino a la semana y a los 6 meses (en cuatro casos, ver *figura 5*). Los resultados muestran que no hubo diferencias significativas, aunque las barricas con mayor tiempo de aplicación de ozono presenta una cantidad un poco mayor de acetaldehído.

Figura 5: resultados del análisis de acetaldehído en los vinos a la semana y a los 6 meses (en 4 casos) de crianza.



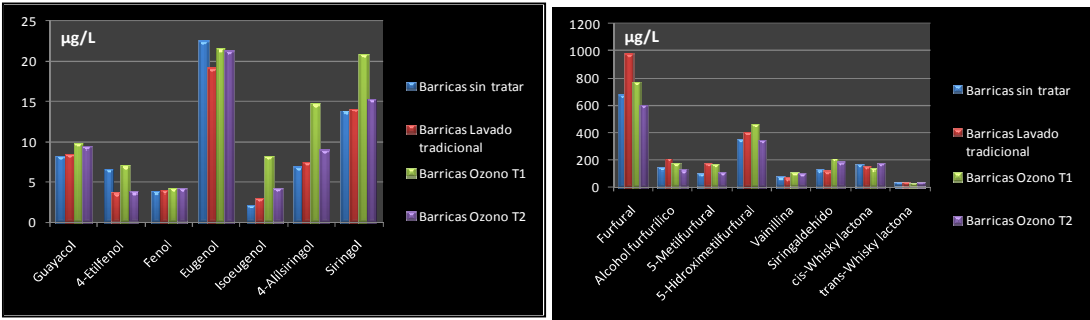
En este mismo ensayo a nivel microbiológico se obtuvo una buena eficacia frente a *Brettanomyces* en todos los casos, incluyendo azuelado y arenado realizados. La eficacia sobre bacterias lácticas fue algo menor y casi insignificante sobre las bacterias acéticas como se observa en la *figura 6*.

Figura 6: resultados del análisis microbiológico en aguas de lavado de bacterias acéticas y lácticas, *Brettanomyces* y levaduras mediante medios de cultivo selectivos.



Para evaluar el efecto del ozono sobre los aromas que la madera puede ceder al vinos se realizaron análisis mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (ver resultados en la *figura 7*). Como se desprende de la observación de los resultados, no se produjeron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, aunque a nivel del siringol, allilsiringol e isoeugenol si aumentaron su concentración en los lotes de barricas con mayor tiempo de exposición al ozono. Análisis realizados después de 6 meses de crianza sobre las barricas.

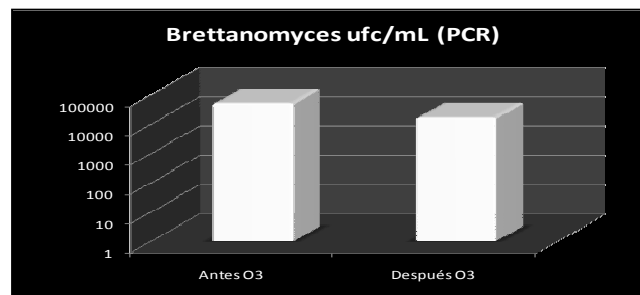
Figura 7: resultados del análisis de volátiles de la madera cedidos al vino después de 6 meses de crianza mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas.



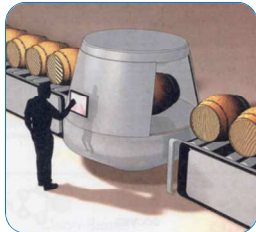
4.3-. Aplicación de ozono en gas: También es posible aplicar ozono en forma de gas, lo que puede aumentar el grado de penetrabilidad sobre la madera a través de sus poros. Para evaluar su efecto se realizó la siguiente prueba con una máquina capaz de alcanzar 30 ppm de O₃ en el interior de la barrica. La aplicación se realizó durante un tiempo de 10 minutos. Los resultados visibles sobre la *figura 8* muestran que no se consiguió el efecto esperado, a pesar de que hubo una bajada significativa de la vialidad de *Brettanomyces*. Seguramente la causa sea no alcanzar una concentración de ozono suficiente en el interior de la barrica.

Para mejorar la aplicación de ozono gaseoso se recomienda entonces alcanzar una riqueza de 100 ppm como mínimo y si es posible, trabajar a una presión positiva de 1 bar o 1,5 bares mediante bombeo en lugar de trabajar solo con exposición.

Figura 8: resultados del análisis microbiológico de *Brettanomyces* en aguas de lavado mediante PCR a tiempo real.

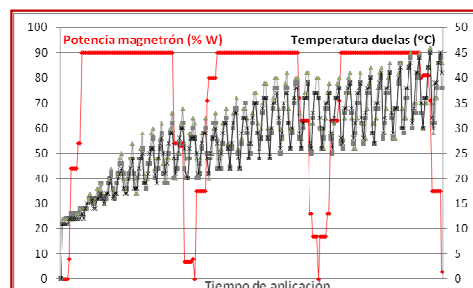


4.4-. Aplicación de microondas: Para ello se han estudiados diferentes trenes de ondas electromagnéticas de alta frecuencia sobre duelas de barricas que han contenido vino contaminado durante 36 y 72 meses y sobre duelas inoculadas de forma artificial por *Brettanomyces* y bacterias lácticas. Posteriormente, las duelas se han sometido a las pulsaciones de alta frecuencia obteniéndose los resultados de la *tabla 5*. En dicha tabla se puede comparar las poblaciones de microorganismos viables antes y después del tratamiento. Algunas duelas no resultaron estar contaminadas, pero en los casos donde si había contaminación, esta desaparece después de cada aplicación, siendo incluso eficaz con los tratamientos de trenes de ondas más suaves y con menores tiempos.



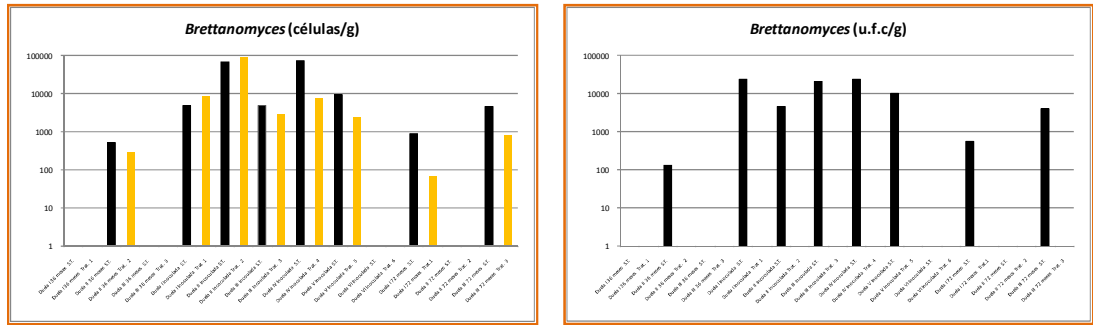
La gran ventaja del método es que permite inactivar microorganismos sin calentar la madera, como se puede observar en la *figura 9*, donde se muestra la aplicación de tres pulsos al 90% de potencia durante 50 segundos cada una. El máximo de temperatura en el exterior de las duelas no supera los 45°C, por lo que se trata de un tratamiento térmico muy inofensivo frente a la composición de la madera.

Figura 9: representación de las ondas electromagnéticas empleadas en los tratamientos más intensos u seguimiento de la temperatura en la parte exterior de las duelas.



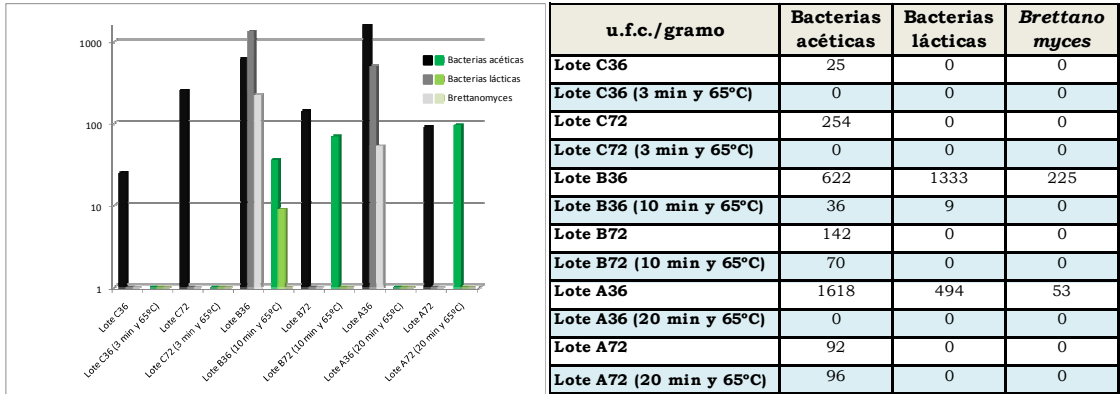
A nivel microbiológico se realizaron análisis por PCR a tiempo real sobre las aguas de lavado y también sobre medios de cultivos específicos. En la *figura 10* a la izquierda observamos los resultados antes (negro) y después (amarillo) de la aplicación de microondas. Observamos un nivel de recuperación de contaminantes muy buena. En la parte derecha observamos los resultados de los medios de cultivo, donde vemos que *Brettanomyces* ya no es activa.

Figura 10: resultados del análisis microbiológico sobre diferentes duelas tratadas con microondas. Izquierda: PCR a tiempo real y derecha: medios de cultivo selectivos.



4.5-. Aplicación de ultrasonidos: Este ensayo se realizó únicamente en duelas contaminadas y no sobre barricas enteras, tal y como se hizo en el ensayo de microondas. Para ello, las duelas de 36 y 72 meses de contacto con vino contaminado por *Brettanomyces* y bacterias lácticas y acéticas se sumergieron en un baño de ultrasonidos con agua a 65°C y se realizó el siguiente ensayo experimental. Cada lote de duelas se sometió a ultrasonidos durante 3, 10 y 20 minutos. Posteriormente se realizaron los análisis correspondientes raspando 5 mm la madera y macerando los trozos en vino sintético para su posterior análisis microbiológico.

Figura 11 y Tabla 5: resultados del análisis microbiológico de 5 barricas homogéneas. Figura 11: en negro y gris antes del tratamiento, en verde después del tratamiento. Tabla 5: filas con fondo blanco antes del tratamiento y filas con fondo oscuro después del tratamiento con microondas.



Según los resultados, el tratamiento resultó muy interesante para inactivar las contaminaciones microbiológicas por parte de *Brettanomyces*, que desaparecieron en todas las duelas. También hubo un efecto muy significativo sobre las bacterias lácticas, que aparecieron en población muy pequeña en una de las duelas tratadas durante 10 minutos. Sin embargo, el efecto no fue tan evidente sobre las bacterias acéticas, mostrando éstas una particular resistencia en la mayoría de las duelas tratadas.

4.6-. Proyección de hielo seco: Otra técnica ya experimentada en Australia y en USA es la aplicación de hielo seco sobre las paredes internas de las barricas. Este ensayo no fue realizado por Excell, *tabla 7*.

Tabla 7: resultados químicos sobre Barricas 2004 de roble francés.

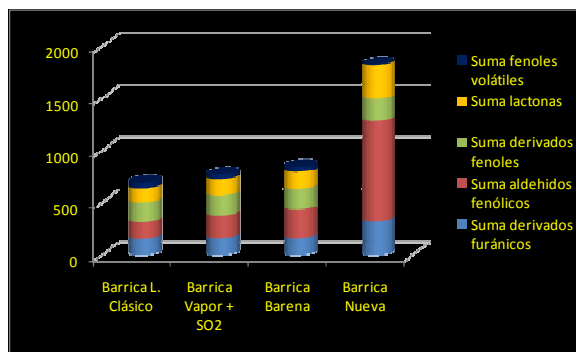
Barricas usadas					
	6/5/07	11/19/07		1/27/08	
	Control	Control	Tratado	Control	Tratado
SO2 Libre	31	38	37	26	28
SO2 Total	47	52	45	52	58
pH	3.43	3.4	3.4	3.41	3.4
AV	0.038	0.044	0.041	0.048	0.052
Brettanomyces	70	310	<10	460	<10
4EP	10	17	13	15	13
4EG	<4	<4	<4	5	4
Taninos	265	125	120	90	95
Fenoles volátiles	1110	1200	1160	1260	1240

4.7-. Arenado de las barricas: Se trata de un tratamiento de barricas más que un proceso de desinfección. El tratamiento se realiza por decapado físico-mecánico mediante proyección de un abrasivo natural: el mineral se proyecta con una presión regulable en función del estado del tonel, siendo el objetivo a lograr la máxima conservación del tostado inicial. El decapado se efectúa sobre un grosor que oscila entre 0,2 y 0,4 milímetros. El mineral y los residuos son evacuados por proyección hidráulica y mediante agua decolorada. Para lograr la asepsia del tonel y descontaminarlo al máximo, se aplica posteriormente vapor seco por encima de 100° durante varios minutos. Después de esta primera fase de asepsia, se lleva a cabo un enjuague para eliminar los coloides y los colorantes (antocianos). Posteriormente se aplica azufre gaseoso.

Como ventajas, se obtiene la recuperación de la oxigenación estimulada por la liberación de los poros de la madera y regenera la superficie de contacto y la asepsia por la acción combinada de tres tratamientos: procedimiento físico eliminando los depósitos orgánicos y minerales: sarros, sulfatos, colorantes, coloides, así como la película de flora microbiana de superficie (mohos, bacterias, y levaduras diversas, como *Brettanomyces bruxellensis*), el vapor seco, que mata los microorganismos al desnaturalizar las proteínas de membrana celular y el gas sulfuroso a presión, que penetra a través de los poros.

Se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la composición volátil de la madera. Como se puede observar en la *figura 12*, existe un aumento de ciertos compuestos volátiles cedidos al vino después de 6 meses de crianza, principalmente representado por el aumento de aldehídos fenólicos en comparación con el lavado clásico y lavado con vapor y aplicación de sulfuroso. En este caso también se quiso evaluar el efecto de la crianza en barrica nueva.

Figura 12: resultados del análisis de la composición volátil de la madera después de 6 meses de crianza en barricas con lavado clásico, lavado con vapor, arenado y barricas nuevas.



5-. Cuadro sinóptico resumido de las distintas tecnologías de desinfección de barricas: En el presente cuadro (*tabla 9*) se presentan de forma resumida las ventajas y desventajas de las diferentes técnicas existente en la actualidad para la limpieza y desinfección de las barricas de vino en bodega, donde se incluye el mechado o la quema de azufre. La principal conclusión que podemos obtener, es que en la actualidad no existe una técnica que por fácil, económica y eficacia pueda suplir en su totalidad al mechado. Sin embargo sí se empieza a dilucidar que con la aplicación de técnicas existentes o en desarrollo, según el estado de las barricas y la naturaleza de los contaminantes químicos y microbiológicos, o la combinación de varias de ellas en una secuencia lógica, se puede hacer frente a una posible aplicación de la antipática y poco razonable directiva europea de prohibición del empleo de sulfuroso en la desinfección de barricas.

Por otra parte, tampoco hay razones para pensar que el mechado de barricas es la técnica que nos ha salvado sistemáticamente de todos los males y contaminantes microbianos en la crianza del vino, pues en la actualidad son problemas a los que las bodegas deben hacer frente, así que nunca estará de más seguir aumentando el conocimiento de alternativas e innovando para poder mejorar el estado del arte en la desinfección de barricas, ya que éstas, más que un continente, son un elemento dinámico de mejora y enriquecimiento de la calidad organoléptica del vino y una de las inversiones más importantes realizados en bodega que hay que proteger.

Tabla 9: resumen de las principales ventajas y desventajas de las técnicas existente y en desarrollo de desinfección de barricas.

Tipos de Tratamiento	INCONVENIENTES	VENTAJAS
Sulfuroso	Acción limitada, formación de sulfitos, tiempo largo de acción, inestable (mecha)	Buena conservación del vino. Activo frente a bacterias acéticas
Agua ozonizada	Acción superficial e intermedia. Reactividad con materia orgánica.	Fácil aplicación. Es un buen desinfectante. Eliminación de anisoles
Vapor	Tiempos largos. Inercia térmica de la madera	Muy inocuo (tiempo). Buen agente desinfectante. Económico
Oxígeno negativo	Tiempos largos de aplicación. Efecto superficial	Muy económico, aplicación ambiental, inocuo en madera
Ultrasonidos	Gasto de agua y energía, tiempo de aplicación, inversión	Elimina tartratos fácilmente. Activo a nivel de superficie e intermedio. Muy inocuo con la madera
Microondas (p-electromagnéticos)	Desinfecta pero no limpia. No disponible a nivel industrial	Buena acción biocida. Ataca desde dentro a fuera. Inocuo con la madera

Conclusiones finales:

- El mantenimiento de barricas para el vino es una tarea indispensable para desarrollar y mejorar la calidad de los vinos a corto, medio y largo plazo.
- Una conservación efectuada en recipientes limpios y desinfectados permite al vino desarrollarse de manera armoniosa a lo largo de su proceso de envejecimiento en botella sin necesidad de tratamientos previos.
- En caso contrario, será necesario y con frecuencia estabilizar de manera enérgica el vino en el momento del embotellado para evitar la alteración de su calidad.
- Es indispensable respetar reglas simples y elementales para conseguir una limpieza y una desinfección eficaces. Por otro lado, incluso si se ha realizado un trabajo perfecto, la desinfección es siempre temporal.
- No es posible esterilizar la madera y su estructura particular hace difícil una desinfección perfecta.
- Cuando se ha realizado de manera química, la desinfección no es sino superficial, ya que es imposible hacer penetrar los agentes desinfectantes profundamente en la madera sin riesgo de dejar residuos nefastos o de alterar la calidad de las interacciones madera-vino.
- Únicamente los procedimientos térmicos permiten eliminar la contaminación profunda, pero es necesario el empleo de tecnología y procesos de trabajo lentos si verdaderamente queremos hablar de desinfección.
- Las técnicas de renovación de las barricas que consisten en la eliminación, mediante procedimientos físicos de la capa superficial de las duelas en contacto con el vino, producen una limpieza más profunda pero no desinfectan.
- Los intercambios madera-vino son, sin duda, mejorados, pero no recuperan los niveles de las barricas nuevas.
- Las técnicas empleadas en el estudio han mostrado una buena eficacia frente a la eliminación de contaminantes microbianos.

Bibliografía:

- Fernando Gabriel Colil Avila. (2005). Tesis Doctoral: Efectos del uso de ozono en barricas de roble para el control de *Brettanomyces Spp.*. Facultad de Ciencias Agronómicas Escuela de Agronomía Departamento de Agroindustria y Enología, Santiago de Chile.
- Chatonnet P. ; Boidron J.N.; Dubourdieu D. (1993). Influence des conditions d'élevage et de sulfitage des vins rouges en barriques sur leur teneur en acide acétique et en éthyl-phénols. *J. Int. Sci. Vigne et vin*. 27, 4, pag. 277-298.

- Chatonnet P.; Boidron J.N.; Dubourdieu D. (1994). Nature et évolution de la microflore du bois de chêne au cours de son séchage et de son vieillissement à l'air libre. *J. Int. Sci. Vigne et du Vin*, 28, 3, pag. 185–201.
- Chatonnet P. 1995. Le séchage et la maturation des bois en tonnellerie. *Rev. Fr. OEnol.*, N° 151, pag. 33–38.
- Chatonnet, P; Fleury1, A.; Boutou, S. y Palacios, P.; (2010). Puesta en evidencia de una nueva fuente de contaminación de 2,4,6-tricloroanisol (TCA) en el vino a partir de la madera de roble *Quercus sp.* y su efecto durante la crianza en barricas. *Enoviticultura* N° 6, pag. 2-11.
- Giordano G. (1971). Caratteristiche fisiche et meccaniche del legno. In “Tecnologica del Legno”. Vol. 1, 966–977, Utet Ed.
- Swann J.S; Reid K.J.G; Howie D.; Howelet S.P. (1993). A study of the effect of air and kiln drying of cooperage oakwood. In “Elaboration et connaissance des spiritueux” Cantagrel R. (ed.), Lavoisier Tec. Doc (Pub.), Paris, pag. 557–561.