



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
SAN ANTONIO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, DE LA  
ACTIVIDAD FÍSICA Y DEL DEPORTE

Departamento de Tecnología de la  
Alimentación y Nutrición

**Disipación y efectos de nuevos fungicidas sobre la  
fermentación y calidad de vinos tintos de  
*Monastrell*.**

Francisco Girón Rodríguez

**Directores:**

Dr. José Oliva Ortiz

Dra. Adela Martínez-Cachá Martínez

Dr. José María Cayuela García

Murcia, Mayo de 2012





**UCAM**  
UNIVERSIDAD CATÓLICA  
SAN ANTONIO

**AUTORIZACIÓN DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS PARA SU  
PRESENTACIÓN**

El Dr. D. José Oliva Ortiz, la Dra. D<sup>a</sup> Adela Martínez-Cachá Martínez y el Dr. D. José María Cayuela García como Directores de la Tesis Doctoral titulada “Disipación y efectos de nuevos fungicidas sobre la fermentación y calidad de vinos tintos de *Monastrell*” realizada por D. Francisco Girón Rodríguez en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite** dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 7 de Mayo de 2012.

Dr. D. José Oliva Ortiz

Dr. D. José María Cayuela García

Dra. D<sup>a</sup> Adela Martínez-Cachá Martínez

Tercer Ciclo. Vicerrectorado de Investigación  
Campus de Los Jerónimos. 30107 Guadalupe (Murcia)  
Tel. (+34) 968 27 88 22 • Fax (+34) 968 27 85 78 - C. e.: [tercerciclo@pdi.ucam.edu](mailto:tercerciclo@pdi.ucam.edu)



*A la fuerza que me mueve,  
razón que me guía,  
orgullo que me impide abandonar.*



## *Agradecimientos*

Termina esta Tesis y, para mi sorpresa y regocijo de Hacienda, sigo vivo (y cuerdo...creo); así que, con una prosa esmerada semejante a la de un mono catatónico con un lápiz, me dispongo a plasmar mis agradecimientos.

A mis directores de Tesis los Drs., D. José Oliva Ortiz, D. José María Cayuela García y D<sup>a</sup> Adela Martínez-Cachá Martínez por abrirme las puertas de la investigación y darme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo.

Al Departamento de Química Agrícola de la Universidad de Murcia por la ayuda prestada en los estudios sobre la disipación de los fungicidas y su influencia en la calidad organoléptica de los vinos.

A Francisco Pardo Mínguez y a la Bodega San Isidro de Jumilla por la cesión de las parcelas y las viñas, así como por su ayuda con las microvinificaciones.

A Syngenta Agro y, en particular, a Nicolás López del Hierro y Fernando Soto por su ayuda en los tratamientos fitosanitarios y la selección de las parcelas.

A Paula Payá, investigadora del Departamento de Química Agrícola de la Universidad de Murcia.

A la Cátedra de Química Agrícola de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica de la Universidad de Castilla La Mancha.

Al Ministerio de Ciencia e Innovación por financiar el proyecto “Efecto de nuevos fungicidas sobre la flora levaduriforme y la calidad organoléptica de vinos tintos de *Monastrell*. Estudio de su desaparición en el proceso de vinificación”, del que deriva esta Tesis.

A mis compañeros del Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición de la Universidad Católica San Antonio de Murcia.

A Alfonso, Fernando, Adela, Carmen, Gabi y “mi Juanamari” por su amistad sincera, por su ayuda incondicional, por las risas...en fin, por hacer que merezca la pena.

Llega ahora el momento, mediante un texto lacrimógeno de esos que dan vergüenza propia y ajena, de hacerle un hueco a mi familia en estos agradecimientos.

Después de enfrentarme a los resultados, lidiando entre disipaciones y perfiles sensoriales e intentando poner orden en ese caos que es la taxonomía de las levaduras, resulta que lo más difícil es plasmar en palabras aquello que tengo más claro.

No encuentro adjetivos capaces de agradecer con la magnitud apropiada el apoyo constante de los míos durante el desarrollo de este trabajo, pues sé que forma parte de esa realidad que me acompaña desde siempre, arropado por un padre en cuya sólida integridad descansan los cimientos de la persona que soy, una madre de la que he aprendido a perseverar sin paliativos, viéndola construir realidades a partir de imposibles aunque se esconda tras su sonrisa humilde, y un hermano pequeño con el que no necesito cruzar ni una sola frase para saber que siempre estará ahí.

“Quienes no suelen realizar experimentos difícilmente pueden percatarse de la diversidad de circunstancias requeridas para que progresen hasta resultados perfectamente demostrativos; o de la frecuencia con la cual el hombre que persigue una meta en su profesión puede sufrir interrupciones que frustran su esfuerzo casi en el momento de alcanzar frutos: y sin embargo, no vacilo ni un momento...”

Edward Jenner, 1789.



## ÍNDICE GENERAL



## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS .....	21
ÍNDICE DE FIGURAS.....	25
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>31</b>
1.1. HISTORIA DE LA VID Y EL VINO .....	31
1.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA VITIVINICULTURA.....	38
<b>1.2.1. Panorama vitivinícola español.....</b>	<b>44</b>
1.3. VARIEDAD <i>MONASTRELL</i> .....	45
1.4. VINIFICACIÓN TRADICIONAL EN TINTO .....	47
1.5. LEVADURAS .....	50
<b>1.5.1. Taxonomía y clasificación de las levaduras.....</b>	<b>53</b>
1.5.1.1. <i>Phylum: Ascomycota</i> .....	56
1.5.1.2. <i>Phylum Basidiomycota</i> .....	61
1.6. FERMENTACIÓN .....	67
<b>1.6.1. Bioquímica de la fermentación .....</b>	<b>71</b>
1.6.1.1. <i>Fermentación alcohólica</i> .....	71
1.6.1.2. <i>Productos secundarios procedentes del ácido pirúvico</i> .....	73
1.6.1.2.1. Ácidos orgánicos.....	73
1.6.1.2.2. Metabolitos del ciclo diacetilo-acetoínico .....	74
1.6.1.3. <i>Compuestos volátiles responsables del aroma</i> .....	75
1.6.1.3.1. Alcoholes superiores.....	78
1.6.1.3.2. Ácidos grasos y ésteres .....	79
1.6.1.3.3. Compuestos azufrados .....	80
<b>1.6.2. Factores que afectan al proceso fermentativo .....</b>	<b>82</b>
1.6.2.1. <i>Antagonismo microbiano</i> .....	82
1.6.2.2. <i>“Limitaciones” tecnológicas</i> .....	84
1.6.2.3. <i>Estimulación de la fermentación alcohólica</i> .....	85

1.6.2.4. <i>Inhibición de las levaduras</i> .....	88
1.6.2.5. <i>Inhibición de las levaduras por plaguicidas</i> .....	89
1.7. <b>PLAGUICIDAS Y VITIVINICULTURA</b> .....	89
<b>1.7.1. Plagas y enfermedades de la vid</b> .....	89
<b>1.7.2. Origen y evolución de los plaguicidas</b> .....	94
<b>1.7.3. Persistencia y disipación en los cultivos</b> .....	96
<b>1.7.4. Persistencia y degradación de los plaguicidas en la cadena agroalimentaria</b> .....	103
<b>1.7.5. Efectos derivados del uso de plaguicidas en viticultura</b> .....	105
1.7.5.1. <i>Contaminación ambiental</i> .....	106
1.7.5.2. <i>Residuos en uva, mosto y vino</i> .....	107
1.7.5.3. <i>Influencia en la fermentación y características organolépticas del vino</i> .....	115
1.7.5.4. <i>Efecto toxicológico sobre el consumidor</i> .....	127
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>131</b>
2.1. OBJETIVOS GENERALES .....	131
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	131
<b>3. MATERIAL GENERAL UTILIZADO Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>135</b>
3.1. FUNGICIDAS ESTUDIADOS .....	135
3.2. UVA TINTA DE VINIFICACIÓN ( <i>Vitis vinifera</i> var. <i>Monastrell</i> ).....	143
3.3. LEVADURAS TESTIGO PARA ENSAYOS <i>in vitro</i> .....	147
3.4. LEVADURAS SECAS ACTIVAS UTILIZADAS EN VINIFICACIÓN .....	149
3.5. TRATAMIENTOS EN CAMPO.....	150
3.6. MICROVINIFICACIONES .....	152
3.7. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO.....	153

<b>4. ESTUDIO 1.- DISIPACIÓN DE LOS FUNGICIDAS.....</b>	<b>159</b>
4.1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO .....	159
4.2. ESTÁNDARES Y PRODUCTOS QUÍMICOS .....	161
4.3. INSTRUMENTACIÓN .....	161
4.3.1. Determinación de fluquinconazol por CG-ECD .....	161
4.3.2. Determinación de famoxadona por HPLC-DAD.....	162
4.3.3. Determinación de kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin por CG-MS/MS .....	162
4.3.4. Determinación de fenhexamida por CL-MS/MS.....	163
4.4. EXTRACCIÓN.....	164
4.4.1. Extracción de fluquinconazol y famoxadona .....	164
4.4.2. Extracción de fenhexamida, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin por método QuEChERS .....	165
4.5. VALIDACIÓN ANALÍTICA.....	166
4.5.1. Identificación, confirmación y cuantificación .....	166
4.5.2. Linealidad de respuesta del detector .....	168
4.5.3. Límites de detección y de cuantificación .....	168
4.5.4. Precisión y exactitud .....	168
4.6. RESULTADOS .....	170
4.6.1. Resultados de validación .....	170
4.6.2. Dinámica de desaparición durante la vinificación .....	173
4.6.3. Eliminación del fungicida en función del proceso enotécnico.....	180
<b>5. ESTUDIO 2.- EFECTO SOBRE LAS LEVADURAS .....</b>	<b>191</b>
5.1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO .....	191
5.2. ESTÁNDARES Y PRODUCTOS QUÍMICOS .....	194
5.3. ENSAYOS .....	195
5.3.1. Evaluación del efecto de los fungicidas en medio líquido.....	195
5.3.2. Evaluación del efecto de los fungicidas en medio sólido .....	195

5.3.3. Recuento de levaduras en uva.....	196
5.3.4. Recuento de levaduras en mosto .....	196
5.3.5. Tipificación de la flora levaduriforme .....	197
5.4. RESULTADOS .....	198
5.4.1. Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de los fungicidas.....	198
5.4.1.1. Evaluación <i>in vitro</i> en medio líquido.....	198
5.4.1.2. Evaluación <i>in vitro</i> en medio sólido.....	203
5.4.2. Recuento de levaduras en la superficie de la baya.....	205
5.4.3. Recuento de levaduras en el mosto.....	205
5.4.4. Tipificación de la flora levaduriforme .....	208
5.4.4.1. Tipificación de levaduras no <i>Saccharomyces</i> en ensayo con fermentación espontánea bajo BPA y CPA .....	209
5.4.4.2. Tipificación de levaduras <i>Saccharomyces</i> en ensayo con fermentación espontánea bajo BPA y CPA .....	211
5.4.4.3. Tipificación de levaduras no <i>Saccharomyces</i> en ensayo con adición de LSA .....	212
5.4.4.4. Tipificación de levaduras <i>Saccharomyces</i> en ensayo con adición de LSA .....	212
5.4.4.5. Discusión de los resultados de tipificación de levaduras .....	216
5.4.4.5.1. Discusión de los resultados de tipificación de la flora levaduriforme no <i>Saccharomyces</i> .....	216
5.4.4.5.2. Discusión de los resultados de tipificación de la flora levaduriforme <i>Saccharomyces</i> .....	226
5.4.5. Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación.....	231
5.4.5.1. Evolución de la flora durante la vinificación bajo BPA y CPA.....	232
5.4.5.2. Evolución de la flora durante la vinificación control sin adición de LSA en el segundo año de ensayos.....	239
5.4.5.3. Evolución de la flora durante la vinificación con adición de LSA en muestras control y tratadas bajo CPA.....	241

5.4.5.4. <i>Discusión de los resultados de la evolución de la flora durante la vinificación</i> .....	246
<b>6. ESTUDIO 3. INFLUENCIA SOBRE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA.....</b>	<b>261</b>
6.1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO .....	261
6.2. ESTÁNDARES Y PRODUCTOS QUÍMICOS .....	263
6.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA .....	264
<b>6.3.1. Determinación de compuestos fenólicos .....</b>	<b>264</b>
6.3.1.1. <i>Intensidad del color</i> .....	264
6.3.1.2. <i>Índice de polifenoles totales (IPT)</i> .....	265
6.3.1.3. <i>Antocianos totales</i> .....	265
6.3.1.4. <i>Taninos</i> .....	266
6.3.1.5. <i>Catequinas</i> .....	267
6.3.1.6. <i>Compuestos fenólicos de bajo peso molecular</i> .....	267
<b>6.3.2. Determinación de compuestos aromáticos mediante SBSE-GC-MS....</b>	<b>268</b>
6.3.2.1. <i>Preparación y Extracción</i> .....	268
6.3.2.2. <i>Análisis</i> .....	268
6.3.2.3. <i>Validación Analítica</i> .....	269
<b>6.3.3. Determinación de ácidos orgánicos .....</b>	<b>272</b>
6.3.3.1. <i>Preparación y Extracción</i> .....	272
6.3.3.2. <i>Análisis</i> .....	272
<b>6.3.4. Análisis estadístico.....</b>	<b>272</b>
6.4. RESULTADOS .....	273
<b>6.4.1. Influencia de los fungicidas sobre el contenido en compuestos fenólicos .....</b>	<b>273</b>
<b>6.4.2. Influencia de los fungicidas sobre los compuestos aromáticos.....</b>	<b>282</b>
<b>6.4.3. Influencia de los fungicidas en el contenido de ácidos orgánicos.....</b>	<b>296</b>

---

<b>7. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....</b>	<b>303</b>
7.1. ESTUDIO 1.- DISIPACIÓN DE LOS FUNGICIDAS .....	303
7.2. ESTUDIO 2.- EFECTO SOBRE LAS LEVADURAS .....	304
7.3. ESTUDIO 3.- INFLUENCIA SOBRE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA .....	306
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>311</b>

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.-</b> Morfología celular de las levaduras.....	51
<b>Tabla 1.2.-</b> Clasificación de los hongos ascomicéticos .....	60
<b>Tabla 1.2.-</b> Clasificación de los hongos ascomicéticos (cont.).....	61
<b>Tabla 1.3.-</b> Clasificación de los hongos basidomicéticos .....	65
<b>Tabla 1.3.-</b> Clasificación de los hongos basidomicéticos (cont.).....	66
<b>Tabla 1.4.-</b> Volátiles generados en la etapa fermentativa y su aroma .....	78
<b>Tabla 1.5.-</b> Levaduras “Killer” .....	83
<b>Tabla 1.6.-</b> Disminución de residuos en uva Tempranillo .....	112
<b>Tabla 1.7.-</b> Parámetros generales medidos en el vino.....	117
<b>Tabla 1.8.-</b> Diferencias en la composición aromática entre vinos tratados con fungicidas y vino control.....	119
<b>Tabla 1.9.-</b> Índices y compuestos colorantes en vino testigo y vinos tratados....	123
<b>Tabla 1.10.-</b> Compuestos fenólicos de bajo peso molecular (mg/L) en vinos (media ± DS) .....	125
<b>Tabla 1.11.-</b> Antocianinas (mg/l) en vinos (media ± DS) .....	126
<b>Tabla 3.1.-</b> Características de las subparcelas experimentales .....	150
<b>Tabla 3.2.-</b> Formulados de los fungicidas utilizados y dosis de aplicación .....	151
<b>Tabla 4.1.-</b> Transiciones de masas obtenidas de cada compuesto .....	163
<b>Tabla 4.2.-</b> Límites de cuantificación establecidos para cada fungicida .....	170
<b>Tabla 4.3.-</b> Resultados de la validación analítica.....	172
<b>Tabla 4.4.-</b> Media de los resultados de los controles de calidad analizados .....	172
<b>Tabla 4.5.-</b> Residuos de fungicidas (ppm) encontrados en los subproductos sólidos en condiciones de BPA y CPA .....	180
<b>Tabla 4.6.-</b> Residuos de fungicidas (ppm) encontrados en los productos líquidos .....	181
<b>Tabla 5.1.-</b> Composición Disolución 1 para PCR.....	197
<b>Tabla 5.2.-</b> Composición Disolución 2 para PCR.....	197

<b>Tabla 5.3.-</b> Concentración mínima (ppm) a la que los distintos principios activos ejercen un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la cinética de crecimiento (descenso en fase lag y velocidad máxima de crecimiento).....	199
<b>Tabla 5.4.-</b> Concentración mínima (ppm) a la que los distintos principios activos inhiben el crecimiento de las levaduras en medio sólido.....	203
<b>Tabla 5.5.-</b> Resultados del recuento de levaduras en uva.....	205
<b>Tabla 5.6.-</b> Resultados de los recuentos de levaduras en mosto y vino en los ensayos con fermentación espontánea (log UFC/mL) .....	207
<b>Tabla 5.7.-</b> Tipificación de levaduras no <i>Saccharomyces</i> en ensayo con fermentación espontánea bajo BPA y CPA.....	210
<b>Tabla 5.8.-</b> Tipificación de levaduras <i>Saccharomyces</i> en ensayo con fermentación espontánea bajo BPA y CPA.....	213
<b>Tabla 5.9.-</b> Tipificación de levaduras no <i>Saccharomyces</i> en ensayo con adición de LSA.....	214
<b>Tabla 5.10.-</b> Tipificación de levaduras <i>Saccharomyces</i> en ensayo con adición de LSA.....	215
<b>Tabla 5.11.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea en la parcela control (no tratada).....	235
<b>Tabla 5.12.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de famoxadona.....	236
<b>Tabla 5.13.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de fenhexamida.....	236
<b>Tabla 5.14.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de fluquinconazol.....	237
<b>Tabla 5.15.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de kresoxim-metil.....	237

---

<b>Tabla 5.16.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de quinoxifen.....	238
<b>Tabla 5.17.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de trifloxistrobin .....	238
<b>Tabla 5.18.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación control sin adición de LSA .....	240
<b>Tabla 5.19.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación control con adición de LSA .....	242
<b>Tabla 5.20.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de famoxadona .....	243
<b>Tabla 5.21.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de fenhexamida .....	243
<b>Tabla 5.22.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de fluquinconazol .....	244
<b>Tabla 5.23.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de kresoxim-metil .....	244
<b>Tabla 5.24.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de quinoxifen.....	245
<b>Tabla 5.25.-</b> Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de trifloxistrobin.....	245
<b>Tabla 5.26.-</b> Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no <i>Saccharomyces</i> .....	249
<b>Tabla 5.26(b).-</b> Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no <i>Saccharomyces</i> .....	250
<b>Tabla 5.26(c).-</b> Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no <i>Saccharomyces</i> .....	251
<b>Tabla 5.26(d).-</b> Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no <i>Saccharomyces</i> .....	252

<b>Tabla 5.26(e).</b> - Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no <i>Saccharomyces</i> .....	253
<b>Tabla 5.26(f).</b> - Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no <i>Saccharomyces</i> .....	254
<b>Tabla 5.27.</b> - Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas <i>Saccharomyces</i> .....	256
<b>Tabla 6.1.</b> - Datos de los estándares y linealidad de su cuantificación .....	270
<b>Tabla 6.2.</b> - Datos de los estándares y linealidad de su cuantificación .....	271
<b>Tabla 6.3.</b> - Concentración media (n=3) en compuestos fenólicos de los vinos procedentes de uvas tratadas bajo BPA.....	274
<b>Tabla 6.4.</b> - Concentración media (n=3) en compuestos fenólicos de los vinos procedentes de uvas tratadas bajo CPA.....	274
<b>Tabla 6.5.</b> - Contenido (n=3) en compuestos fenólicos ( $X \pm DS$ mg/L) en vinos.....	281
<b>Tabla 6.6.</b> - Concentración media (n=4) de los volátiles del vino (mg/L) en ensayos bajo BPA .....	283
<b>Tabla 6.7.</b> - Concentración media (n=4) de los volátiles del vino (mg/L) en ensayos bajo CPA.....	283
<b>Tabla 6.8.</b> - ANOVA de los volátiles en los vinos tratados bajo BPA respecto al control.....	284
<b>Tabla 6.9.</b> - ANOVA de los volátiles en los vinos tratados bajo CPA respecto al control.....	284
<b>Tabla 6.10.</b> - ANOVA de los volátiles entre ambos tratamientos (BPA y CPA) ..	285
<b>Tabla 6.11.</b> - Contenido en ácidos orgánicos ( $X \pm DS$ g/L) para los vinos obtenidos en los ensayos con BPA.....	298
<b>Tabla 6.12.</b> - Contenido en ácidos orgánicos ( $X \pm DS$ g/L) para los vinos obtenidos en los ensayos con CPA.....	298
<b>Tabla 6.13.</b> - Diferencias significativas entre tratamientos con los fungicidas estudiados bajo BPA y CPA.....	299

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.-</b> Distribución mundial de la superficie cultivada .....	40
<b>Figura 1.2.-</b> Producción mundial de vino .....	41
<b>Figura 1.3.-</b> Consumo mundial de vino .....	42
<b>Figura 1.4.-</b> Exportaciones mundiales de vino.....	43
<b>Figura 1.5.-</b> Importaciones globales de vino .....	44
<b>Figura 1.6.-</b> Clasificación de los seres vivos .....	55
<b>Figura 1.7.-</b> Esquema global del proceso de fermentación alcohólica .....	74
<b>Figura 1.8.-</b> Influencia de los procesos enotécnicos en la desaparición de residuos de fungicidas.....	110
<b>Figura 3.1.-</b> Fotografía de la variedad de uva ( <i>Monastrell</i> ) utilizada en este estudio .....	145
<b>Figura 3.2.-</b> Diagrama de flujo de vinificación toma de muestras .....	153
<b>Figura 3.3.-</b> Esquema de realización del trabajo .....	155
<b>Figura 4.1.-</b> Planteamiento del estudio de disipación de los fungicidas .....	160
<b>Figura 4.2.-</b> Diagrama del método QuEChERS empleado .....	166
<b>Figura 4.3.-</b> Residuos (mg) encontrados en la vinificación bajo BPA .....	173
<b>Figura 4.4.-</b> Residuos (mg) encontrados en la vinificación bajo CPA.....	175
<b>Figura 4.5.-</b> Evolución de los residuos de famoxadona durante la vinificación .....	176
<b>Figura 4.6.-</b> Evolución de los residuos de fenhexamida durante la vinificación .....	177
<b>Figura 4.7.-</b> Evolución de los residuos de fluquinconazol durante la vinificación .....	177
<b>Figura 4.8.-</b> Evolución de los residuos de kresoxim-metil durante la vinificación .....	178
<b>Figura 4.9.-</b> Evolución de los residuos de quinoxifen durante la vinificación ....	179
<b>Figura 4.10.-</b> Evolución de los residuos de trifloxistrobin durante la vinificación .....	179

<b>Figura 4.11.-</b> Disipación de los residuos en maceración y prensado aplicando BPA .....	182
<b>Figura 4.12.-</b> Disipación de los residuos en maceración y prensado aplicando CPA .....	183
<b>Figura 4.13.-</b> Efecto del prensado sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando BPA .....	183
<b>Figura 4.14.-</b> Efecto del prensado sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando CPA .....	184
<b>Figura 4.15.-</b> Efecto del trasiego sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando BPA .....	185
<b>Figura 4.16.-</b> Efecto del trasiego sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando CPA .....	186
<b>Figura 4.17.-</b> Efecto de la clarificación y el filtrado sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando BPA .....	187
<b>Figura 4.18.-</b> Efecto de la clarificación y el filtrado sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando CPA .....	188
<b>Figura 5.1.-</b> Planteamiento del estudio de la influencia de los fungicidas sobre las levaduras .....	193
<b>Figura 5.2.-</b> Fórmula empleada para el cálculo de la superficie de las bayas.....	196
<b>Figura 5.3.-</b> Halos de inhibición sobre crecimiento de <i>Hanseniaspora uvarum</i> .....	204
<b>Figura 5.4.-</b> Evolución de los recuentos de levaduras en mosto bajo condiciones BPA .....	206
<b>Figura 5.5.-</b> Evolución de los recuentos de levaduras en mosto bajo condiciones CPA .....	206
<b>Figura 6.1.-</b> Planteamiento del estudio de la influencia de los fungicidas sobre la calidad organoléptica de los vinos.....	262
<b>Figura 6.2.-</b> Contenido en derivados del ácido hidroxicinámico ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) encontrado en los vinos ensayados .....	276
<b>Figura 6.3.-</b> Contenido en trans-resveratrol ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) encontrado en los vinos ensayados .....	277

---

<b>Figura 6.4.-</b> Contenido en flavonoles ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) encontrado en los vinos ensayados .....	278
<b>Figura 6.5.-</b> Valores de UO de 1-hexanol, 2-feniletanol, 3-metil-1-butanol, terpenoides y ácidos en los vinos tratados bajo BPA.....	292
<b>Figura 6.6.-</b> Valores de UO de 1-hexanol, 2-feniletanol, 3-metil-1-butanol, terpenoides y ácidos en los vinos tratados bajo CPA .....	292
<b>Figura 6.7.-</b> Valores medios de UO para acetato de etilo, ésteres de etilo y acetatos en los vinos tratados bajo BPA.....	293
<b>Figura 6.8.-</b> Valores medios de UO para acetato de etilo, ésteres de etilo y acetatos en los vinos tratados bajo CPA.....	293
<b>Figura 6.9.-</b> Diagrama de los perfiles aromáticos de los vinos estudiados (BPA y CPA) frente al del vino control.....	295



## **INTRODUCCIÓN**



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. HISTORIA DE LA VID Y EL VINO

El vino acompaña los manjares y proporciona a quien lo bebe un estado de tranquilidad y bienestar que, ya desde la antigüedad se reconoce, admira y mitifica.

Esta bebida ha acompañado al hombre desde bien temprano en su andadura terrena. Tanto es así, que el vino es una de las primeras creaciones de la humanidad, y representa toda una serie de descubrimientos alrededor de las primeras reacciones químicas efectuadas por el hombre (fermentación y oxidación). Para el hombre primitivo, el resultado de la fermentación de la uva supuso la transformación de una fruta estacionaria y perecedera en una bebida relativamente estable, con características nuevas y propiedades embriagadoras potencialmente tóxicas.

Aunque el origen de la viticultura se pierde en la noche de los tiempos, los fósiles de pepitas y polen encontrados por los arqueólogos son lo suficientemente inimitables como para confirmar la presencia de la vid en otras épocas.

Estos hallazgos demuestran que la vid es, junto con el trigo, uno de los cultivos más antiguos, pudiendo afirmarse que el género *Vitis* (que comprende todas las “vides domésticas”) estaba extendido al final de la Era Terciaria en todo el Hemisferio Norte.

Durante toda esta era, hasta hace unos doce millones de años, en el periodo del Plioceno, se han identificado cuarenta variedades diferentes de este género. Entre éstas se citan *Vitis ausoniae* (así llamada en memoria del poeta galorromano Ausonio, gran amante del vino) y *Vitis vinifera selvatica* o *lambrusca* que todavía puede encontrarse en los bosques semitropicales de Estados Unidos (Carolina y Mississippi) (Simó, 1987).

En el Terciario Medio, tras el descenso de las temperaturas, la vid sobrevive en refugios preservados del frío, al pie de las montañas, donde evoluciona independientemente, para después recolonizar los territorios tras la retirada de

los hielos. Este proceso de aislamiento individual provoca que el género *Vitis* posea una gran variabilidad de tipos. En la actualidad, subsisten algunos del género *Vitis* silvestres, descendientes directos de los que existían en la Era Terciaria y diferentes de las *Vitis viníferas* actuales (Martínez de Toda, 1991).

Durante la Era Cuaternaria y al finalizar este periodo, todas las especies acababan creciendo dentro de la franja latitudinal comprendida entre los 50° y 30° del Hemisferio Norte, y los 30° y 40° del Hemisferio Sur (Amerine y Wagner, 1984; Delgado, 1998).

La vid fue una de las primeras plantas cultivadas por el hombre primitivo.

Este hecho, junto con otros factores, contribuiría a la evolución de las primeras comunidades humanas del nomadismo al sedentarismo. Esta viticultura primitiva comenzaría, según Unwin (2001), en torno a 5.000 años antes de nuestra era para la vid dedicada a la elaboración de vino, y entre los años 10.000 y 8.000 a.C. para la vid destinada al consumo en fresco.

A pesar de la gran cantidad de pruebas recopiladas a lo largo de la historia (referentes al cultivo de la vid, a la elaboración del vino y a su posterior comercio), resulta difícil determinar exactamente el lugar donde se cultivó por primera vez la vid. Según los datos más fiables, tuvo lugar en las imponentes laderas de la cordillera que los romanos llamaron “el fin de la Tierra” y que ocupa las estribaciones del Cáucaso, al este del Mar Negro (esta zona incluye el actual noroeste de Turquía, norte de Iraq, Azerbaiyán y Georgia).

Fijado este posible origen, resultados coincidentes con los anteriormente expuestos son los obtenidos a partir del análisis de un residuo amarillento localizado en el interior de una jarra, encontrada en las montañas de Irán. El objeto apareció, con otras cinco jarras más, junto a la pared de una “cocina” en un habitáculo neolítico, cuya construcción fue datada aproximadamente sobre 5.400-5.000 a.C.

Los análisis de infrarrojos, cromatografía líquida y otras determinaciones químicas mostraron claramente la presencia de tartrato cálcico en las jarras. El ácido tartárico sólo aparece en gran concentración y de forma natural en las uvas.

En las condiciones cálidas del Medio Oriente la fermentación de las uvas ocurriría espontáneamente y de forma muy rápida (De la Hera, 2002).

He aquí que la distribución natural de la especie *Vitis vinifera* se acerque bastante al posible origen de la viticultura occidental (entre los ríos Tigris y Eufrates) (Zohary y Hopf, 1988). La domesticación de la vid también pudo haber ocurrido de forma independiente en España (Núñez y Walker, 1989). Así pues, en el mundo ibérico su cultivo para vinificación y la elaboración de vino, se inicia en unos momentos muy tempranos, por influencia de los fenicios, aunque sólo con el correr del tiempo y con la aculturación de los indígenas hispanos, se asociará a determinadas celebraciones rituales, siendo la mejor documentada el banquete funerario, donde el vino siempre estuvo presente (Quesada, 1994).

Desde su origen caucásico, la viticultura se extendió en la única dirección posible: el Sur. De esta forma llega a las fértiles llanuras de Mesopotamia, y de ahí al Este hasta la India y China. Sin embargo, es hacia el Oeste, a través de Armenia y Siria, donde encontró su tierra prometida: las riberas del Mediterráneo.

En el Egipto faraónico (donde se consideraba el vino como la bebida de las clases sociales más altas) se distinguían distintos tipos de uva, como demuestran los papiros en los que se hace referencia a la célebre cepa *kankomet*, de la que se obtenía un excepcional vino destinado al consumo personal del faraón. Los egipcios conservaban el vino largas temporadas en vasijas especialmente creadas para ello, donde señalaban añada, viñedo y nombre del vinificador.

En Babilonia, recogidas en el código Hammurabi, encontramos leyes específicas que regulaban la elaboración y venta del vino. Consideradas cuestiones de máxima importancia, estas leyes aseguraban la calidad de un producto esencial en su dieta y con un marcado valor político. Herodoto nos cuenta en su Historia que “los persas después de bien bebidos, suelen deliberar acerca de los negocios de mayor importancia...”.

Herederos y continuadores de la tradición egipcia y oriental, los griegos contribuyen marcadamente al desarrollo del cultivo de la vid, impulsando enormemente la cultura del vino. La obra de Hesiodo “Los trabajos y los días”, probablemente escrita a finales del siglo VIII a.C., constituye la primera descripción detallada de la agricultura griega. En ella se mencionan, entre otras, las labores de poda de las vides y las fechas de vendimia más apropiadas para la tierra natal del autor (Unwin, 2001).

Durante la hegemonía griega, el cultivo de la viña tuvo también su importancia en la que hoy en día es la Denominación de Origen Jumilla. Prueba de ello es la existencia de gran cantidad de material cerámico encontrado en varios yacimientos de la comarca, especialmente una jarra denominada "Oinochoe", destinada únicamente para servir vino (toma su nombre del vocablo griego que designa la palabra vino: oinos) (Pardo, 1996).

El vino era uno de los alimentos básicos de la dieta romana, acompañaba todas sus celebraciones y, como sucede ahora, beber un vino de calidad, envejecido y procedente de una región afamada por sus caldos era una señal de riqueza, status social y buen gusto por parte de quien lo consumiera. En Roma el vino se convirtió en un indicador de cultura: beberlo en lugar de cerveza distinguió al romano del bárbaro. Su uso se extendió desde simple bebida a alimento, incluso medicina e ingrediente culinario (por ejemplo el *defrutum* que se usaba en Hispania como dulce, aunque también para macerar y conservar fruta dulce).

Según algunos indicios, los vinos romanos tenían extraordinaria capacidad de duración, lo que sugeriría que estaban bien elaborados. Estos vinos se clarificaban con ceniza, arcilla, resina, etc., luego se envasaban en ánforas de barro, tapadas con corcho o yeso y se dejaban envejecer hasta diez años, a veces junto a las chimeneas para que tuvieran cierto sabor ahumado.

Con la dominación romana (siglo II a.C.) el comercio del vino adquiere un carácter espectacular, implantando la cultura del vino en el mundo civilizado.

Por el año 20 de nuestra Era, queda constancia del envío de cerca de veinte millones de ánforas de buen vino español hacia la capital imperial, destacando el "*Vinum Digitanum*", que es con toda seguridad vino gaditano, antecesor del vino de Jerez. De la importancia económica y social que tenía la viticultura en esta etapa de la historia, habla el tratadista hispano Lucio Columela, nacido en el siglo I, en su obra "*Re Rustica*" (Hidalgo, 1993; Delgado, 1998).

Como detalle del refinamiento que Roma aplicó al vino, es curioso citar, la fabricación de ánforas en forma de pico que clavaban en la arena para mantener el vino fresco, limpio y transparente, pues mientras éste reposaba los posos sedimentaban en el fondo. Otro apunte curioso es que ya se diferenciaban y apreciaban variedades de uva específicas; por ejemplo, la blanca Moscatel o la

Malvasía (que producía un vino dulce y consistente capaz de aguantar estoicamente largos viajes y envejecer sanamente) eran muy apreciadas.

Tras la caída del imperio romano las sucesivas invasiones de los pueblos bárbaros acaban con la expansión de la vid, y aunque el reino visigodo respetó el viñedo, la conquista árabe supuso una verdadera catástrofe para la viticultura, pues se abandonaron o arrasaron gran cantidad de viñedos debido a la prohibición del consumo de alcohol por parte del Islam.

En España, el Islam pudo ser un gran obstáculo pero no llegó a constituir un verdadero enemigo del vino. La religión musulmana, y en especial el califato independiente de la península Ibérica, era inicialmente bastante tolerante con el vino. Este hecho, sumado a que el Corán no prohíbe la plantación y cultivo de la vid, hizo que el consumo persistiese. Como grandes sabios que fueron, los árabes no solamente bebían vino sino que gozaban de él. Sirvan como ejemplo el manual del médico Ibal-Awan en 1200, una de las obras más completas y alegóricas del vino; el *Theatrum Sanitaris* de Abdul Hassar-al-Muktar en 1050, donde defiende sus virtudes terapéuticas, o la afirmación del célebre médico iraní Avicena: “El vino es amigo del sabio y enemigo del borracho” (Segarra, 2004).

El binomio vino-religión existe desde las primeras manifestaciones del pensamiento trascendente. No hay que olvidar que la vid es la primera planta cuyo cultivo se menciona después del Diluvio. La Biblia, en su libro del Génesis, dice: “Noé, agricultor, comenzó a labrar la tierra y plantó una viña. Bebió de su vino y se embriagó, y quedó tendido desnudo en medio de su tienda” (Martínez Tomé, 1991).

En Egipto, donde los sacerdotes lo usaban como ofrenda frecuente a los dioses, creían que el vino era el sudor de Ra, el poderoso dios del Sol, consagrando este licor al dios Osiris, cuyo precedente eran los dioses sumerios Pa-gestín (“buena cepa”) y su esposa Nin-kasi (la “dama del fruto embriagador”).

Los rituales religiosos griegos y romanos tenían en el vino un elemento fundamental. Según la leyenda, el dios griego del vino Dionisios, provenía de Asia Menor y era la vid, siendo su sangre el vino. Por su lado, los romanos adoptaron al dios griego del vino con el nuevo nombre de Bacchus (Baco), convirtiéndolo en el más popular y festivo de los dioses, al que se dedicaban las

míticas bacchanalia, fiestas populares de las que deriva el carnaval actual (Segarra, 2004).

Ya en el cristianismo, Jesús inicia su prédica con el milagro de las bodas de Canaán, convirtiendo el agua en vino. Igualmente, ofrece vino en la última cena con sus apóstoles (Evangelio según San Mateo, XXVI: 26-29), afirmando “Yo soy la vid”. El vino constituyó, por tanto, un punto de referencia básico para los cristianos al convertirse en la bebida usada para emular la sangre de Cristo como permanente recordatorio del Sacrificio Supremo.

Pero si la asociación entre vino y religión en la antigüedad es curiosa e importante para el desarrollo del primero, mucho más vital lo es en la Edad Media. Se puede afirmar que la religión fue el puente mediante el cual el vino atravesó el abismo entre la decadencia y el esplendor, al igual que más adelante entre Europa y el Nuevo Mundo (sin la religión no se explicaría el vigor con el que se extendió, con la ayuda de misioneros, el cultivo de la vid en América).

Durante esta época de retroceso, los monasterios serán centros decisivos para la supervivencia de la viticultura, quedando los secretos de la vinificación prácticamente monopolizados por el clero.

Si originariamente la viña era un cultivo casi exclusivo del litoral y de las orillas de los ríos, con variedades aromáticas bien adaptadas a los climas muy soleados, en el Medievo, con el asentamiento de las órdenes religiosas en lugares aislados y generalmente altos, se hizo necesaria la selección de nuevas variedades de uva capaces de resistir las bajas temperaturas. De esta forma, por requerimientos religiosos para el culto en los conventos, se inició una nueva y más depurada etapa vitivinícola. Así nacieron los históricos viñedos del Rin, de Borgoña, del Piamonte, etc. En España, las primeras zonas vitícolas eclesiásticas, hoy prácticamente desaparecidas, se encuentran en Burgos, Lugo, algunas zonas de Navarra, La Rioja y ciertos puntos de Cataluña.

La mayor parte de estos lugares coincidían con la Ruta Jacobea, vía de comunicación e intercambio de ideas, conocimientos, lenguas y culturas que, a través del Camino de Santiago, introdujo nuevas variedades de uva (como la Albariño, al parecer de origen alemán, traída por monjes cistercienses) (Simó, 1987; Cedrón, 2004).

En los siglos XV y XVI se inicia una etapa importante, España y Portugal crean sus imperios. Colón lleva la vid a las Antillas en su segundo viaje, y los misioneros difunden su cultivo en México, Perú, Argentina y California siguiendo las rutas de exploración y colonización de España, Portugal, Inglaterra y Holanda.

En lo que respecta a la Región de Murcia, el Concejo de Jumilla y las Ordenanzas de Viñas y Cebadales de Chinchilla, localizados en el Archivo Histórico de Albacete y datadas del siglo XVI, hacen mención a un pequeño sector de viñas de regadío que se extendían al pie de la villa (Palencia, 1962-1963). No obstante, el cultivo de la viña era muy escaso en toda la zona, con producción para el autoconsumo de la comunidad, aplicaciones medicinales y poco más.

Durante los siglos XVII y XVIII, tiene lugar una nueva expansión en el cultivo de la vid. De hecho, las Actas Capitulares del Archivo de la Catedral de Murcia de 1667, así lo reflejan, pues en ellas se alude por primera vez al pago por parte de Jumilla de un diezmo del vino, lo que indica que hasta esa fecha no había existido una cosecha suficiente para tenerla en cuenta (Pardo, 1996).

Sin embargo, el esplendor alcanzado durante estos siglos comienza paulatinamente su oscurecimiento a mediados del siglo XIX, momento en que la viticultura europea es devastada por la filoxera (en un principio *Phylloxera vastatrix*, y hoy *Dactylasphaera vitifoliae*), insecto de procedencia americana. Dicha plaga hizo su aparición en 1853 en Francia, destruyendo la mayor parte de los viñedos y, generando con ello, la necesidad de buscar vinos en otros países.

En Murcia, el primer brote de filoxera aparece mucho más tarde (en 1894), lo que supone el crecimiento del cultivo en la zona por la oportunidad de comercializar los vinos en el país afectado (Pardo, 1996; Delgado, 1998). Así, Jumilla solamente sufre la plaga en las vides de regadío, pues las viñas de secano se pusieron en glaciés de acumulación, es decir sobre terrenos pedregosos, en los que no se propaga el insecto de la filoxera. Mientras que sí se vieron muy afectados los viñedos de Cieza, Villena, Pinoso, Hellín y Tobarra (Hernández, 2005).

Pero es también a partir del siglo XIX cuando la viticultura y principalmente la enología sufren cambios importantes con respecto a épocas anteriores. Louis Pasteur descubre que la fermentación es producida por microorganismos y

revolucionan la comunidad científica, utilizando por primera vez levaduras seleccionadas para conseguir resultados específicos.

También identifica las bacterias responsables de la alteración de los vinos. Estos grandes descubrimientos junto con los hechos ocurridos durante el siglo XX, entre los que podemos destacar la aparición del acero inoxidable, la climatización de las bodegas, la incorporación de aditivos antioxidantes y gases inertes, la utilización de riego y la mecanización del viñedo entre otros, son las causas de vertiginosos cambios, superiores a los acometidos en los cuatro milenios anteriores.

La incorporación de los países americanos a la viticultura, junto con los importantes cambios tecnológicos que muchas veces estas naciones lideran, supone el fin de la hegemonía del vino europeo. Parece relativamente sencillo explicar el éxito que estos nuevos Estados están teniendo en el mercado mundial. Por un lado, les fue muy fácil incorporar las nuevas tecnologías a estructuras aún no desarrolladas. También han incorporado nuevas herramientas de trabajo como el marketing, técnica decisiva tal y como hoy está estructurado el mercado. Por último, han ignorado corrientes de opinión tan arraigadas en Europa, como la que defiende que sólo se puede obtener buen vino en viñedos de bajo rendimiento y suelos poco fértiles. En definitiva, consideran la vid como un cultivo más, que ha de ser rentable. Dedican gran esfuerzo y recursos a la investigación y emplean todos los conocimientos y técnicas a su alcance, obteniendo una amplia gama de productos que se adaptan a los gustos del consumidor. Hoy en día, vinos europeos de gran tradición y calidad compiten con otros californianos, australianos, sudafricanos, entre otros, por una cuota de mercado (De la Hera, 2002).

## 1.2. SITUACIÓN ACTUAL DE LA VITIVINICULTURA

A lo largo del siglo XX, la producción y el comercio del vino sufren un proceso de cambio apoyado en la innovación tecnológica; proceso que se ha visto multiplicado por el incremento espectacular de la comunicación, el turismo y la globalización de los mercados.

La superficie mundial destinada al cultivo de la vid, que había crecido de forma continua hasta finales de los setenta, comenzó a disminuir. Este descenso, consecuencia de los arranques llevados a cabo por la Unión Europea y por la antigua Unión Soviética (estos últimos de manera expeditiva), se prolongó hasta 1998.

Es a partir de esta fecha cuando la tendencia cambia hacia un crecimiento rápido, que alcanzó un máximo en el año 2002 (7.929.000 hectáreas). Desde 2003 asistimos, con oscilaciones, a una recuperación del tamaño del viñedo mundial que se sitúa ligeramente por encima de 7,8 millones de hectáreas.

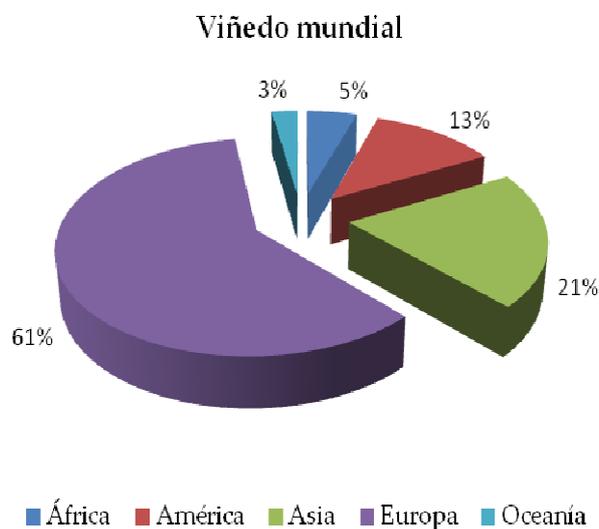
Estas variaciones superficiales de cultivo derivan de las situaciones particulares de cada continente. En orden alfabético, África ha asistido al desarrollo del viñedo en Sudáfrica y Egipto, mientras que en América son las plantaciones de Argentina, Brasil y, en menor medida, Chile las que han crecido.

Asia, por su parte, ha perdido su estatus de principal polo de crecimiento del viñedo mundial. No obstante, el viñedo chino constituye el motor principal del desarrollo continental y, aunque una parte importante de este cultivo sigue estando destinada a la elaboración de productos no vinificados, es el viñedo de vinificación el que progresa.

Europa, que hasta ahora había experimentado un retroceso ininterrumpido, parece disminuir su ritmo de caída. En último lugar, Oceanía mantiene su desarrollo aunque de forma más lenta de la que lo había hecho hasta ahora.

Expuesto lo anterior, conviene relativizar las evoluciones continentales en base a la importancia relativa de las superficies plantadas de viñas de cada uno de los continentes.

Así, tal y como se muestra en la Figura 1.1., el continente europeo sigue siendo la zona con mayor superficie dedicada al cultivo de la vid, ya que abarca aproximadamente el 61% de la superficie vitícola mundial con diferencias abismales respecto a otros continentes como Oceanía (3%) y África (5%) (OIV, 2007).



**Figura 1.1.** Distribución mundial de la superficie cultivada (Fuente: Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2007).

La segunda mitad de la década de los ochenta y primera de los 90 se caracterizó por una neta disminución de la producción vinícola mundial, acentuada durante el último quinquenio.

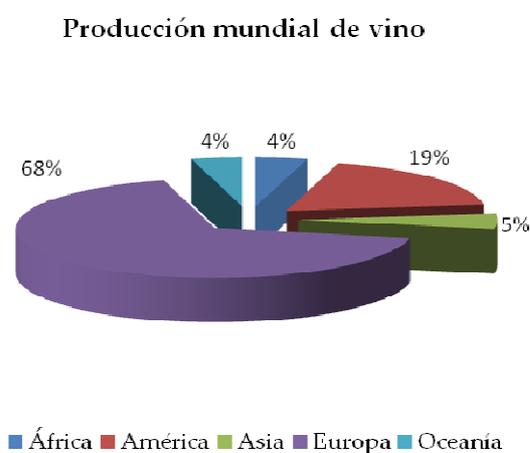
A pesar de las condiciones climáticas a veces desfavorables, como la acción devastadora de El Niño de 1998, la tendencia se invirtió. En los últimos años la producción mundial de vino se sitúa por encima de los 265 millones de hectolitros.

Estas cifras ponen de manifiesto una producción excedentaria, que trae asociada una alta competitividad en el ámbito internacional.

Dicha producción está muy concentrada en países de fuerte tradición vitivinícola como Francia (17,2%), Italia (17,3%) y España (13%), aunque desde la década de los 90 se está asistiendo a la irrupción de nuevos países productores de vino que van alcanzando mayor peso en el mercado internacional, con un modelo productivo menos reglamentado que en la Unión Europea, no aplicando, en general, el principio de protección de las denominaciones de origen.

Tal es el caso de Estados Unidos y Argentina, que acaparan ya el 5,6% y el 7,5% de la producción mundial; seguidos por Australia, que se sitúa alrededor del 3,6%; China, en torno al 4,5% y Sudáfrica, Alemania y Chile, aproximadamente entre el 3% y el 4%.

En la Figura 1.2. se representa la aportación de cada continente a la producción mundial de vino (OIV, 2007).



**Figura 1.2.** Producción mundial de vino (Fuente: Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2007).

El consumo mundial de vino, por su parte, ha registrado una ligera tendencia al alza situándose actualmente en torno a los 250 millones de hectolitros. De este modo, la continua caída del mismo observada desde principio de los ochenta parece haberse detenido.

Según los datos del Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV), los franceses encabezan la lista del consumo anual con algo más de 32 millones de hectolitros, seguidos por estadounidenses e italianos con 28 y 26,7 millones respectivamente.

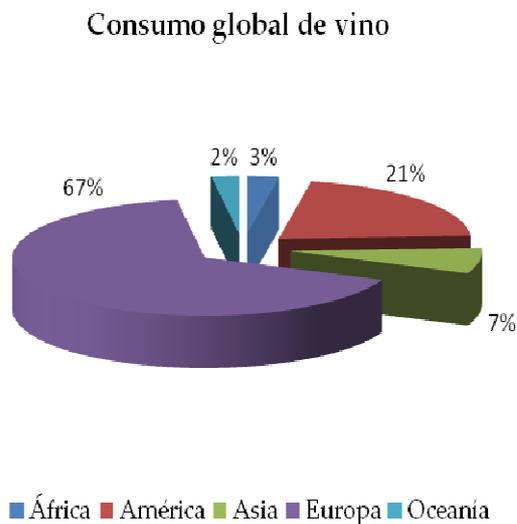
Sin embargo, cuando nos centramos en el consumo por persona y año son Francia (52,1 litros/ persona/ año), Luxemburgo (50,7 litros/ persona/ año) e Italia (45 litros/ persona/ año) los primeros de la lista.

España con unos 29,7 litros por habitante y año, posee unos niveles de consumo similares a los de países como Grecia o Argentina. Entre los países poco productores de vino pero muy consumidores destacan Eslovaquia, los Países Bajos y el Reino Unido.

Por continentes (Figura 1.3.), Europa constituye de lejos el primer continente consumidor (67% del consumo mundial) teniendo en Rusia y el norte de Europa sus zonas de crecimiento.

América, por su parte, ha visto ralentizado el desarrollo de su nivel de consumo. Así, mientras que en Estados Unidos, Canadá y Argentina el consumo sigue aumentando, Chile y Brasil han acusado un violento retroceso del mismo (OIV, 2007).

El desarrollo experimentado por China en los últimos años ha aupado, con casi 18 millones de hectolitros, al continente asiático a la tercera posición en lo que a consumo de vino se refiere. Por último, África y Oceanía, registran un aumento moderado de sus cifras de consumo.



**Figura 1.3.** Consumo mundial de vino (Fuente: Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2007).

En general, podríamos decir que la vitivinicultura europea lidera el mercado mundial del vino en sus diferentes aspectos; extensión de viñedo, producción y consumo de vino e intercambios comerciales. En este sentido, Europa es a la vez el primer exportador e importador mundial de vino, ya que acapara en torno al 70,3% del total de las exportaciones y el 74% de las importaciones globales (Figuras 1.4. y 1.5.) (OIV, 2007).

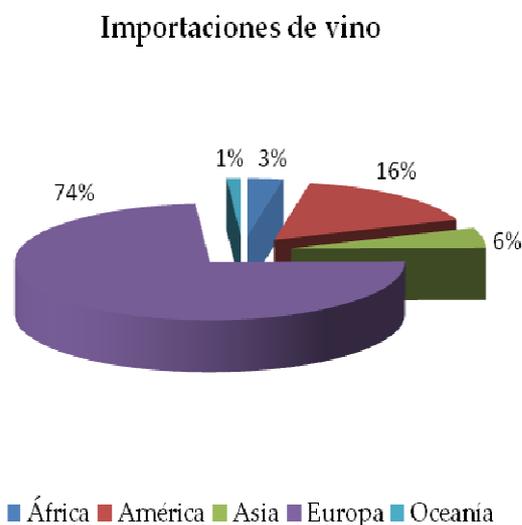
Así, los tres primeros productores, Francia, Italia y España, son al mismo tiempo los principales exportadores. Sus importaciones, sin embargo son pequeñas llegando, en el caso español a niveles similares a los de países como Bielorrusia, Australia o Nueva Zelanda.



**Figura 1.4.** Exportaciones mundiales de vino (Fuente: Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2007).

Centrándonos en la demanda, Alemania junto con el Reino Unido son los principales países importadores (entre los dos suman casi un tercio de las compras mundiales de vino). Asimismo, es importante reseñar el caso de Estados Unidos y Canadá, principales países importadores de vino fuera del continente europeo.

Finalmente mencionar a Japón y China quienes respectivamente han duplicado y cuadruplicado con creces sus importaciones en los últimos diez años.



**Figura 1.5.** Importaciones globales de vino (Fuente: Organización Internacional de la Viña y el Vino, 2007).

En el mundo hay unos excedentes de producción de vino que alcanzan aproximadamente unos 40,5 millones de hectolitros, es decir, más de lo que consumen África, Asia y Oceanía juntos. Esta situación excedentaria se da en todos los continentes en mayor o menor medida, excepto en Asia, que consume 4 millones más de hectolitros de los que produce.

### 1.2.1. Panorama vitivinícola español

Aunque el consumo de uva no ocupa un lugar relevante en el presupuesto de las familias españolas, debido a que es una fruta exclusivamente de temporada y la importación internacional para otras épocas sigue siendo limitada, es evidente que el consumo de vino es un valor en alza en España. En la última encuesta de presupuestos familiares publicada por el Instituto Nacional de Estadística (INE), el gasto en el grupo de bebidas alcohólicas fue el único, dentro de los que conforman el gasto en alimentación, que aumentó (INE, 2010).

En el último anuario de estadística agroalimentaria publicado por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (ahora Ministerio de Agricultura,

Alimentación y Medio Ambiente), el viñedo para vinificación representó el 95,4% de la producción total, situándose el primero respecto al viñedo destinado a uva de mesa (4,5%) y el dedicado a pasificación (0,015%). Prácticamente el 100% (5.282.892 toneladas) de la producción total de los viñedos para vinificación se emplea para la elaboración de vinos y mostos, y solamente un 0,008% de la producción (420 toneladas) se destina a consumo en fresco (MARM, 2010).

En la Región de Murcia, el viñedo de vinificación y el de uva de mesa suponen un 46,6% y un 53,4% de la producción total del viñedo. Asimismo, su destino principal es la producción de fresco y vino, destacando la variedad *Monastrell* (CARM, 2011).

Principalmente, los vinos españoles se exportan a Estados Unidos. Allí encontraremos que el consumo de vino/mosto se sitúa al mismo nivel que el de países europeos como Finlandia o Yugoslavia (cerca de 10 litros per capita anuales) (USDA, 2010).

En la escala nacional, destaca la elaboración de vinos tintos y rosados, que encabezan la producción vinícola. En la campaña 2009/10, se produjeron 20.102.280 hectolitros de tintos y rosados y 15.387.014 hectolitros de blancos. En concreto, según los últimos datos del Ministerio de Agricultura, la Denominación de Origen (D.O.) Jumilla, que agrupa ocho municipios de las provincias de Murcia y Albacete y cuya variedad mayoritaria es la uva *Monastrell*, con aproximadamente un 80% del total, es la séptima en superficie de cultivo inscrita y la decimoséptima por número de vinicultores. En la campaña 2006/07 esta Denominación contó con 27.022 hectáreas y 2.780 vinicultores (MARM, 2010).

### 1.3. VARIEDAD MONASTRELL

Conocida como *Monastrell*, *Morastell*, *Mouverde*, *Garrut*, *Alcayata*, *Ros*, *Reina*, *Veremeta*, *Gallata*, *Churret*, *Mataró*, *Negrelejo* y *Verema*; tiene su origen en España. Se piensa que su procedencia es El Camp de Morvedre, Sagunto (Valencia), del cual se tienen abundantes referencias históricas. Aparece documentada desde el siglo XV, aunque su utilización para elaborar vinos data de muchas generaciones anteriores a esta fecha.

Esta variedad se extendería desde el entorno de Sagunto hacia Francia para instalarse en el Languedoc-Rousellón y Provenza. Es más, diversos especialistas sostienen la teoría según la cual la *Mouverde* francesa habría derivado de la *Monastrell*, algo lógico si se piensa que hasta principios del siglo XX todavía se conocía con ese nombre en la zona de Sagunto, antes de que la filoxera obligara a sustituir la vid por el naranjo. De hecho, el ampelógrafo francés Pierre Galet identifica ambas variedades, por lo que se puede considerar que se trata de la misma cepa (Hidalgo, 1993).

Con una fuerte presencia en Murcia y Alicante, está considerada la variedad principal en las Denominaciones de Origen Jumilla, Yecla, Almansa, Alicante, Bullas, Benissalem, Cariñena, La Mancha, Costers del Segre, Penedés, Plá del Bages y Valencia.

A nivel mundial y junto a su homónima francesa, Mourvedre, ocupa el décimo primer puesto en cuanto a superficie cultivada. En España es la tercera variedad en extensión, y en Jumilla representa en torno al 80% de las variedades tintas puestas en cultivo.

Es una cepa de gran rusticidad y elevada resistencia a la sequía; que necesita buena insolación. Taxonómicamente, este arbusto leñoso trepador se encuadra en el reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, orden *Vitales*, familia *Vitaceae*, género *Vitis*, especie *Vitis vinifera* y variedad *Monastrell*.

Este arbusto de porte erguido, con sarmientos gruesos, cortos y poco ramificados tiene unos racimos pequeños o medianos, bastante compactos, que nacen de la tercera yema. Las bayas son medianas, esféricas y de sección transversal regular; con epidermis azul-negra, gruesa, ombligo persistente, rica en antocianos y encerada por abundante pruina.

Pedicelo de longitud media y color verde, pincel corto rojizo, con separación difícil, y dos pepitas por término medio. La pulpa es carnosa, blanda e incolora y con escasos taninos, generando un mosto de sabor áspero o neutro (Chirivella *et al.*, 1995; Pardo, 1996; Delgado, 1998).

Se adapta a podas diferentes, y debido al espesor de su piel muestra una sensibilidad media o alta frente a Mildiu y Oidio. Es muy resistente a la excoriosis, podredumbre gris y polilla (Reynier, 2002).

Caracterizada por su alto poder oxidativo, produce vinos intensos, con alto contenido en alcohol y abundantes taninos. Como notas distintivas ofrecen aromas balsámicos, a mora y minerales, especialmente cuando son vinos jóvenes.

Presentan buenas cualidades para la crianza, siempre y cuando se vinifiquen cuidadosamente y se realicen abundantes trasiegos antes del embotellado.

Los vinos que se elaboran con esta variedad van desde rosados y tintos jóvenes, a los clásicos vinos de alto grado, secos generosos y dulces naturales.

No obstante no se debe pasar por alto que el problema de estos vinos es su rápida evolución (Pardo, 1996).

#### 1.4. VINIFICACIÓN TRADICIONAL EN TINTO

La vinificación en tinto tradicional tal y como la conocemos hoy, es decir, con separación de racimos, despalillado, estrujado, maceración, prensado, fermentación, trasiego, clarificación y filtración data del siglo XVIII.

Esto la convierte en una técnica relativamente reciente y dinámica, pues desde hace doscientos años sigue evolucionando en torno a un objetivo claro: proteger los componentes más deseables del mosto de cara a producir el mejor vino posible.

El vino tinto tradicional es un vino de maceración, debido a que la fermentación alcohólica del mosto está acompañada de la disolución de los componentes de las partes sólidas de la uva, orujos y semillas. La maceración, por tanto, es la característica esencial de los vinos tintos, que los diferencia entre ellos, y de otros tipos de vino. Las sustancias colorantes, los taninos y los aromas de la uva se encuentran principalmente en la parte interna de la piel, en la pulpa hay muy poca cantidad, de modo que los orujos no aportan solamente los pigmentos responsables del color, sino muchos otros compuestos que contribuyen al sabor, al aroma y a la estructura que les confiere unas características organolépticas propias (Pardo, 1996).

Formalmente, la vinificación comienza cuando la uva o el mosto llegan a la bodega; las primeras etapas normalmente incluyen la eliminación de hojas y materiales extraños de la fruta.

Una vez hecho esto, la uva se despalilla/estruja para liberar el zumo y comenzar el proceso de maceración. El estrujado tiene por objeto romper las bayas y hacer salir el zumo de las uvas, que constituye la casi totalidad del volumen del vino. Normalmente el 100% de las bayas se rompen comenzando, de esta forma, el contacto del zumo con los hollejos, la pulpa y las granillas, que influirán en la extracción de estos componentes de la uva.

La eliminación de los tallos, hojas y pedicelos de las uvas antes del estrujado presenta varias ventajas: en primer lugar, el hecho de estrujar la fruta antes del despalillado conlleva la presencia de raspones recubiertos de mosto. Estos raspones son una de las mayores fuentes potenciales de contaminación microbiana. Por otra parte, la retirada de los raspones previa al estrujado minimiza la difusión de fenoles y lípidos de los tallos al mosto. Los fenoles extraídos de los tallos contienen catequinas, flavonoles y ácido caftárico. Éstos, aportan mayor astringencia y sabor amargo a los vinos que los fenoles procedentes de las semillas o las pieles (Jackson, 2008).

Como se expuso anteriormente, el estrujado debe seguir a la operación de despalillado. Dicho estrujado ha de ser inmediato a la eliminación de los raspones. Algunas bayas se rompen inevitablemente en el primer proceso, y el zumo que se desprende es susceptible de pardeamiento oxidativo y contaminación microbiana.

El estrujado de la fruta sin demora permite, si así se desea, la fermentación inminente del mosto, limita la contaminación microbiana y facilita un mejor control de la fermentación.

Una vez la vendimia ha sido estrujada y despalillada se transporta a los depósitos de fermentación (encubado), para que ésta se produzca en presencia de los orujos, facilitándose mediante la maceración la difusión en el mosto de la materia colorante presente en los hollejos.

Antes que la fermentación alcohólica se inicie, se realiza el sulfitado para proteger la masa estrujada de posibles oxidaciones y también para eliminar del medio fermentativo bacterias y levaduras perjudiciales.

En los vinos tintos la maceración es larga y tiene lugar, como se expuso anteriormente, de forma simultánea a la fermentación alcohólica. Tanto el "estilo" del vino como su aceptación por el consumidor pueden alterarse de forma

drástica a través de la duración y condiciones de la maceración. Así, la maceración proporciona a los bodegueros una herramienta para ajustar el carácter del vino.

En su etapa inicial, la maceración es inducida por la acción de enzimas hidrolíticas liberadas de las células que se rompen durante el estrujado. Esta maceración libera constituyentes del flavor de las semillas, las pieles y la pulpa promoviendo al mismo tiempo la síntesis de componentes adicionales del flavor. Estas enzimas pueden hidrolizar las macromoléculas a formas más sencillas de utilizar por parte de levaduras y bacterias.

El alcohol generado por la acción de las levaduras aumenta la extracción de antocianos, y promueve la difusión de taninos de las semillas y las pieles al mosto. Los compuestos fenólicos solubilizados dan a los vinos tintos sus propiedades básicas de apariencia, sabor y flavor.

Además, el etanol aumenta la liberación de ingredientes aromáticos de la pulpa y las pieles, que comenzó de forma enzimática.

Dada la importancia de la solubilización de fenoles durante la fermentación alcohólica, se hace necesario prestar especial atención a la extracción de compuestos aromáticos. Durante la fermentación, normalmente una o dos veces al día, se toman de uno a dos volúmenes de mosto de la base del fermentador y se bombean sobre la pared más alta, bien pulverizando o rociando el sombrero (remontado o bazuqueo), con el fin de que el caldo del fondo del depósito acceda a los hollejos del sombrero para mejorar la extracción del color y de los componentes del aroma y gusto (homogeneización), así como enfriar el sombrero (Boulton *et al.*, 2002).

Posteriormente el vino se trasiega del depósito de fermentación (descube), separándose de los orujos, que se prensan obteniéndose el llamado mosto-vino prensa, de inferior calidad al mosto-vino flor recogido directamente en el descube.

En el depósito nuevo, el vino termina la fermentación alcohólica (si el descube se ha realizado antes de que ésta acabe) e inicia la fermentación malo-láctica si la concentración de málico es elevada.

Estas operaciones liberan una fracción importante de los vinos tintos. Su aparente simplicidad esconde la extrema diversidad de componentes del mosto a

lo largo de su liberación. El prensado realiza y acaba la extracción fraccionada; dado que produce vinos con propiedades fisicoquímicas diferentes, los productores pueden influir en el carácter del vino mediante la elección de la prensa.

El prensado debe liberar la totalidad del jugo de la pulpa que produce la base del vino, los mejores jugos de los hollejos (compuestos aromáticos y fenólicos de calidad) sin extraer los compuestos de olores y sabores herbáceos o aceitosos de los hollejos, de los raspones o de las semillas.

Son las prensas horizontales y neumáticas las que rinden los prensados de mayor calidad.

Dichos prensados son relativamente bajos en sólidos en suspensión y en compuestos tánicos indeseables, ya que, entre otras características, no se estrujan las semillas. Por otra parte, la producción de ésteres frutales durante la fermentación tiende a ser menor en los mostos derivados de prensas en continuo (Jackson, 2008).

Acabado este proceso, se efectúan los trasiegos pertinentes y el vino es sometido a tratamientos que varían según el destino que vaya a tener. Si se desea un vino de consumo corriente (el descube se ha llevado a cabo antes de finalizar la fermentación alcohólica), éste se clarifica y se filtra, para conservar la limpidez del producto una vez embotellado. Si lo que se busca es un vino destinado a la crianza y al envejecimiento (el descube se ha realizado varios días después de finalizada la fermentación alcohólica) éste se traslada a barricas de madera, en las que permanece meses o años, dependiendo de si se desea un crianza, un reserva o un gran reserva.

### 1.5. LEVADURAS

Las levaduras son hongos unicelulares (mayoritariamente Ascomicetos, Basidiomicetos o Deuteromicetos), cuyo crecimiento vegetativo se lleva a cabo mediante fisión o gemación y que en su estado sexual no forman cuerpo fructífero (Kurtzman y Fell, 1998; Kavanagh, 2005).

Desde el punto de vista citológico, las levaduras poseen todas las estructuras propias de una célula eucariota. El tamaño de las células puede variar

ampliamente de 2-3  $\mu\text{m}$  a 20-50  $\mu\text{m}$  de largo y de 1 a 10  $\mu\text{m}$  de ancho La morfología de la célula de levadura presenta una gran diversidad en términos de color, textura y geometría (Tabla 1.1.).

Existen levaduras pigmentadas que crecen formando colonias coloreadas. Entre las levaduras que podemos encontrar en la uva y el vino destacan las colonias color crema de *Saccharomyces cerevisiae*, las negras de *Aureobasidium pullulans* así como el pigmento rojo (pulquerrimina) producido por *Metschnikowia pulcherrima*.

**Tabla 1.1.-** Morfología celular de las levaduras (Fuente: Kavanagh, 2005)

Morfología	Descripción	Ejemplo
Elipsoidal	Células de forma ovoide	<i>Saccharomyces</i>
Cilíndrica	Células alargadas con los extremos hemisféricos	<i>Schizosaccharomyces</i>
Apiculada	Células con forma de limón	<i>Hanseniaspora</i> <i>Saccharomycodes</i>
Ojival	Células alargadas con un extremo redondeado y el otro en punta	<i>Dekkera</i> <i>Brettanomyces</i>
En forma de frasco	Células que se dividen por gemación	<i>Pityrosporum</i>
Miscelánea	Triangular Curvada Esférica En forma de tallo	<i>Trigonopsis</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Debaryomyces</i> <i>Sterigmatomyces</i>
Pseudohifa	Cadenas de células que han gemado y no se han separado	<i>Candida</i>
Hifa	Células filamentosas ramificadas o sin ramificar que forman tubo germinativo	<i>Candida albicans</i>
Dimórfica	Células que crecen vegetativamente tanto en forma de levadura como en forma filamentosa	<i>Candida</i> <i>Saccharomycopsis</i> <i>Kluyveromyces</i> <i>Yarrowia</i> <i>Malassezia</i>

En cuanto a su crecimiento, éste se ve favorecido por los medios líquidos ya que necesitan mayor cantidad de agua libre que las bacterias para desarrollarse; su temperatura óptima oscila entre los 25 y los 35°C, con un máximo de 47°C por encima del cual la levadura es inviable a todos los efectos.

Por otro lado, los medios básicos son los que mayor inhibición provocan en estos microorganismos, que tienen su óptimo de pH entre 4 y 4,5 (Heard y Fleet, 1988; Suárez Lepe, 1997).

En lo referente a la reproducción, ésta es asexual, por gemación polar o multilateral, excepto en las levaduras ascomicéticas cuya reproducción es de tipo sexual mediante ascosporas. La reproducción es en las levaduras una herramienta taxonómica fundamental. De hecho, la existencia o no de una fase sexual en el ciclo vital de la levadura es requisito indispensable para su clasificación a nivel de género (Fugelsang y Edwards, 2007).

La ausencia de esporas sexuales durante el ciclo vital lleva a la levadura a ser clasificada como forma anamórfica o asexual (imperfecta). Si, por el contrario, se demuestra con éxito la presencia de esporas sexuales, entonces se trata de su forma sexual o teleomórfica (perfecta).

Al igual que ocurre con el resto de microorganismos, las levaduras requieren una serie de nutrientes para su crecimiento como carbono (prioritariamente azúcares de seis átomos de carbono), nitrógeno tanto orgánico (aminoácidos) como inorgánico ( $\text{NH}_3$  o  $\text{NH}_4^+$ ) y varios factores de crecimiento y supervivencia como vitaminas y minerales.

En función de cómo sean metabolizados los azúcares, las levaduras pueden clasificarse en oxidativas (no alcohogénicas) y fermentativas (productoras de alcohol). Las primeras crecen en la parte superior formando una película o velo, mientras que las fermentativas crecen en toda la masa.

Actualmente, el papel de las levaduras en la producción de alimentos y bebidas va más allá de la archiconocida elaboración del pan, la cerveza y el vino mediante *Saccharomyces cerevisiae*. Según Querol y Fleet (2006), la importancia de las levaduras en la industria alimentaria se puede clasificar en:

- Producción de alimentos y bebidas fermentadas.
- Producción de ingredientes y aditivos alimentarios.
- Deterioro de alimentos y bebidas.
- Biocontrol de microorganismos alterantes.
- Agentes probióticos y bioterapéuticos.
- Fuente de alérgenos alimentarios.
- Fuente de levaduras patógenas y oportunistas.

Estos microorganismos son parte integrante de un gran número de procesos industriales, en los que las levaduras pueden actuar conjuntamente con bacterias y hongos filamentosos.

Dichos procesos van desde la producción de bebidas alcohólicas e ingrediente alimentarios y coadyuvantes de gran valor, a todo un arsenal de productos metabólicos, que incluye: enzimas, vitaminas, polisacáridos capsulares, carotenoides, alcoholes polihídricos, lípidos, glicolípidos, ácido cítrico, etanol, dióxido de carbono y otros compuestos de síntesis obtenidos mediante la incorporación a la levadura de ADN recombinante (Kurtzman y Fell, 1998).

Por otra parte, existen levaduras que exhiben una importante actividad antifúngica, pudiendo actuar como agentes de biocontrol en el deterioro de los alimentos. Además, la actividad probiótica de algunas levaduras es, actualmente, otra de las propiedades de estos microorganismos cuya explotación industrial está en desarrollo (Fleet, 2006).

Desafortunadamente también existe un aspecto negativo en la actividad de las levaduras: su capacidad para deteriorar determinadas materias primas con la consiguiente merma económica y de calidad.

### **1.5.1. Taxonomía y clasificación de las levaduras**

Los hongos son un grupo polifilético, es decir, compuesto por linajes de organismos no emparentados entre sí, en el que las semejanzas no tienen un origen común sino que son consecuencia de la convergencia evolutiva.

Desde 1970, se ha realizado una reclasificación de las especies de levaduras debido a la descripción de nuevas especies, nuevas características o incluso al cambio en el criterio de evaluación de algunas otras.

A pesar de la existencia de nuevos parámetros de identificación como la composición química del coenzima Q, la ultraestructura de la pared celular, análisis serológicos e inmunológicos, así como la composición en bases del ADN y la homología de las secuencias de bases, los taxónomos no tienen resuelto el gran reto de la clasificación de estos microorganismos.

La clasificación presentada por Kreger van Rij en 1984 comprendía 500 especies y la propuesta por Kurtzman y Fell (1998) engloba cerca de 700 especies.

Kreger van Rij (1984) y Barnett (1992), siguen empleando pruebas clásicas para la clasificación de levaduras: caracteres morfológicos, culturales y bioquímicos. En esta línea, también se encuentran los trabajos de Beech *et al.* (1968) y Barnett (1971), que consideran estas pruebas como básicas para la clasificación de las levaduras y aplicables a todos los géneros a estudiar.

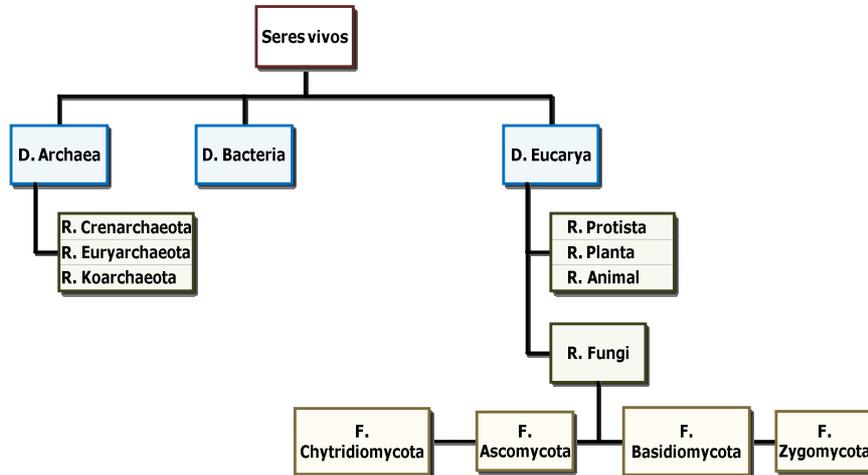
Por otro lado, Alonso *et al.* (1994), emplearon técnicas moleculares para evaluar el potencial enológico de levaduras autóctonas asociadas a vinos de calidad, de cara a una selección de las mismas.

En los últimos años, las técnicas de biología molecular aplicadas al campo de la enología se utilizan con el objetivo de proceder a una rápida identificación de los microorganismos fermentativos presentes en el vino, para solventar problemas de parada de fermentación y potenciar el comienzo de la misma (Constanti *et al.*, 1996; Gallego *et al.*, 1996).

Con independencia de la técnica utilizada, las levaduras se clasifican todas dentro del reino Fungi en la división Eumycota dando tres subdivisiones (Barnett *et al.*, 1990; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

- Ascomycotina productoras de esporas sexuales en el interior de las llamadas ascas.
- Basidiomycotina productora de basidios.
- Deuterimycotina incapaces de producir esporas.

En la Figura 1.6. se expone la clasificación de los seres vivos, tomando como referencia la clasificación manejada por el área de botánica de la Universidad de Almería en base a las indicaciones de la X edición *Dictionary of the fungi* de Kirk *et al.*, publicado por CAB International en 2008.



**Figura 1.6.-** Clasificación de los seres vivos (Fuente: Área de botánica de la Universidad de Almería; Kirk *et al.*, 2008).

Los hongos, aunque encuadrados en el reino Fungi, no se restringen a éste de forma exclusiva. El reino Protista incluye a casi todos los integrantes de la antigua división Myxomycota (organismos que no presentan pared celular y se alimentan por fagocitosis) así como a algunos hongos descendientes de las algas que han perdido la clorofila, como los mildius y algunos labirintuales.

El descubrimiento de algunos taxones pertenecientes a los basidiomicetos ha ampliado la visión que se tenía de la naturaleza de las levaduras.

Como consecuencia las levaduras empiezan a verse como hongos con un estado vegetativo en el que las formas principales de reproducción son la gemación y la fisión, resultando un crecimiento en células individuales muy similar al que llevan a cabo algunos hongos filamentosos dimórficos.

Este hecho provoca que la diferenciación entre las levaduras y estos hongos sea imprecisa en muchas ocasiones. En el caso de los ascomicetos, se ha demostrado mediante técnicas de comparación molecular, que las levaduras que se reproducen por gemación son filogenéticamente diferentes a las que lo hacen por fisión y a los euascomicetos, con la excepción del género *Eremascus*.

Es necesario hacer una distinción similar para las levaduras basidiomicéticas, las cuales están separadas filogenéticamente de los hongos y de otros taxones que forman cuerpos fructíferos (Kurtzman y Fell, 1998).

#### 1.5.1.1. *Phylum: Ascomycota*

Incluye hongos con hifas de tabiques simples; la fase asimiladora principal es monocariótica y no existen formas flageladas.

Se caracterizan principalmente por la formación de:

- Ascosporas: células en forma de saco donde se produce la cariogamia y la meiosis.
- Ascosporas: situadas dentro de los ascos, son esporas endógenas producidas por meiosis.
- Ascomas: cuerpos fructíferos de reproducción sexual, donde se sitúan los ascos. Los ascomas no se desarrollan en todos los grupos.

Históricamente los ascomicetos se han ubicado en dos clases taxonómicas, los Hemiascomicetos y los Euascomicetos. Los primeros se caracterizan por tener ascas no encerradas en un cuerpo fructífero (ascocarpo), mientras que los últimos normalmente forman sus ascas dentro de uno de ellos.

Las levaduras que se dividen por gemación, las que lo hacen por fisión y los géneros "yeastlike" como *Ascoidea*, *Cephaloascus*, y *Taphrina*, se incluyen en los hemiascomicetos, pero los tratados de taxonomía excluyen normalmente los taxones "yeastlike".

Las primeras propuestas de clasificación de las levaduras ascomicéticas fueron recopiladas por Lodder (1970) y Kreger-van Rij (1984).

Estas clasificaciones estaban basadas en su mayoría en el tipo de división vegetativa de la célula de levadura y en la morfología de las ascosporas. Otro aspecto que se tenía en cuenta para la clasificación taxonómica de las levaduras ascomicéticas era si dichas levaduras representaban organismos primitivos (como sugería su apariencia) o si eran formas reducidas que derivaban de linajes fúngicos más evolucionados.

En base a esto último, en 1972 Cain se decanta por la postura de que las levaduras representan formas reducidas de hongos evolucionados; para ello se sustenta en la forma de sombrero de las ascosporas, que es común a los géneros *Pichia* (*Hansenula*), *Cephaloascus*, y *Ceratocystis* como evidencia de la adaptación evolutiva de estos organismos.

Redhead y Malloch (1977) aceptaron esta teoría y la utilizaron para explicar la procedencia de varios ascomicetos “yeastlike” e incluirlos en familias de hongos formadores de micelio ya existentes.

Una década después Von Arx y van der Walt (1987), también de acuerdo con la idea de que la forma de la ascospora constituía un parámetro filogenético importante, sugirieron la relación entre las levaduras y los Euascomicetos.

En los últimos años, el sistema de clasificación de las levaduras, así como el de otros hongos, ha sido revolucionado por la incorporación del análisis filogenético de secuencias moleculares; la mayoría de estos análisis se basan en la secuenciación de genes del rRNA, aunque la comparación de otras moléculas da resultados similares.

Los estudios de: Walker, 1985; Barns *et al.*, 1991; Hausner *et al.*, 1992; Hendriks *et al.*, 1992; Berbee y Taylor, 1993; Nishida y Sugiyama, 1993; Kurtzman, 1994 demostraron lo siguiente:

- Las levaduras que geman y las “yeastlike” como *Ascoidea* y *Cephaloascus* son miembros de la misma clase, la cual constituye un grupo “hermano” de los euascomicetos (algunos de los cuales son dimórficos y tienen una fase de levadura).
- Existen algunas excepciones como *Eremascus*, euascomicetos que forman ascas en un cuerpo fructífero, mientras que los miembros de la clase levaduras no lo forman.
- *Schizosaccharomyces*, *Taphrina*, *Protomyces*, *Saitoella*, y *Pneumocystis* forman un grupo divergente dentro de los ascomicetos.
- La forma de la ascospora, la presencia o ausencia de hifas y pseudohifas, la presencia o ausencia de gemación, y la mayoría de reacciones de asimilación no sirven para establecer relaciones filogenéticas.

La clase "Archiascomycetes" fue propuesta por Nishida y Sugiyama (1993) para aquellos taxones ahora representados por *Schizosaccharomyces*, *Taphrina*, *Protomyces*, *Saitoella*, y *Pneumocystis*.

Aunque las distancias genéticas dentro de esta clase son inciertas, ésta ha sido dividida en 4 órdenes: Schizosaccharomicetales, Taphrinales, Protomicetales, y Pneumocistidales; de los que Taphrinales y Protomicetales aparecen estrechamente relacionados y podrían resultar sinónimos.

En 1994 Eriksson describió el orden Pneumocistidales para la ubicación del género *Pneumocystis*. Prillinger *et al.*, (1990) apoyándose en las muchas diferencias que previamente había observado entre *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces*, introdujo el orden Schizosaccharomicetales aunque dejando la puerta abierta a una posible afinidad entre los basidiomicetos y este nuevo orden. Esta conexión "cuestionable" con los basidiomicetos y la dudosa relación, existente ya en la literatura, entre *Schizosaccharomyces* y los géneros *Dipodascus* y *Geotrichum*, llevó a Kurtzman en 1993 a corregir el orden Schizosaccharomicetales con el fin de resaltar su naturaleza ascomicética (Kurtzman, 1993 y 1993a). Además, ese mismo año, los exámenes llevados a cabo por Eriksson (Eriksson *et al.*, 1993) en los que analizó las diferencias, tanto moleculares como orgánicas, entre *Saccharomyces* y *Schizosaccharomyces* refuerzan la corrección de este orden.

Por otra parte, la clase Hemiascomycetes ha llegado a ser filogenéticamente restringida para incluir solamente a las levaduras que se reproducen por gemación y a los géneros "yeastlike" como *Ascoidea* y *Cephaloascus*. Previamente todos estos taxones se incluían en el orden Endomycetales.

No obstante, la identidad de este orden ha sido puesta en duda debido a que la tipificación de *Endomyces* (género "tipo" de este orden) se basa exclusivamente en los dibujos que Brefeld hiciera (von Arx, 1972).

En un esfuerzo por mantener una cierta estabilidad en la nomenclatura, Redhead y Malloch (1977) designaron como neotipo a un espécimen encontrado sobre *Agaricus melleus*, el cual parecía coincidir con la descripción de *Endomyces decipiens*, la especie "tipo".

Por su parte, Kurtzman y Robnett (1995) determinaron la secuencia 5' de la subunidad grande del rDNA de muestras mantenidas en cultivos frescos y que habían sido identificados como *Endomyces decipiens* y *Endomyces scopularum*. La cepa identificada como *E. decipiens* resultó ser *Dipodascus albidus*, mientras *E. scopularum* mostró ser un euascomiceto.

El análisis de la secuencia del neotipo liofilizado de *E. decipiens*, aunque técnicamente posible, no resolvería el problema taxonómico debido a la incertidumbre de cuál de las especies es la que corresponde con la que dibujó Brefeld.

Lo expuesto anteriormente es sólo un ejemplo de la enorme complejidad taxonómica que envuelve a los ascomicetos.

Es precisamente esta complejidad la que nos obliga a considerar muchas de las descripciones de los géneros como agrupaciones diagnósticas para ayudar en la identificación de especies.

Por ejemplo *Pichia*, que es un género filogenéticamente divergente, se acepta con las especies que actualmente tiene asignadas solamente porque las propuestas para esta división dentro de los grupos filogenéticamente definidos (géneros) parecen inadecuadas.

En las Tablas 1.2 y 1.2. (continuación) se muestra la clasificación para los Ascomicetos propuesta por Kurtzman y Fell (1998) en su libro "Las levaduras. Un estudio taxonómico".

**Tabla 1.2.-** Clasificación de los hongos ascomicéticos (Fuente: Kurtzman y Fell, 1998).

CLASE	
Orden	Familia
Familia	Género
Género	Género
<b>“ARCHIASCOMYCETES”</b>	Metschnikowiaceae
<b>Schizosaccharomycetales</b>	<i>Clavispora</i>
Schizosaccharomycetaceae	<i>Metschnikowia</i>
<i>Schizosaccharomyces</i>	Saccharomycetaceae
<b>Taphrinales</b>	<i>Arxiozyma</i>
Taphrinaceae	<i>Citeromyces</i>
<i>Taphrina</i>	<i>Cyniclomyces</i>
<i>Lalaria</i>	<i>Debaryomyces</i>
<b>Protomycetales</b>	<i>Dekkera</i>
Protomycetaceae	<i>Issatchenkia</i>
<i>Protomyces</i>	<i>Kluyveromyces</i>
<i>Saitoella</i>	<i>Lodderomyces</i>
<b>Pneumocystidales</b>	<i>Pachysolen</i>
Pneumocystidaceae	<i>Pichia</i>
<i>Pneumocystis</i>	<i>Saccharomyces</i>
<b>EUASCOMYCETES</b>	<i>Saturnispora</i>
<i>Endomyces</i>	<i>Torulaspora</i>
<i>Oosporidium</i>	<i>Williopsis</i>
<b>HEMIASCOMYCETES</b>	<i>Zygosaccharomyces</i>
<b>Saccharomycetales</b>	Saccharomycodaceae
Ascoideaceae	<i>Hanseniaspora</i>
<i>Ascoidea</i>	<i>Nadsonia</i>
Cephaloascaceae	<i>Saccharomyces</i>
<i>Cephaloscypha</i>	<i>Wickerhamia</i>
Eremotheciaceae	Saccharomycopsidaceae
<i>Eremothecium</i>	<i>Ambrosiozyma</i>
<i>Coccidiascus</i>	<i>Saccharomycopsis</i>

**Tabla 1.2.-** Clasificación de los hongos ascomicéticos (cont.) (Fuente: Kurtzman y Fell, 1998).

CLASE Orden Familia Género	Familia Género
Dipodascaceae <i>Dipodascus</i> <i>Galactomyces</i> <i>Sporopachydermia</i> <i>Stephanoascus</i> <i>Wickerhamiella</i> <i>Yarrowia</i> <i>Zygoascus</i>	Candidaceae <i>Aciculoconidium</i> <i>Arxula</i> <i>Blastobotrys</i> <i>Botryozyma</i> <i>Brettanomyces</i> <i>Candida</i> <i>Geotrichum</i> <i>Kloeckera</i> <i>Myxozyma</i> <i>Schizoblastosporion</i> <i>Sympodiomyces</i> <i>Trigonopsis</i>
Endomycetaceae <i>Endomyces</i> <i>Helicogonium</i> <i>Myriogonium</i> <i>Phialoascus</i> <i>Trichomonascus</i>	
Lipomycetaceae <i>Babjevia</i> <i>Dipodascopsis</i> <i>Lipomyces</i> <i>Zygozoma</i>	

#### 1.5.1.2. Phylum Basidiomycota

El filo Basidiomycota incluye a los hongos de mayor complejidad morfológica: setas, yesqueros, hongos gelatinosos, carbones, royas, etc. Su papel en la naturaleza es importante a la par que variado pues abarca desde hongos descomponedores hasta peligrosos fitoparásitos (las royas y los carbones), pasando por los que son cultivados para obtener setas comestibles como el champiñón; incluso los hay que forman ectomicorrizas con los árboles, aspecto éste esencial para la supervivencia del bosque.

La característica común a los basidiomicetos es la presencia de basidios, células especializadas que tras la cariogamia y la meiosis producen generalmente 4 basidiosporas en su parte exterior.

Muchos heterobasidiomicetos tienen un estado haploide unicelular (se reproduce por gemación), que alternan con un estado de hifa dicariótico, es decir, son dimórficos y poseen un estado de levadura. En muchas especies se dan estados de levadura diploides, aneuploides o dicarióticos, y muchos taxones anamórficos son conocidos sólo como levaduras.

Para las levaduras teleomórficas el estado de hifa puede estar limitado en cultivo (por ejemplo en algunas especies de *Cystofilobasidium*), pero puede ser indefinido y quizá ilimitado en muchas otras (por ejemplo la mayoría de especies de *Rhodosporidium*, *Tremella*, y *Sirobasidium*).

Con algunas excepciones, nuestro conocimiento del desarrollo natural, ecología, y biología general de estos hongos es insuficiente o inexistente. Las especies que parasitan plantas (algunas de las cuales son de interés económico) tienen fases de hifa de extensión y duración conocida, pero incluso en estas especies poco se conoce acerca de la frecuencia temporal y distribución de los estados de levadura.

Los términos “levadura” o “estado de levadura” se aplican a la fase o fases gemantes unicelulares dentro del ciclo vital de los heterobasidiomicetos. Estos estados de levadura se obtienen fácilmente de basidiosporas en aquellas especies que poseen basidiocarpos macroscópicamente visibles (por ejemplo muchas especies de *Tremella*, *Sirobasidium*, *Holtermannia*, *Cystobasidium*, etc.), y de aquellas que causan síntomas visibles de enfermedad en las plantas (por ejemplo especies de *Ustilago*, *Itersonilia*, etc.).

Estos estados de levadura proporcionan una herramienta para el estudio de las relaciones entre los hongos gemantes, incluidas determinadas relaciones entre levaduras anamórficas de dudosa afinidad. Actualmente son conocidos los estados de levadura de Agaricostilbales, Atractiellales, Cryptobasidiales, Exobasidiales, Filobasidiales, Graphiolales, Platyglloeales, Septobasidiales, Sporidiales, Tremellales, y Ustilaginales.

No obstante, los estados de levadura de muchos de estos grupos de organismos son raramente aislados en la naturaleza, aparte de los procedentes de los basidiocarpos.

A los hongos que forman fragmentos de hifa pequeños o agregados celulares, normalmente se les denomina yeastlike (por ejemplo especies de *Trichosporon*). Por otro lado, la distinción entre las distintas morfologías (unicelular, yeastlike, y pseudohifa) no siempre es clara.

El dimorfismo levadura/hifa que tiene lugar en muchos grupos de heterobasidiomicetos constituye un rasgo taxonómico importante.

Brefeld (1881) fue el primer micólogo en llevar a cabo un estudio detallado de la germinación de las basidiosporas en hongos heterobasidiomicéticos; describió e ilustró el crecimiento por gemación en placas de cultivo de muchos hongos gelatinosos, así como de aquellos que se desarrollan formando manchas (royas y carbones). En todos estos estudios el elemento clave de clasificación para Brefeld fue el dimorfismo; si bien es cierto que sus ideas sobre el dimorfismo no tuvieron mucho apoyo en el siguiente siglo, algunos aspectos de su sistema de clasificación sobrevivieron.

El taxón Heterobasidiomicetos fue descrito por Patouillard en el año 1900. Dentro de este taxón encontramos tanto basidios septados como profundamente divididos, basidios que con frecuencia emergen de diferentes probasidios (teliosporas o sus equivalentes en royas y carbones), y en los que la germinación de las esporas es completamente opuesta a la de los homobasidiomicetos.

Bessey (1950) reconoce 3 subclases de basidiomicetos:

- *Teliosporae*: hongos con teliosporas y basidios septados transversalmente. Incluyen royas, carbones, y hongos asociados a estos.
- *Heterobasidiae*: hongos que presentan basidiomas gelatinosos y basidios septados; en muchos taxones no hay teliosporas ni equivalentes. Esta subclase incluye: Tremelales, Auriculariales, Dacrimicetales, y Tulasuellales.
- *Eubasidiae*: formado por los homobasidiomicetos, son hongos con basidios sin septos ni división profunda.

Talbot (1968) también divide a estos hongos en tres clases: Teliomicetos, Phragmobasidiomicetos, y Holobasidiomicetos, incluyendo en esta última clase a los Dacrimicetales y a los Tulasnellales; ha de subrayarse que para su clasificación, Talbot no considera el dimorfismo como parámetro de importancia taxonómica.

Tuvo que ser en la clasificación hecha por Patouillard donde aparecen las primeras familias, aunque también hay que poner de manifiesto que este micólogo no tuvo en cuenta los estados de levadura a la hora de desarrollar su clasificación.

La germinación de las basidiosporas en los heterobasidiomicetos es diferente a la que se da en los homobasidiomicetos y, de hecho, la gemación de las basidiosporas es mencionada a menudo en estas primeras clasificaciones, puesto que el dimorfismo fue desconocido y no se estudió hasta el siglo XX.

Por otra parte, y aunque a día de hoy está claro que los hongos dimórficos antiguamente encuadrados en los heterobasidiomicetos no forman un grupo natural, esta designación es acertada para su uso como categoría informal en estudios de basidiomicetos dimórficos.

Como se puede deducir de los anteriormente expuesto, la clasificación de los basidiomicetos ha cambiado con frecuencia desde que los primeros micólogos se empezaron a ocupar de ellos; de esta forma la clasificación que se acepta actualmente es la que se expone en las Tablas 1.3. y 1.3. (continuación). (Kurtzman y Fell, 1998).

Finalmente, debe destacarse que las levaduras representan el grupo de microorganismos más importante en la elaboración de vino. Sin *Saccharomyces spp.* la producción de vinos de calidad sería imposible.

No obstante, *Saccharomyces* no es el "único" género; existen otros géneros y especies presentes durante la vinificación que tienen su impacto en la calidad tanto positiva como negativamente (Fleet y Heard, 1993; Fugelsang *et al.*, 1993; Deak y Beuchat, 1996; Loureiro y Malfeito-Ferreira, 2003).

**Tabla 1.3.-** Clasificación de los hongos basidicomicéticos (Fuente: Kurtzman y Fell, 1998).

Orden Familia Género	Orden Familia Género
<b>Ustilaginales</b> Ustilaginaceae <i>Microbotryum</i> <i>Schizonella</i> <i>Sorosporium</i> <i>Sphacelotheca</i> <i>Sporisorium</i> <i>Ustilago</i> <i>Ustilentyloma</i>	Microstromaceae <i>Microstroma</i>
<b>Sporidiales</b> Sporidiobolaceae <i>Leucosporidium</i> <i>Rhodospodium</i> <i>Sporidiobolus</i> <i>Erythrobasidium</i> <i>Kondoa</i> <i>Sakaguchia</i>	<b>Exobasidiales</b> Exobasidiaceae <i>Brachybasidium</i> <i>Dicellomyces</i> <i>Exobasidiellum</i> <i>Exobasidium</i> <i>Laurobasidium</i>
<b>Platyglloeales</b> Cystobasidiaceae <i>Colacogloea</i> <i>Cystobasidium</i> <i>Kriegeria</i> <i>Mycogloea</i> <i>Occultifer</i> <i>Tijbodasia</i>	<b>Tremellales</b> Sirobasidiaceae <i>Fibulobasidium</i> <i>Sirobasidium</i> Tremellaceae <i>Bulleromyces</i> <i>Itersonilia</i> <i>Holtermannia</i> <i>Phyllogloea</i> <i>Sirotrema</i> <i>Tremella</i> <i>Trimorphomyces</i> Syzygosporaceae <i>Christiansenia</i> <i>Syzygospora</i>

**Tabla 1.3.-** Clasificación de los hongos basidicomicéticos (cont.)  
(Fuente: Kurtzman y Fell, 1998).

Orden Familia Género	Orden Familia Género
<b>Septobasidiales</b> Septobasidiaceae <i>Auriculosocypha</i> <i>Coccidioidictyon</i> <i>Ordonia</i> <i>Septobasidium</i> <b>Atractiellales</b> Chionosphaeraceae <i>Chionosphaera</i> <i>Stilbum</i> Atractogloeaceae <i>Atractogloea</i> <b>Agaricostilbales</b> Agaricostilbaceae <i>Agaricostilbum</i> <b>Graphiolales</b> Graphiolaceae <i>Graphiola</i> <b>Cryptobasidiales</b> Cryptobasidiaceae <i>Conyodyctum</i> <i>Cryptobasidium</i>	<b>Filobasidiales</b> Filobasidiaceae <i>Cystofilobasidium</i> <i>Filobasidiella</i> <i>Filobasidium</i> <i>Mrakia</i> <i>Xanthophyllomyces</i> Sporobolomycetaceae <i>Bensingtonia</i> <i>Kurtzmanomyces</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Sporobolomyces</i> <i>Sterigmatomyces</i> Cryptococcaeae <i>Bullera</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Fellomyces</i> <i>Kockovaella</i> <i>Phaffia</i> <i>Trichosporon</i> <i>Tsuchiyaea</i> <i>Udeniomyces</i> <i>Hyalodendron</i> <i>Moniliella</i>

## 1.6. FERMENTACIÓN

El término fermentación originariamente era utilizado para designar a los fenómenos de descomposición de la materia orgánica con rápido y tumultuoso desprendimiento de gas. Posteriormente este término se extendió a los procesos microbianos exotérmicos, desarrollo de microorganismos en condiciones anaerobias, y otros procesos, es decir, a cualquier transformación microbiana de la materia.

Dentro de las fermentaciones, la fermentación del vino podría considerarse la aplicación más antigua de la biotecnología incluso más que la elaboración del pan. En la vinificación están involucrados diferentes microorganismos: levaduras, bacterias ácido-lácticas y bacterias acéticas, cuyo crecimiento y metabolismo debe ser controlado.

Los requisitos esenciales para este proceso, en lo que a microbiología se refiere, son los siguientes:

- Mosto rico en azúcar (como caso excepcional, se obtienen mostos muy ricos en azúcar “320 g/L” de aquellas uvas afectadas de *Botrytis cinerea*).
- Un gran inóculo de microorganismos ( $10^6$  UFC/mL).
- Un proceso de fermentación anaerobio.

Además existe una estrecha correlación entre las distintas fermentaciones, así como la posibilidad de enlazar de una a otra gracias a que algunas de las enzimas que actúan en los primeros pasos de descomposición de los azúcares son comunes a muchos tipos de levaduras.

Con todo ello, y de forma global, el proceso fermentativo se podría esquematizar en estos cuatro conceptos (Suárez Lepe y Leal, 1992):

- Es la ruta más sencilla para producir energía en lo que a sus procesos bioquímicos se refiere.
- Las reacciones, en las que los compuestos orgánicos actúan como dadores y aceptores de electrones, están catalizadas enzimáticamente.
- Los sustratos de fermentación son: glucosa y fructosa para la fermentación alcohólica que realizan las levaduras, y ácidos orgánicos (ácido málico) para la fermentación malo-láctica llevada a cabo por bacterias lácticas.

- El desarrollo y resultado final de la fermentación diferirá en base a las características fisiológicas de la levadura y a las condiciones ambientales en las que se lleve a cabo.

La fermentación del mosto de uva puede ser espontánea, llevada a cabo por la flora presente en las uvas y en la bodega, o inoculada, mediante la adición de una cepa conocida de *Saccharomyces*. Este último procedimiento minimiza la influencia de levaduras espontáneas sobre la calidad del vino.

En todo caso, una cepa de levadura adecuada para la elaboración de vino debe cumplir las siguientes condiciones (Boulton *et al.*, 2002):

- Llevar a cabo una fermentación vigorosa y completarla hasta conseguir un vino seco (sin azúcar residual fermentable, o con muy poco).
- Que consigan características reproducibles en la fermentación, y que sucedan de forma predecible.
- Que tengan una buena tolerancia al etanol.
- Buena tolerancia a la temperatura.
- Que no produzcan aromas o gustos extraños.
- Tolerantes al SO<sub>2</sub>.
- Que floculen de manera que sea fácil desfangar (especialmente para la fermentación secundaria en vinos espumosos).

Los primeros microbiólogos que estudiaron las transformaciones mosto-vino, observaron que en la fase inicial de la fermentación espontánea predominaban células en forma de limón (levaduras apiculadas). A medida que el proceso avanzaba las formas apiculadas perdían su predominio apareciendo en el medio otras de forma globosa, a veces alargadas, para finalmente hacer acto de presencia otras de forma elíptica, las cuales al consumir todos los azúcares del medio floculan y se depositan.

Estudios posteriores pusieron de manifiesto que las levaduras apiculadas producen escasa cantidad de alcohol y notable proporción de compuestos volátiles, dejando gran cantidad de azúcar en el medio; por el contrario, la levadura elíptica genera más alcohol (consume más azúcar) y menos metabolitos secundarios.

De estas observaciones surgieron las experiencias de Müller-Thurgau (Arroyo, 1962) que proponen el alejamiento de las levaduras apiculadas del proceso fermentativo. Comienza así el perfeccionamiento tecnológico de la vinificación y con él, la utilización de la molécula de SO<sub>2</sub> para la esterilización del mosto.

Actualmente sabemos que en la fermentación del mosto se pueden diferenciar tres fases principales (Ribéreau-Gayon, 1985):

- Una fase limitada de multiplicación que dura de 2 a 5 días, y que lleva a la población celular a niveles de 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> UFC/mL.
- Una fase estacionaria de unos 8 días de duración en la que los niveles de células viables se mantienen constantes.
- Una fase de declive en la cual la población de células viables se va reduciendo progresivamente hasta alcanzar valores aproximados de 10<sup>5</sup> UFC/mL. Este declive puede durar varias semanas.

Objetivamente estas fases representan el ciclo de crecimiento microbiano clásico, pero en el caso de la fermentación del mosto hay una serie de particularidades a tener en cuenta (Ribéreau-Gayon, 1985):

- La duración es particularmente larga.
- El crecimiento total está limitado y se restringe a cuatro o cinco generaciones.
- La parada en el crecimiento no deriva del agotamiento del azúcar en el mosto.
- Existe una desproporción entre las primeras fases y la de declive, pudiendo esta última ser tres o cuatro veces más larga que la fase de multiplicación.

La cinética de la fermentación está directamente ligada con el ciclo de crecimiento; de hecho, crecimiento y fermentación son conceptos tan inseparables que la sola disminución de la actividad metabólica de las levaduras puede desembocar en una parada espontánea de la fermentación. Así pues, para una fermentación rápida y completa (esto es, que se utilice todo el azúcar), ésta ha de desarrollarse en su totalidad durante las fases exponencial y estacionaria.

Este tipo de fermentaciones (rápida y completa) generalmente se da en aquellos mostos que tienen menos de 200 g/L de azúcar; para aquellos mostos cuyo contenido en azúcar es mayor, el final de la fermentación lo llevan a cabo células en fase de declive cuya actividad metabólica es menor, lo cual puede llevar a un cese prematuro de la fermentación.

A nivel nacional, el estudio microbiológico planificado por diferencias ecológicas de zonas vitivinícolas se inicia en España con los estudios de Castelli e Íñigo (1957) sobre mostos de la zona de La Mancha. Posteriormente, el equipo de microbiología del Instituto de Fermentaciones Industriales del C.S.I.C. ha realizado estudios de las regiones españolas tanto con denominación de origen (D.O.) como con denominación específica, llegando a una serie de conclusiones muy notables (Barcenilla, 1990):

- En la fermentación espontánea de los mostos de uva españoles, se diferencian 3 fases dominadas por levaduras de distintas especies que se suceden de forma precisa.
- En la primera fase (la fermentación todavía no es perceptible) se encuentran levaduras apiculadas productoras de bajo grado alcohólico y escasa pureza fermentativa, que dan lugar a la aparición en el vino de gran cantidad de sustancias volátiles.
- En la segunda fase (comienzo de la fermentación) aparecen especies de gran pureza fermentativa y productoras de grado alcohólico medio.
- La tercera fase (fermentación tumultuosa) está dominada por distintas especies del género *Saccharomyces*; estas levaduras son las encargadas de finalizar el proceso fermentativo y productoras de un alto porcentaje de alcohol.
- En algunos casos, al cabo de 20-25 días de acabada la fermentación alcohólica, tiene lugar la aparición de velos blastomicéticos en la superficie del vino; esto tiene lugar en la totalidad de las muestras de Andalucía Occidental y en proporción variable en Valladolid, Extremadura, Aragón y Penedés.
- Las especies de levaduras esporuladas dominan sobre las no esporuladas en zonas cálidas, dándose el caso inverso en zonas frías. Levaduras no esporuladas son mayoritarias en la primera fase fermentativa.

- Existe diferencia de especies entre mostos de zonas frías y cálidas; sirva de ejemplo *Hanseniaspora guilliermondii* se encuentra en zonas cálidas sustituyendo a *Kloeckera apiculata* que se encuentra en zonas frías. La primera es la forma perfecta de la segunda.

La aplicación a escala industrial de levaduras locales seleccionadas para cada zona potenciará el elemento biológico responsable directamente de la transformación mosto-vino, ya que todo vino es obra de levaduras y para conseguir los mejores vinos tecnológicos de cada zona se requiere el uso de levaduras locales seleccionadas (Barcenilla, 1990).

### 1.6.1. Bioquímica de la fermentación

#### 1.6.1.1. Fermentación alcohólica

Es un proceso ejecutado en su totalidad por las levaduras que utilizando los recursos enzimáticos contenidos en su citoplasma son capaces de transformar (en un primer paso) la glucosa en ácido pirúvico. Para ello, glucosa y fructosa han de penetrar en el interior de la célula. Esta entrada se lleva a cabo mediante sistemas de transporte curiosamente caracterizados por una escasa afinidad por estos dos monosacáridos.

Una vez efectuada la entrada, el primer paso es la formación de ésteres (glucosa 6-fosfato, fructosa 6-fosfato, y fructosa 1,6-difosfato en este orden). Estas reacciones tienen como razón energética última conseguir enlaces ricos en energía gracias a la combinación de las moléculas de fosfato con ciertos radicales orgánicos. Estos ésteres servirán de sustrato para la obtención del fosfoenolpiruvato.

Finalmente la piruvatokinasa transformará el fosfoenolpiruvato en ácido pirúvico, compuesto con el que culmina la glicolisis (primera fase de la fermentación alcohólica). De esta forma, el conjunto de la glicolisis conduce a la formación de dos moléculas de piruvato por cada molécula de azúcar metabolizada.

Con posterioridad las células de levadura, en un proceso anaeróbico, actúan sobre el ácido pirúvico descarboxilándolo en una reacción principalmente orientada hacia la producción de etanol para regenerar el cofactor NAD<sup>+</sup>

consumido a nivel de gliceraldehído 3-fosfato. La descarboxilación del ácido pirúvico mediante piruvato descarboxilasa da como resultado acetaldehído, que será reducido enzimáticamente hasta etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa.

No obstante, no todas las moléculas de azúcar del mosto se metabolizan siguiendo la ecuación de Gay-Lussac, con obtención de dos moléculas de etanol y otras dos de dióxido de carbono sino que en función del metabolismo de las levaduras fermentativas, un determinado número de moléculas de azúcar van a ser degradadas por fermentación gliceropirúvica siguiendo la ecuación de Neuberger:

#### **Glucosa → Glicerina + Ácido pirúvico**

La glicerina es sin duda el producto secundario más importante de la fermentación alcohólica y su cantidad como subproducto depende en gran medida de la cepa de levadura. Ocasionalmente la glicerina se encuentra presente en la baya de uva como consecuencia de la acción del hongo *Botrytis cinerea* (Mülberger y Grohmann, 1962).

La formación de la glicerina está considerada como el resultado de la competencia por el NADH<sub>2</sub> entre las enzimas alcohol deshidrogenasa y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Así, las cepas que producen altos niveles de glicerol y las que producen poco presentan grandes diferencias en la actividad de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, mientras que las variaciones en la actividad de la alcohol deshidrogenasa son menores. La cantidad total de glicerina formada también se ve afectada por los aminoácidos (en aquellos medios deficitarios en tiamina se observa un descenso en la formación de la misma (Radler y Schütz, 1982), y por las variaciones de temperatura y concentración de cloruro sódico (Carvalheiro *et al.*, 1999).

Además de glicerina (en el vino será compuesto responsable de la suavidad y el aterciopelado), la fermentación gliceropirúvica va a generar ácido pirúvico, que será el origen de muchos productos secundarios de la fermentación y de muchos intermediarios biosintéticos.

### 1.6.1.2. Productos secundarios procedentes del ácido pirúvico

El ácido pirúvico como tal no se encuentra en cantidades apreciables en los productos fermentados. En el caso del vino sus niveles medios son de 80 mg/L, pero constituye el punto de partida para la formación de muchos productos secundarios como los ácidos orgánicos y los compuestos acetoínicos.

#### 1.6.1.2.1. Ácidos orgánicos

El vino presenta una gran diversidad de ácidos orgánicos, dentro de la cual no todos tienen la misma relevancia; así, algunos de estos ácidos (acético, succínico, málico, cítrico, y  $\alpha$ -cetoglutárico), que derivan directamente del ácido pirúvico por un funcionamiento limitado del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, pueden tener un efecto directo sobre las características organolépticas del producto acabado, e intervenir en el valor del pH del vino (Barre *et al.*, 2000).

Entre estos ácidos orgánicos, el succínico representa junto con la glicerina uno de los subproductos mayoritarios de la fermentación. Las concentraciones alcanzadas al final del proceso fermentativo son inferiores al gramo por litro y pueden representar de 0,3 a 0,5% de los azúcares fermentados (Oura, 1977; Mareca, 1983). Además, en sus estudios sobre el vino, Pasteur atribuye al ácido succínico propiedades sensoriales que influyen sobre el sabor del mismo.

El ácido acético se produce a lo largo del proceso de vinificación, y tanto éste como sus formas esterificadas son claves en la dimensión sensorial de cualquier vino. La formación de estos compuestos recae principalmente en las levaduras fermentativas de primera fase (*Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*) y en las de metabolismo respiratorio estricto (*Hansenula*, *Pichia*). Además, *Saccharomyces* puede producir pequeñas cantidades de acético bajo anaerobiosis. Esta síntesis se produce bien por descarboxilación oxidativa del ácido pirúvico e incorporación de coenzima A, o bien de forma simultánea a la formación de ácido fórmico (también a partir del ácido pirúvico y coenzima A), siendo el primer mecanismo el más aceptado (Suárez Lepe y Leal, 1992).

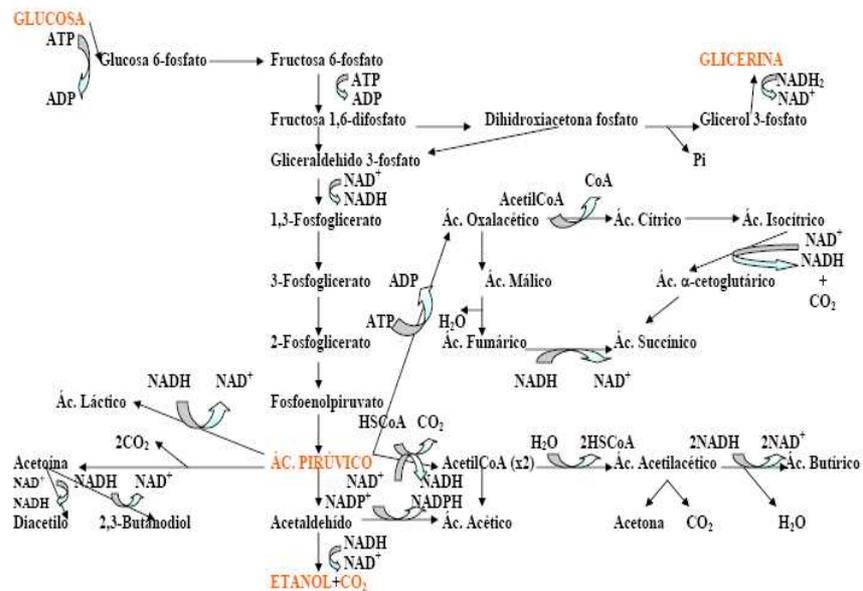
Finalmente, debe tenerse en cuenta que la acidez volátil del vino está ligada a la presencia de ácido acético. Esta acidez varía sensiblemente con las especies de levaduras que llevan a cabo la fermentación, y constituye, cuando es elevada, un

índice negativo en la apreciación organoléptica del vino porque provoca aromas picantes que recuerdan al vinagre.

#### 1.6.1.2.2. Metabolitos del ciclo diacetilo-acetoínico

Los cuerpos acetoínicos (acetoína, diacetilo, y 2,3-butanodiol) influyen directamente en el flavor del vino pudiendo el diacetilo, a elevada concentración, provocar defectos en el mismo al recordar en exceso a productos lácteos. La acetoína por su parte, es un compuesto producido por las levaduras (especialmente *Saccharomyces ludwigii*) durante la fermentación alcohólica. Su formación depende de la razón  $NAD^+/NADH$  y de la concentración intracelular de ácido pirúvico (Dittrich y Eschenbruch, 1968).

Se han propuesto tres vías de síntesis para la acetoína derivadas directamente de la etapa de descarboxilación del ácido pirúvico en acetaldehído (Romano y Suzzi, 1996). Esta reacción forma un intermediario muy reactivo, el complejo acetaldehído-tiamina-pirofosfato, que sirve de sustrato para las tres vías de síntesis de la acetoína. La formación de 2,3-butanodiol puede contribuir al equilibrio aromático general del vino (Shinohara, 1984).



**Figura 1.7.-** Esquema global del proceso de fermentación alcohólica (Fuente: adaptado de: Suárez Lepe y Leal, 1992 y García, 2002).

### 1.6.1.3. *Compuestos volátiles responsables del aroma*

Pasteur afirmaba en 1876: “Las cualidades del vino dependen en gran parte de la naturaleza específica de las levaduras que se desarrollan durante la fermentación de los mostos. Podemos pensar que si se sometiese un mismo mosto a la acción de levaduras distintas se lograrían vinos de distinta naturaleza”.

Esta afirmación sentó cátedra en el mundo de la enología llegando hasta hoy sin perder un ápice de validez. El aroma del vino es pues, el resultado de una larga secuencia biológica, bioquímica, y tecnológica. Debido a la gran cantidad de compuestos que intervienen en la formación del aroma del vino es casi imposible relacionar un determinado matiz con un compuesto específico, ya que estos aromas variados se refuerzan mutuamente o se enmascaran dando origen a los diferentes matices olfativos.

Si bien es cierto que el cuerpo del aroma se forma durante la fermentación del mosto por las levaduras, también hay que tener en cuenta la presencia de precursores en la uva antes de la fermentación; de ahí que de la amplísima gama de compuestos volátiles identificados en el vino, unos procedan de la uva y otros se sintetizan a lo largo de la fermentación (Nykänen, 1986; Herraiz, 1989).

En base a lo expuesto, a la hora de clasificar estos compuestos una opción es hacerlo en función de la procedencia del aroma del vino; para ello (Cordonnier y Bayonove, 1979) proponen la siguiente división:

- Aroma primario: es el formado por los compuestos procedentes de la uva junto con los que se generan durante su transformación en mosto.
- Aroma secundario: está constituido por los compuestos que aparecen durante la fermentación por acción de las levaduras y de las bacterias.
- Aroma terciario (Bouquet): se forma durante la conservación y añejamiento del vino.

Frente a esta clasificación clásica, la tendencia actual es la de hacerla de acuerdo con el proceso tecnológico al que se somete la uva, pues parece más lógico e interesante a la hora de explicar el aroma característico en los distintos tipos de vino. De esta forma la clasificación queda como sigue:

- Aromas varietales: procedentes de la uva, dependen esencialmente de la variedad aunque intervienen otros factores como el uso de fitosanitarios, el clima, etc.
- Aromas prefermentativos: se forman durante las etapas que van desde la vendimia hasta el principio de la fermentación alcohólica.
- Aromas fermentativos: formados por las levaduras durante la fermentación alcohólica y por las bacterias lácticas a lo largo de la fermentación malo-láctica, estos compuestos volátiles son los productos secundarios del metabolismo de estos microorganismos y están considerados los responsables de la nota vinosa común a todos los caldos.
- Aromas postfermentativos: se deben fundamentalmente a los procesos fisicoquímicos y biológicos característicos de la conservación y crianza del vino; dependen en gran medida de las condiciones en que realiza este proceso y de su modalidad.

A pesar de ser una clasificación propuesta por las razones anteriormente expuestas, está siendo muy discutida debido a que los límites entre los diferentes apartados no están totalmente definidos. Esto lleva a que algunos autores todavía sigan clasificando a los aromas en primarios, secundario, y terciarios en función de su procedencia.

Si entendemos por aroma aquella fragancia que provoca sensaciones agradables estamos excluyendo los olores desagradables producidos en ocasiones por levaduras y bacterias. Se trata de compuestos volátiles no deseados desde el punto de vista enológico, pero que el progreso de los conocimientos científicos ha permitido evitar o soslayar cuando quedan enmascarados por otras sustancias olorosas.

Así pues al centrarnos, ya en exclusividad, en los aromas fermentativos originados por el metabolismo de las levaduras vínicas podemos afirmar que los principales compuestos volátiles encontrados en los vinos como metabolitos microbianos son: alcoholes superiores, ácidos y ésteres orgánicos, aldehídos y otros compuestos carbonílicos, compuestos fenólicos, lactosas, e incluso terpenos y compuestos azufrados (Suárez Lepe, 1997).

Estos compuestos aparecen principalmente como productos secundarios durante la fermentación gliceropirúvica, particularmente los alcoholes, ésteres, y

ácidos volátiles. Alcoholes y ésteres son los de mayor importancia cuantitativa aunque su impacto en el aroma no es el mismo.

Así pues, mientras que los alcoholes individualmente no presentan un olor marcado (es en dilución cuando refuerzan el aroma), los ésteres (mayoritariamente los ésteres de ácidos grasos de cadena corta) contribuyen fuertemente al aroma de los vinos jóvenes aportando notas olfativas agradables que recuerdan a flores o a frutas.

Ahora bien, cuando la concentración de los alcoholes es muy elevada afectan negativamente al aroma del vino dotándolo de matices olfatorios y sápidos desagradables.

Los volátiles producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica varían, cuantitativa y cualitativamente, en función de las condiciones de la vinificación: composición del mosto (riqueza en azúcar de las uvas principalmente), condiciones de cultivo de la vid, cepa de levadura, temperatura, etc. (Moreno *et al.*, 1988; Edwards *et al.*, 1990; Mauricio *et al.*, 1997).

Las levaduras también pueden actuar sobre precursores no volátiles presentes en el mosto y ligados a la variedad, con formación de sustancias de gran importancia aromática. Así, una vendimia precoz origina mayor cantidad de alcoholes superiores y ácidos grasos volátiles de cadena corta con la consiguiente merma en la calidad sensorial de los vinos (Bertrand, 1980 Suresh y Ethiraj, 1987; Cabrera *et al.*, 1988; Suárez Lepe y Leal, 1992).

Otro parámetro que influye de manera importante en la producción de alcoholes superiores y ésteres es la oxigenación del mosto.

Cuando la fermentación del mosto se lleva a cabo sin oxigenación inicial del mismo, las levaduras producen menos cantidad de los citados compuestos.

Sin embargo, aunque producen menos, el ratio entre estos compuestos que queda finalmente en el vino es mejor que el que se conseguiría oxigenando el mosto antes de la fermentación.

La eliminación del oxígeno del mosto, por tanto, podría mejorar las características organolépticas del vino final (Valero *et al.*, 2002).

En la Tabla 1.4. se muestran algunos ejemplos de productos volátiles generados en la etapa fermentativa y de su aroma (Suárez Lepe, 1997).

**Tabla 1.4.-** Volátiles generados en la etapa fermentativa y su aroma (Fuente: Suárez Lepe, 1997).

Volátil	Aroma
Acetato de etilo	Barniz, picado
Acetato de 3-metilbutilo	Banana
Acetato de 2-feniletilo	Rosa, miel
Ácido acético	Vinagre, picante
Ácido hexanoico	Sudor, agrio
Ácido octanoico	Mantequilla rancia
Ácido 3-metilbutanoico	Sudor, podrido
Acetoína	Mantequilla
Diacetilo	Mantequilla
Dietil disulfuro	Goma quemada, cebolla podrida
Dietil sulfuro	Ajo, ajo podrido
Dimetil disulfuro	Membrillo, asparagina
Dimetil sulfuro	Col, col podrida
Etanol	Alcohol
Etiltiol	Caucho, goma
Hexanoato de etilo	Manzana, banana
Lactato de etilo	Leche agria
Octanoato de etilo	Piña, pera
Sulfuro de hidrógeno	Podrido, huevo podrido
2-feniletanol	Rosa marchita
3-metilbutanol	Crema de almendras, aceite de fusel
3-metiltio-1-propanol	Coliflor hervida

#### 1.6.1.3.1. Alcoholes superiores

La capacidad de producir alcoholes superiores es una característica general de todas las levaduras pero la cantidad varía en función del género, de la especie y de la cepa. Es además, un carácter hereditario y susceptible de ser usado en la mejora genética de las cepas (Giudici *et al.*, 1990).

Son producidos anabólicamente a partir de glucosa o catabólicamente a partir de aminoácidos presentes en el medio, posiblemente sintetizados por ellas mismas incorporando nitrógeno amoniacal a esqueletos de cetoácidos por transaminación, y con fines varios como la construcción de sus propias proteínas estructurales (Suárez Lepe, 1997).

Dentro de los alcoholes superiores destacan los siguientes:

- Alcoholes amílicos: 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol.
- Isobutanol.
- 2-feniletanol.
- 1-propanol.
- Isopropanol.
- 1-butanol y 2-butanol.
- 3-metil-1-pentanol y 2-metil-1-pentanol.
- E-3-hexenol y E-2-hexenol.
- Z-3-hexenol y Z-2-hexenol.
- Alcohol benzílico.
- Trazas de: 1-pentanol, 2-pentanol, 2-hexanol, 1-octanol, 2-octanol, 1-nonanol, 2-nonanol, 1-decanol, 2-decanol, etc

#### 1.6.1.3.2. Ácidos grasos y ésteres

Derivan todos del acetilCoA, que da lugar a los ácidos grasos por hidrólisis o a los ésteres etílicos de ácidos grasos y a los acetatos de alcoholes superiores por alcoholisis. Al estar sus biogénesis tan estrechamente ligadas, la mayor parte de los estudios dedicados a su impacto sobre el aroma de los vinos no han podido diferenciar sin ambigüedad la contribución específica de cada uno de estos compuestos en el mismo (García, 2002).

Se ha demostrado que los acetatos de los alcoholes superiores y los ésteres etílicos de los ácidos grasos contribuyen positivamente al aroma del vino. En esta línea, los estudios de la calidad del aroma de los vinos en relación con su contenido en ésteres, desarrollados por van der Merwe y van Wyk (1981) concluyeron que los acetatos son más importantes que los ésteres etílicos de los ácidos grasos para la intensidad y calidad del aroma de los vinos.

Dichos estudios arrojaron los siguientes resultados:

- De todos los acetatos, el acetato de isoamilo es el que contribuye al aroma del vino con mayor intensidad.

- El acetato de etilo no contribuye al perfil aromático cuando sus concentraciones se encuentran por debajo de 75 ppm, y lo hace de forma negativa a concentraciones superiores a 200 ppm.
- Los ésteres analizados, tanto en solitario como formando mezclas, no contribuyen a la intensidad o calidad del aroma.

El factor más importante en la formación de ésteres durante la fermentación son las levaduras. Su síntesis está directamente relacionada con el poder alcohólico de las mismas; de esta forma cuanto mayor es el poder alcohólico de la levadura, mayor es la producción de ésteres (Soufleros y Bertrand, 1979).

#### 1.6.1.3.3. Compuestos azufrados

El vino encierra una amplia gama de compuestos azufrados volátiles. Algunos, como el sulfuro de dimetilo, son constituyentes normales, pero otros surgen de anomalías y pueden dar lugar a olores desagradables (por ejemplo, el sulfuro de hidrógeno que huele a huevo podrido).

Las levaduras y bacterias vínicas necesitan azufre para sus procesos biosintéticos, formando parte de aminoácidos y proteínas, así como de vitaminas y coenzimas.

El azufre cuando aparece en el mosto procedente del espolvoreo directo de la uva o del empleo de fitosanitarios, lo hace en forma de coloide susceptible de ser fácilmente reducido hasta  $\text{SH}_2$ .

Cuando las fuentes de azufre son el  $\text{SO}_2$  añadido en bodega o los sulfatos inorgánicos del mosto, es el metabolismo microbiano el que se encarga de producir el sulfuro de hidrógeno. También se ha señalado una vía catabólica cuando falta nitrógeno amoniacal y las levaduras se ven obligadas a degradar proteínas. En este caso la formación del  $\text{SH}_2$  tiene lugar gracias a la actividad cisteína desulfhidrasa.

Por lo tanto, el origen del ácido sulfhídrico en el vino obedece a dos causas principales:

- Exógenas: por reducción del azufre proveniente de tratamientos fitosanitarios y/o del sulfuroso añadido en alguna etapa enotécnica.

- Endógenas: formación de SH<sub>2</sub> por algunas cepas de levaduras utilizando los iones sulfatos del mosto procedentes de la pulpa de uva, o mediante la actividad enzimática cisteína desulfhidrasa.

La formación de SH<sub>2</sub> a cargo de levaduras está básicamente bajo el control de los enzimas implicados en la reducción de sulfatos y la biosíntesis de metionina, según se comprobó en cervecería con *Saccharomyces carlbergensis* (Anderson *et al.*, 1975).

En cuanto a la producción de estos metabolitos durante la fermentación, y según señala Caldentey (1992), durante la primera fase se producen escasas cantidades de SH<sub>2</sub>, existiendo un máximo de producción que coincide con el dominio en el medio de levaduras de la especie *Saccharomyces ellipsoideus*, mientras que las especies que inician la fermentación dan origen a una mínima cantidad de SH<sub>2</sub>.

Además, el sulfuro de hidrógeno generado durante esta fase no crea grandes inconvenientes al ser arrastrado por el CO<sub>2</sub> desprendido.

Durante la fase de fermentación lenta, se produce una cantidad de CO<sub>2</sub> insuficiente para eliminar el SH<sub>2</sub>, el cual dará lugar a la formación de mercaptanos por esterificación con los alcoholes.

En la fase de contacto del vino con las lías, también se ha demostrado una formación adicional de sulfuro de hidrógeno, debido a la plasmolisis de las levaduras que permanecen en el vino. Tiene lugar la liberación del material citoplasmático cuyos componentes sulfurados, al encontrarse en un medio fuertemente reductor, originan la liberación de SH<sub>2</sub>.

Por otra parte, la capacidad de producción de sulfhídrico está determinada fundamentalmente por las características genéticas de la cepa de levadura. Zambonelli (1988) distingue el carácter SH<sub>2</sub> negativo de las levaduras, cuando poseen un sistema de control específico de la reacción de reducción de los sulfatos y son capaces de bloquearla en el momento que aparecen las primeras trazas de SH<sub>2</sub> en el medio. Este carácter se puede presentar también en cepas que presentan defecto genético a nivel de la enzima sulfito reductasa, siendo imposible la reducción de los sulfitos. García-Gómez (1987) investiga la influencia de distintas especies de levaduras sobre la producción de SH<sub>2</sub> en la fermentación en mostos de diferente composición respecto al contenido en aminoácidos azufrados.

Comprueba que los valores bajos de pH y temperatura, al igual que los periodos dilatados del proceso potencian la producción de sulfhídrico. También comprobó que la adición de 1-metionina en el mosto inhibe la producción de este ácido, y por el contrario la cisteína estimula su producción.

En la fermentación espontánea suele haber un predominio de cepas que producen SH<sub>2</sub> en cantidad media. Cuando la fermentación se realiza en presencia de SO<sub>2</sub> encontramos una concentración aproximadamente equivalente de medias y bajas productoras. Las cepas que no producen sulfhídrico generalmente son productoras más o menos importantes de SO<sub>2</sub>, y las que producen mucho sulfhídrico pueden dar lugar a compuestos sulfurados que provocan defectos en el aroma del vino.

### 1.6.2. Factores que afectan al proceso fermentativo

Los factores que influyen sobre el proceso fermentativo está directamente relacionado con la flora levaduriforme existente en cada hábitat, así como con la distribución de las distintas especies de levaduras. De esta forma, el control de las diferentes levaduras en cada una de las fases de la vinificación, no sólo tiene un significado ecológico sino que, es un indicativo de las posibles desviaciones de un proceso fermentativo normal. Conocer los problemas operativos es uno de los objetivos principales del control de la calidad vínica (Cavaza *et al.*, 1992; Fuguet *et al.*, 1999). Todo ello permitirá conocer las posibilidades enológicas reales que tiene el vino (Rankine, 1968; Ribéreau-Gayon, 1985).

#### 1.6.2.1. Antagonismo microbiano

Es un fenómeno que tiene tres variantes:

- Inhibición de las levaduras por las sustancias secretadas por otras levaduras o por otros microorganismos.
- Competición entre levaduras o entre levaduras y bacterias acidolácticas.
- Incidencia de *Botrytis cinerea* y otros hongos: los mostos poco ácidos de uvas atacadas de podredumbre fermentan lentamente debido, entre otros factores, a la presencia de un antibiótico (botrycina) segregado por el hongo (Suárez Lepe y Leal, 1992).

Entre estos mecanismos de competición entre levaduras se encuentra la producción de factores “killer”, toxinas matadoras de acción letal para una estirpe celular de la población de una misma especie o de otra diferente. Este factor “killer” se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza; dentro de las levaduras vínicas los géneros capaces de sintetizar dicho factor se encuentran en la Tabla 1.5. (Suárez Lepe, 1997).

**Tabla 1.5.-** Levaduras “Killer” (Fuente: Suárez Lepe, 1997).

Levaduras filmógenas	Levaduras fermentativas
<i>Candida</i> (Berkhout)	<i>Debaryomyces</i> (Lodder y van Rij)
<i>Metschnikowia</i> (Kamienski)	<i>Hanseniaspora</i> (Zikes)
<i>Cryptococcus</i> (Kützing)	<i>Kloeckera</i> (Janke)
<i>Hansenula</i> (H y P Sydow)	<i>Kluyveromyces</i> (van der Walt)
<i>Pichia</i> (Hansen)	<i>Saccharomyces</i> (Meyen, Rees)
<i>Zygosaccharomyces</i> (Nickerson)	<i>Torulaspota</i> (Lindner)
	<i>Torulopsis</i> (Berlese)

La toxina “killer” es producida durante la fermentación del mosto, y conserva su actividad durante todo el proceso aunque limitada por las condiciones ambientales. Una vez en el medio, la toxina bloquea los receptores glucosídicos de la pared celular de la levadura a nivel de los enlaces 1,6-D-glucano impidiendo la entrada de glucosa a la célula.

También actúa alterando los receptores de hidrógeno de la membrana celular, variando el potencial de membrana, y todo el metabolismo energético de la célula.

En toda población de un cultivo puro de una determinada especie de levadura existen a estos efectos cuatro tipos de células: las matadoras o productoras de la toxina, las sensibles (mueren bajo la acción de la toxina), las neutras (no producen toxina ni se afectan por ella) y las sensibles a su propia toxina o células suicidas.

Actualmente, la clasificación aceptada refleja 4 fenotipos diferentes: Killer (K) M+R+, Neutro (N) M-R+, Sensible (S) M-R-, y Suicida (s) M+R-; estando la actividad “killer” restringida en algunos casos a cepas emparentadas que se encuentren dentro de la misma especie, aunque hay casos de actividad entre

especies diferentes, como puede ser la inhibición de especies del género *Saccharomyces* a cargo de levaduras apiculadas. Así, este fenómeno “killer” permite explicar algunas dificultades encontradas en la fermentación de mostos inoculados con levaduras secas activas (LSA) (Ribéreau-Gayon, 1985; Suárez Lepe, 1997).

Por otra parte, las levaduras se desarrollan en la uva junto con otros hongos, bacterias lácticas, y bacterias acéticas en mayor o menor proporción según el grado de higiene mantenido durante la vendimia.

Así, en uvas que han sufrido podredumbre “vulgar” podemos encontrar, además de *Botrytis cinerea*, especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, y especies bacterianas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*.

La intervención de esta flora retrasa el comienzo de la fermentación, disminuye la actividad de las levaduras, y reduce la biomasa formada. De hecho, cuando se lleva a cabo una fermentación con diferentes mezclas de mostos procedentes de uvas sanas y de uvas con *Botrytis*, la fermentación es más lenta en aquellas mezclas que contienen una proporción alta de uva parasitada por *Botrytis* (Ribéreau-Gayon, 1985).

También se ha demostrado que en las fermentaciones de mostos infectados por *Botrytis*, la evolución de la flora levaduriforme comienza con un aumento muy marcado en la población de levaduras con escaso poder fermentativo (*Hanseniaspora*, *Candida*). Posteriormente la evolución del proceso las hará desaparecer frente a las cepas de *Saccharomyces* (Fleet *et al.*, 1984; Donéche, 1993).

En algunas ocasiones es recomendable la inoculación del mosto con bacterias ácido-lácticas una vez que se ha consumido todo el azúcar, de cara a favorecer la fermentación maloláctica. Sin embargo, cuando se inocula una cantidad importante de estas bacterias en una fermentación alcohólica débil, puede producirse una inhibición parcial de las levaduras, y una parada prematura de la fermentación dejando azúcares residuales.

#### 1.6.2.2. “Limitaciones” tecnológicas

Las condiciones de anaerobiosis dictadas por el depósito de grandes volúmenes de mosto en los tanques podrían inhibir la biosíntesis de esteroides y limitar los intercambios de la célula de levadura con el medio (Larue *et al.*, 1980).

De hecho (Ingledeew y Kunkee, 1985) demostraron que la fermentación de los mostos se ralentiza e incluso puede pararse cuando se elimina el oxígeno en las operaciones que van desde el prensado hasta la fermentación.

Dado que sólo se producen dos moléculas de ATP por cada una de glucosa metabolizada en condiciones anaerobias, la célula debe utilizar glucosa adicional a mayor velocidad para mantener el “pool” de ATP intracelular. Este aumento, mediante activación de la fosfofructoquinasa, en la velocidad de degradación de glucosa en ausencia de oxígeno se conoce como “efecto Pasteur”.

Dicho fenómeno se observa únicamente cuando las concentraciones de glucosa son bajas, aproximadamente 0,9 g/L (Walter, 1998). Sin embargo, si la concentración de glucosa es alta (más de 9 g/L), el efecto Pasteur en *Saccharomyces cerevisiae* se anula. A pesar de esto, el metabolismo fermentativo y la formación de etanol continuarán incluso con oxígeno disponible (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000), un fenómeno conocido como “efecto Crabtree”.

Desde el punto de vista de la vinificación, este efecto es muy importante (el NADH generado por la glicolisis se reoxida para la producción de etanol), ya que permite la fermentación en presencia de algo de oxígeno. Aunque presente en *Saccharomyces*, el efecto Crabtree no se observa en algunas levaduras no-*Saccharomyces* (Walker, 1998).

Cada mosto posee, desde su extracción, una fermentabilidad propia que depende de la variedad de uva, las condiciones de cosecha y grado de madurez, y sobre todo del tratamiento de la uva en la bodega (Lafon-Lafourcade *et al.*, 1980).

Un prensado mecánico y rápido genera mostos con una fermentabilidad mediocre. El mosto obtenido del prensado delicado de la uva tiene buenas características de fermentación procedentes del leve contacto con la piel de la baya de uva (Ribéreau-Gayon, 1985).

#### 1.6.2.3. Estimulación de la fermentación alcohólica

Cuando los mostos con un contenido en azúcar moderado o normal quedan empobrecidos en levaduras y nutrientes a raíz de un desfangado severo, el uso de activadores suele favorecer una multiplicación rápida, aumentando así la población de levaduras. También aumenta su potencial enzimático y la velocidad

de fermentación. En consecuencia, se alcanzará el grado alcohólico deseado en función de los azúcares iniciales y de la cepa de levadura.

En cuanto a la naturaleza de los activadores, muchos de ellos son factores de crecimiento, que se definen como sustancias indispensables para la multiplicación celular y que las levaduras no pueden sintetizar. La adición de estos activadores suele ser más efectiva antes de que comience la fermentación, ya que de esta forma se puede acortar la fase de latencia.

Si se añaden en plena fermentación son poco eficaces generalmente, y casi sin efecto cuando la población se encuentra en fase de declive.

Además de los activadores, también se puede hablar de factores de supervivencia, o sustancias cuya adición al medio es susceptible de prolongar la actividad metabólica de las células no proliferantes. Al igual que los activadores favorecen la multiplicación de las levaduras en el mosto, los factores de supervivencia mantienen la viabilidad de las poblaciones en fase de declive. De esta manera, el metabolismo fermentativo se prolonga y la fermentación se lleva a cabo de forma completa.

La adición de levaduras al mosto aumenta la concentración celular y, al principio, acelera la velocidad de fermentación; pero la razón principal de esta práctica reside en la posibilidad de aumentar la cantidad de azúcar fermentado utilizando cepas de levaduras seleccionadas que toleran altas concentraciones de etanol.

Esta tolerancia al alcohol está perfectamente descrita para *Saccharomyces bayanus* y para algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, y puede mejorarse mediante el tipo de precultivo de las levaduras. Está demostrado que en mostos inoculados con la misma cepa de *S. cerevisiae*, la fermentación es mucho más rápida y completa en aquellos mostos en los que *S. cerevisiae* fue precultivada de forma aerobia que en los que la levadura se precultivó anaeróbicamente.

Este hecho se puede explicar gracias al papel que juega el oxígeno en la producción de esteroides por parte de las levaduras (Larue, 1978; Larue *et al.*, 1980).

Dichos esteroides son necesarios para el crecimiento anaeróbico de las levaduras. No obstante, en la vinificación el mosto se airea durante su extracción y, posteriormente es inoculado con levaduras salvajes debido al contacto con los utensilios y equipos de la bodega, teniendo un desarrollo aerobio para finalmente producirse la fermentación anaerobia.

En estas condiciones de anaerobiosis, la adición de ergosterol no produce aumento de la población. Sin embargo, la viabilidad de las levaduras durante la fase de declive aumenta de dos a diez veces, lo que conlleva la degradación de una mayor cantidad de azúcar. Si la fermentación se desarrollase de forma aerobia, el ergosterol se comportaría como un inhibidor (Ribéreau-Gayon, 1985).

Por otro lado, al estudiar la multiplicación celular en función de la composición del mosto se observa que las vitaminas, auténticos factores de crecimiento, tienen una influencia decisiva en el crecimiento y desarrollo de las levaduras durante la fermentación. Biotina, piridoxina, tiamina, ácido pantoténico, y ácido nicotínico, suplementadas en concentraciones de décimas de miligramo por litro acortan la fase de latencia favoreciendo los fenómenos de proteosíntesis (Suárez Lepe y Leal, 1992).

Además de las vitaminas y las sales amoniacales (activador clásico), existen otras sustancias que también se muestran activadoras de la fermentación: productos intermediarios de la fermentación alcohólica (ácido pirúvico y acetaldehído), los propios extractos de levaduras hidrolizadas, los polvos de micelio de ciertos hongos, y el activador de Nielsen (preparado a partir de cultivos de *Aspergillus niger*) (Suárez Lepe, 1999).

Finalmente, el interés en estos activadores de fermentación/ factores de supervivencia reside en su acción sobre la población responsable de la degradación del remanente final de azúcar, y podrían servir en la prevención de paradas prematuras de la fermentación.

La higiene de los equipos de la bodega es un factor que puede fomentar o inhibir, en las distintas fases de la fermentación, el desarrollo de una microflora levaduriforme compuesta tanto por géneros de metabolismo fermentativo, como de metabolismo oxidativo. Estas últimas presentan una gran diversidad de especies y una frecuencia de aislamiento inusual, pudiendo influir considerablemente en la calidad final del vino (Angulo *et al.*, 1993).

#### 1.6.2.4. Inhibición de las levaduras

Azúcar y etanol están implicados en el mecanismo de inhibición de las levaduras. Elevadas concentraciones de azúcar en el mosto ralentizan el crecimiento mientras que la acumulación de etanol en la célula de levadura inicia la parada de la fermentación (Navarro y Durand, 1978; Strehaiano *et al.*, 1978; Lafon-Lafourcade *et al.*, 1979).

Este efecto inhibitorio del azúcar puede explicarse por el aumento en la acumulación de producto final (etanol) en la célula. La tolerancia real de las levaduras depende, por tanto, de su capacidad para excretar al medio el etanol producido (Strehaiano y Goma, 1983).

Por su parte, Thomas y Rose (1979) en sus estudios con *Saccharomyces cerevisiae* sugirieron una posible relación entre la tolerancia al etanol y la composición de la membrana celular de la levadura (principalmente en esteroides y ácidos grasos insaturados).

Bajo condiciones de vinificación se observa lo siguiente (Larue *et al.*, 1982):

- Una variación relativamente débil en la concentración intracelular de etanol.
- En presencia de esteroides (ergosterol, ácido oleanólico,...), la concentración de etanol es dos veces más alta con una mayor cantidad de azúcar fermentado.
- Ausencia de ácido pirúvico celular y acetaldehído, lo que pone de manifiesto la actividad de las enzimas carboxilasa y alcohol deshidrogenasa.

Sin embargo, la concentración celular de glucosa de la población de levaduras sigue disminuyendo durante la fase de proliferación. Al final de la fase de declive, la transformación del azúcar del mosto en etanol atestigua el funcionamiento de las enzimas, mientras que la ausencia de glucosa intracelular muestra que la penetración de azúcar es suficiente sólo para cubrir la actividad de estas enzimas.

De acuerdo con estos resultados, bajo condiciones de vinificación, el enlentecimiento de la fermentación podría ser debido esencialmente a la dificultad de entrada del azúcar.

Como se expuso en el apartado anterior, los esteroides son indispensables como factores de supervivencia frente a las condiciones de fermentación del mosto de uva. Intervienen en la regulación del estado fisiológico de la membrana celular, afectando a la naturaleza de los fosfolípidos que contribuyen a la estabilidad de la misma (Larue, 1978; Larue *et al.*, 1980; Ribéreau-Gayon, 1985).

A lo largo de la fermentación, la concentración de esteroides en las levaduras desciende rápidamente durante la fase de proliferación y, posteriormente a ésta, siguen descendiendo de forma más lenta. La parada en el crecimiento y la ralentización de la fermentación coinciden con el agotamiento de los esteroides celulares (Ribéreau-Gayon, 1985).

La adición de esteroides al mosto aumenta la concentración intracelular de los mismos, e incrementa la viabilidad de la población y la velocidad de la fermentación. Una deficiencia en esteroides celulares podría ser indicativo de una alteración en la membrana, que podría explicar las dificultades en el intercambio entre la célula y el medio.

El etanol tiene un claro efecto inhibitorio sobre las levaduras, aunque se sabe que algunas deficiencias nutricionales también intervienen. La influencia de los ácidos grasos producidos por las levaduras en el poder de fermentación de medios ricos en azúcar tiene un significado práctico importante.

#### *1.6.2.5. Inhibición de las levaduras por plaguicidas*

Uno de los inhibidores exógenos de la fermentación es la presencia de algunos plaguicidas, sobre todo fungicidas de amplio espectro. Por ello, a continuación vamos a resumir la influencia de los mismos en la vitivinicultura.

## 1.7. PLAGUICIDAS Y VITIVINICULTURA

### **1.7.1. Plagas y enfermedades de la vid**

Junto con la poda y la fertilización, el control de las enfermedades de la vid constituyen los pilares en los cuales se sustenta la producción vitícola rentable. De nada vale un eficaz combate de malezas, un esmerado trabajo de suelo, una correcta fertilización o un sistema de poda racional, si se descuida la sanidad de

las cepas. Es más que evidente que los factores culturales mencionados influyen en el índice productivo del viñedo, pero el mayor peso específico reside en la buena salud de las plantas. Basta recordar que un ataque intenso de peronóspora (*Plasmopara viticola*) al racimo puede, en cuestión de horas, llevarse un elevado porcentaje de la futura cosecha, para comprender la enorme importancia que tiene el aspecto sanitario del viñedo (Ferraro, 1983).

Entre las principales plagas (insectos, ácaros y nematodos) y enfermedades que afectan al cultivo de la vid cabe destacar, por su importancia y repercusión económica en España, en primer lugar los lepidópteros, en segundo lugar las enfermedades criptogámicas (Mildiu y Oidio) y, finalmente, las podredumbres, en especial la ácida.

Aunque existen varias especies de lepidópteros que pueden conocerse como “polillas del racimo” (*Eupoecilia ambiguella*, *Cryptoblabes gnidiella*, *Argyrotaenia pulchellana*, etc), la especie *Lobesia botrana* Den. y Shiff. posee actualmente en la Península una predominancia absoluta sobre todas las demás. Es relativamente reciente, entrando en Cataluña a finales del siglo XIX y extendiéndose progresivamente por todo el país en la primera mitad del XX (Coscollá, 1992).

Además de como “pollilla del racimo” también se la conoce como “hilandero”, “coco”, “gusano de las uvas”, y “cuc del raïm” y, aunque se presenta en casi todas las regiones, la gravedad de la plaga está muy ligada a las condiciones climáticas, por lo que es variable según lugares y años. Así, es especialmente importante en toda la costa mediterránea y atlántica, teniendo gran incidencia en la zona de Jumilla.

Se considera uno de los principales parásitos, tanto por su extensión geográfica como por la magnitud económica de las pérdidas que origina, ya que a los daños directos causados por sus larvas hay que añadir los indirectos, con frecuencia más importantes, al abrir vías de penetración a la podredumbre del racimo (Coscollá, 1992; Reynier, 2002).

Inverna en estado de crisálida, bajo la corteza de las cepas o en las hendiduras de la madera. Con el inicio de la primavera las crisálidas se transforman en mariposas, que vuelan a partir de la puesta del sol. Durante los vuelos, machos y hembras se aparean.

Tras la fecundación, las hembras depositan los huevos aisladamente sobre los botones florales. El tiempo que tardan en eclosionar depende de la temperatura, oscilando entre 6 y 15 días. Después, las orugas unen las inflorescencias con hilos de seda, atacando las flores a lo largo de sus estadios larvarios, y abandonándolas finalmente para pupar bajo la corteza, sobre los bordes de las hojas o en el suelo (Reynier, 2002).

El Mildiu o peronóspora es una enfermedad originaria de América del Norte, apareciendo en Europa en 1878. Es producida por un hongo, *Plasmopora viticola* (Berl y de Toni), que se desarrolla sobre todos los órganos verdes: hojas, racimos (antes, durante y después de la floración), sarmientos herbáceos y rara vez en las yemas (Ferraro, 1983; Reynier, 2002).

Generalmente se la conoce por “mildiu”, “mildeo” o “mildeu”, aunque también como “niebla” o “añublo”.

Se caracteriza por la aparición, en las hojas de unas zonas translúcidas, como manchas de aceite, que se aprecian en el haz. En el envés y correspondiéndose con éstas, se observa luego una mancha blanca y brillante, formada por una pelusilla (la fructificación del hongo), que se extiende y acaba por producir la completa desecación de la hojas (Carrero y Planes, 1989).

En los racimos, puede darse el ataque sobre el pedúnculo, pero donde más frecuentemente se manifiesta la enfermedad es sobre las bayas; bien recién formadas, en cuyo caso las uvas afectadas se recubren de un polvo blanco denominado *Rot gris*; bien verdes pero ya desarrolladas, donde aparecen manchas blanquecinas que después se oscurecen y se secan (*Rot pardo*) (Reynier, 2002).

Cuando ataca los sarmientos herbáceos (no los leñosos o agostados), se observan manchas pardo-rojizas superficiales, que se alargan y rodean el sarmiento impidiendo su maduración completa y provocando finalmente su desecación (Carrero y Planes, 1989).

El Mildiu también puede manifestarse en las yemas axilares, que adquieren una tonalidad castaño oscuro hasta secarse. Su contaminación tiene lugar a través del nudo o por el pecíolo de la hoja (Ferraro, 1983).

Suele producirse en regiones en las que el clima es cálido y húmedo durante el periodo de crecimiento vegetativo. La ausencia de lluvia en primavera y verano limita el desarrollo de la enfermedad, así como temperaturas muy bajas durante

la primavera. Es necesario que la temperatura se eleve hasta 18-22<sup>o</sup> C, y que el porcentaje de humedad oscile entre el 90 y 95%.

El Oidio, enfermedad también oriunda de América del Norte, hizo su aparición en Europa (concretamente en Inglaterra) en 1845. Es producida por el hongo *Uncinula necator* Burr., que se desarrolla en todos los órganos herbáceos de la vid.

Recibe distintos nombres comunes según las regiones: "ceniza", "cenicilla", "polvillo" y "sendreta" entre otros, y está ampliamente extendida en España, donde casi siempre hace acto de presencia (Pérez de Obanos, 1992).

En las hojas, ataca tanto la cara superior como la inferior, observándose en ambos casos un polvillo blanco ceniciento que puede limitarse a algunas zonas o bien ocupar toda la superficie de la hoja; debajo del polvillo se aprecian puntitos necrosados.

A veces, los comienzos del ataque se manifiestan como manchas de aceite en el haz, que recuerdan a las del Mildiu, pero que suelen ser más pequeñas y nunca muestran la típica pelusilla blanca en el envés, apreciándose en cambio punteaduras pardas (Ferraro, 1983; Pérez de Obanos, 1992).

En brotes y sarmientos muestra manchas difusas de color verde oscuro, que conforme se extienden y definen adquieren tonos pardos y negruzcos cuando el brote se endurece.

Aún así, los daños más importantes se localizan en racimos, pues los ataques fuertes ocasionan la detención del crecimiento de la piel, siendo frecuente que ésta se agriete y las bayas revienten, dejando aparecer las pepitas. Así se producen daños directos en la cantidad y calidad de la cosecha, y otros indirectos al favorecerse la penetración del hongo *Botrytis cinerea* Pers., causante de la podredumbre gris (Pérez de Obanos, 1992; Reynier, 2002).

Al igual que el Mildiu, temperatura y humedad son muy importantes para su desarrollo. Sin embargo, mientras que para el primero la conjunción de ambos factores es decisiva, para el Oidio la humedad juega un rol meramente secundario. Desde luego que la misma ejerce una acción favorable para el desarrollo del parásito en su comienzo, pero una vez que el hongo infesta la planta, puede desarrollarse y difundirse aún con tiempo cálido y seco. Claro está

que, cuando ambos parámetros se suman, el Oidio se manifiesta con mayor virulencia y causa daños más severos (Ferraro, 1983).

La podredumbre ácida es una enfermedad antigua, citada en los viñedos de Sauternes por Capus en 1899. Está presente en numerosos países; Estados Unidos, Chile, Italia y España, y en muchas regiones de Francia: Midi, Sauternais y Alsacia, entre otras. Se localiza a menudo en los mismos viñedos, siendo la manifestación de la unión de diferentes organismos vivos del agro-ecosistema vitícola: la vid, las levaduras, las bacterias, las “drosofilas”, los nematodos, las avispa...y el hombre (Reynier, 2002).

Se desarrolla en el curso de periodos cálidos y húmedos, sobre uvas que presentan heridas, interviniendo por una parte, levaduras y bacterias acéticas que transforman el medio celular de la pulpa, y por otra, la “mosca del vinagre” o “drosofila”, que utiliza este medio para poner huevos y permitir el desarrollo de sus larvas.

Las levaduras y bacterias pasan el invierno en el suelo, y aparecen en los racimos a partir del envero, transportadas por el polvo y sobre todo por los insectos, principalmente por las moscas del vinagre (*Drosophila melanogaster* Meigen). *Saccharomyces ellipsoideus* y *Kloeckera apiculata* son las principales levaduras presentes en los racimos sanos. Complementan la flora bacterias lácticas y acéticas. Sobre los racimos con podredumbre ácida, se encuentran *Kloeckera apiculata*, pero también otras levaduras que tienen la capacidad de producir acetato de etilo y acetaldehído: *Metschnikowia pulcherrima*, *Candida diversa*, *Candida stellata*. Estos microorganismos se multiplican activamente desde que entran en contacto con el medio azucarado de las bayas, desencadenando una serie de fermentaciones y alteraciones que conducen a la producción de ácido acético.

De este modo, la enfermedad origina daños directos en los racimos; uvas con estado sanitario defectuoso, aspecto poco atrayente y fuerte olor a vinagre, e indirectos en mostos y vino; acidez volátil elevada y fermentación con población de levaduras diferente a la habitual. Normalmente estos vinos de alta acidez volátil se destinan a la producción de vinagres (Toledo, 1992; Reynier, 2002).

### 1.7.2. Origen y evolución de los plaguicidas

En el momento en que el hombre abandona su sistema de vida nómada y se transforma en sedentario, alrededor del 8.000 a.C., aparece la agricultura como principal fuente de obtención de alimentos, y directamente relacionada con ella, tiene lugar la aparición de plagas y enfermedades en los cultivos.

Enfermedades del trigo, tales como royas o tizón aparecen mencionadas en el Antiguo Testamento y en las literaturas griega y romana. Teofrasto de Ereu (372-286 a.C.), colega de Aristóteles y discípulo de Platón escribió más de 200 tratados, destacando su "Historia plantarum" y "De causis plantarum". Otros autores de esta época como Varron (116-27 a.C.); precursor de la escarda química, y Columela; nacido en Cádiz durante el reinado de Augusto o Plinio el Viejo (23-79 d.C.) contribuyeron en gran medida al inicio del conocimiento de la Fitopatología (Carrero, 1996).

Pero tras la ingente labor realizada por los grandes maestros agrónomos griegos y romanos, las causas que originan las enfermedades no empiezan a comprenderse desde un punto de vista científico hasta el siglo XVIII.

Aún así, el máximo interés por el conocimiento de tales causas despierta como consecuencia de diversos desastres acontecidos durante el siglo siguiente.

Entre 1845 y 1848, el Mildiu de la patata (*Phytophthora infestans*) destruyó en Irlanda casi la totalidad de la cosecha, provocando la muerte de gran cantidad de personas y un flujo de emigración obligado.

El Sur de Europa tampoco se libró del ataque de los hongos. A principios de 1850, el Oidio empezó a atacar los viñedos de Francia, Italia y Austria. Las cosechas llegaron a disminuir en pocos años hasta un 80%. En consecuencia, los viñedos fueron abandonados y los agricultores tuvieron que emigrar. Muchos franceses se asentaron en territorios norteafricanos; Italia pasó de ser exportadora a importadora, y los cerveceros alemanes y austriacos aprovecharon la coyuntura para establecer sus fábricas en Turín y Milán. España, que fue menos afectada por el ataque, duplicó sus exportaciones de vino. Junto a ello, poco después de la epidemia de Oidio, otra nueva calamidad se abatió sobre los viticultores: La filoxera, que se introdujo en Europa procedente de América hacia 1860. Este insecto produjo daños de tal gravedad a la industria vinícola francesa, que

algunos autores han llegado a afirmar que las pérdidas fueron superiores a las producidas por la guerra de 1871 (Oliva, 1998).

Ambos ejemplos, forman parte de las muchas catástrofes que originaron las plagas en todo el mundo desde que se implantó la agricultura como medio de subsistencia, y explican que, a partir de esta época, comience el desarrollo de métodos de lucha.

Así, en la amplia revisión bibliográfica llevada a cabo por Fernández (2004) encontramos que, mientras las malas hierbas seguían controlándose mediante los tradicionales medios agrícolas, labores de arado y escarda, empiezan a utilizarse los primeros preparados a base de azufre y cobre para luchar contra las enfermedades criptogámicas. Homero, en sus obras "La Iliada" y "La Odisea", cita el azufre como elemento purificador, y ya en la Primera Centuria de la Era Cristiana se utilizaba este elemento en aplicaciones dermatológicas.

Sin embargo, es a finales del siglo XIX (1880) cuando se empiezan a utilizar los fungicidas de forma racional y estudiando sus efectos. No obstante, no se avanza mucho hasta cincuenta años más tarde, cuando se redescubren el azufre y, paralelamente el cobre como fungicidas.

Asimismo, los compuestos arsenicales (con más inconvenientes que ventajas, aunque desconocidos entonces), siguieron cronológicamente a los de azufre y cobre en el combate contra insectos y hongos.

De esta forma, según esta autora, puede afirmarse sin temor a equívocos, que la era moderna en lo referente a la lucha contra plagas comienza con el descubrimiento de las propiedades insecticidas del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano) por Müller en 1939.

Desde entonces ningún insecticida ha sido aplicado tan masivamente como éste. La malaria fue erradicada del Sur de EE.UU. y de regiones endémicas del Sur de Europa (España, Grecia, Italia y Yugoslavia) y, durante la Segunda Guerra Mundial, su utilización evitó la propagación del tifus gracias a su efectivo control de los piojos.

Simultáneamente, en 1942, tiene lugar el descubrimiento en Francia e Inglaterra del insecticida HCH (hexacloro-ciclohexano) y, en 1943, se sintetizan los primeros herbicidas fenoxiacéticos. En este mismo periodo, Schröder da origen

a los primeros compuestos organofosforados y se comprueba la acción sistémica de algunos de ellos.

Durante esta etapa, el avance en la investigación y consecución de nuevas sustancias plaguicidas se produce con gran dinamismo debido, entre otras causas, al interés dedicado a la producción de productos tóxicos con fines bélicos. Se sintetizan los carbamatos y ditiocarbamatos, de acción insecticida y fungicida, y los herbicidas bupiridílicos diquat y paraquat. Les siguen las ftalimidias, los triazoles, las fenilaminas y los fenilpirroles, hasta llegar en 1994 a las anilinoimidinas, y en 1996 a las estrobirulinas, todos con actividad fungicida.

Actualmente, aunque la lucha contra plagas y enfermedades se dirige hacia lo que se conoce como control integrado de plagas, definido en la Directiva 91/414/CEE (DOCE, 1991) como: "La aplicación racional de una combinación de medidas biológicas, biotecnológicas, químicas, de cultivo o de selección de vegetales, de modo que la utilización de productos fitosanitarios químicos se limite al mínimo necesario para mantener la población de plaga en los niveles inferiores a los que producirían daños o pérdidas inaceptables desde un punto de vista económico", se sigue contemplando la utilización de plaguicidas. Eso sí, este tipo de lucha tiende hacia un concepto más ecológico de la protección vegetal, integrando aquellos factores no químicos susceptibles de limitar el desarrollo de los enemigos del cultivo, para mantener su actividad por debajo del umbral de daños económicamente aceptable (Fernández, 2004).

### **1.7.3. Persistencia y disipación en los cultivos**

El contexto o marco ideológico que FAO/OMS propone para los estudios del comportamiento de los residuos de plaguicidas en cultivos o alimentos son los denominados "ensayos supervisados", que se orientan hacia el establecimiento de Límite Máximo de Residuos (LMRs).

Se realizan comprobando el proceso por el que pasa un plaguicida para que finalmente su uso sea autorizado en determinados cultivos, contribuyendo también al conocimiento de las dinámicas en que su disipación transcurre, a lo largo de un tiempo determinado, para establecer los tiempos de seguridad correspondientes.

Estos ensayos se realizan en experiencias de campo con la aplicación del plaguicida en condiciones controladas y conocidas como la localidad, que será una zona típica de producción; especie y variedad del cultivo; condiciones agroecológicas; modo de aplicación; dosis y formulación; número y tipo de aplicación; métodos de muestreo representativo y programa fitosanitario, entre otras variables. La selección de estas condiciones permite una interpretación adecuada de los resultados obtenidos y a veces extrapolaciones del comportamiento del residuo a otros cultivos (DG SANCO, 7525/VI/95-rev.8, 2008).

Estas experiencias se deben efectuar con aplicaciones lo más tardías posibles, con el mayor número de éstas que se recomiende en el uso del plaguicida, a las dosis más altas y teniendo en cuenta el menor plazo de seguridad que está estudiándose. Se trata de que las condiciones sean realmente similares a la práctica agrícola habitual, pero lo más desfavorables posible para sobreestimar por seguridad los residuos en los cultivos.

Además estos ensayos deben repetirse en diferentes localidades, al menos cuatro veces para los cultivos mayores y como mínimo en dos temporadas de producción, para que sean más representativos (DG SANCO, 7525/VI/95-rev.8, 2008).

Por tanto se puede pensar que los ensayos supervisados de residuos exigidos a los productores de fitosanitarios para autorizar oficialmente el uso de un plaguicida y fijar su LMR, queda sujeta a una sobrestimación importante y además con sesgos, porque tampoco cuatro ensayos son representativos de todas las situaciones posibles en agricultura, incluyendo las diferentes condiciones climatológicas entre regiones.

Los ensayos supervisados de residuos durante los plazos de seguridad, no sólo sirven para establecer los LMR, sino que también se puede procesar estadísticamente la información generada en ellos, en cuanto a niveles de residuos en relación al tiempo, para establecer las curvas de degradación o disipación de los residuos en el cultivo. Estas curvas permiten conocer la cinética del comportamiento de los residuos durante la fase agrícola, con la posibilidad de anticipar en qué momento se cumplen los LMR, establecer diferentes plazos de seguridad, conocer el depósito inicial y la vida media de los residuos y

determinar su velocidad de disipación en el cultivo. Son conocidos como “estudios de disminución de residuos” y normalmente esta información sólo se exige en la autorización de un producto fitosanitario cuando éste se aplica en cultivos con parte consumible directamente por el destinatario final (DG SANCO, 7525/VI/95-rev.8, 2008).

Los estudios de disipación de residuos son ensayos en los que normalmente se muestrea en cinco ocasiones diferentes, dos de las cuales son normalmente fechas fijas: el día de la aplicación (en caso de ser múltiple, se debe tomar después de la aplicación final) y en el momento de la cosecha. Esta manera de realización del ensayo es la habitual pero también se pueden hacer estudios de disminución de residuos “a la inversa”, recomendados especialmente cuando el intervalo pre-cosecha o plazo de seguridad se presupone relativamente largo, basándose en los estudios de la sustancia activa realizados con anterioridad para el registro y los datos disponibles similares. En este tipo de estudios, se tratan parcelas vecinas según diferentes intervalos pre-cosecha y en el momento de la cosecha se muestrean todas las parcelas a la vez, obteniendo una progresión de los niveles de residuos con el tiempo pero a la inversa del método tradicional (DG SANCO, 7525/VI/95-rev.8, 2008).

A pesar de que estas experiencias suponen mayores costes de ensayo y análisis, este tipo de estudios tiene varias ventajas sobre la obtención única de valores de residuos en el momento de la cosecha, en el sentido de que ofrecen la oportunidad de evaluar el comportamiento del residuo durante un periodo de tiempo y además con la curva de disipación obtenida es posible hacer una estimación relativamente fiable de los residuos en el momento de la cosecha, por ejemplo, mediante la identificación de valores anómalos y/o conocer la importancia de los factores que influyen en la disminución relativa de los residuos tales como el crecimiento de la planta y los efectos del clima. Asimismo, hacen posible el seguimiento de los depósitos iniciales (DG SANCO, 7525/VI/95-rev.8, 2008).

Estos estudios son particularmente importantes y necesarios cuando se tiene que determinar un plazo de seguridad porque no se puede extrapolar de datos anteriores. La Comisión Europea recomienda que en estudios con un plazo de seguridad previsto de 3 días, se debe tomar muestra a los 0 y 3 días como mínimo.

Cuando el plazo es entre 4-7 días, se puede establecer 3 tomas de muestra. Sólo en algunas circunstancias específicas (especialmente en sustancias sistémicas que son tomadas por las raíces) puede ser necesario tomar muestras más allá del plazo de seguridad propuesto. Si un producto fitosanitario se utiliza varias veces durante la temporada de crecimiento de un cultivo, se recomienda que la primera muestra se tome inmediatamente antes de la aplicación final, para poder determinar la influencia de las aplicaciones anteriores en el nivel de residuos.

La experiencia ha demostrado que, en algunos casos, el conocimiento obtenido a partir de 2-3 valores de residuos en la cosecha, procedentes de diferentes ensayos, puede ser comparable con la obtenida a partir de un único estudio de disminución de residuos (DG SANCO, 7525/VI/95-rev.8, 2008).

Los aspectos que determinan la disminución de residuos en estos estudios son las características de persistencia, o en su aspecto opuesto, la disipación de un producto en un cultivo para un ámbito agrícola determinado. La tendencia hacia la persistencia o la disipación de los residuos viene determinada por la velocidad de disipación y los niveles iniciales. La velocidad de disipación es el resultado de las velocidades de las reacciones de degradación ambientales que experimenta el residuo (generalmente elevadas o rápidas), las reacciones de metabolización (generalmente bajas o lentas), los mecanismos de transporte medioambientales y las características del plaguicida (mecanismo de acción y propiedades fisicoquímicas) que lo hacen propicio para unos u otros procesos (Seiber, 2001). El depósito inicial viene determinado fundamentalmente por la forma de aplicación del preparado (dosis, número de aplicaciones y tipo de formulado), las condiciones ambientales y las características externas del sustrato. En suma, la disipación de los residuos es consecuencia de la interacción de tres sistemas, planta-residuo químico-ambiente.

La disipación de los residuos del plaguicida en el vegetal se produce fundamentalmente por cinco procesos (Coscollá, 1993; Celik *et al.*, 1995; DG SANCO 4145/2000, 2002; Whitmyre *et al.*, 2004):

- Volatilización a la atmósfera.
- Arrastre de los residuos del vegetal por precipitaciones, viento, etc.
- Degradación por la incidencia de la luz en la superficie, temperatura, humedad.

- Metabolización vegetal: principalmente se dan reacciones hidrolíticas, fotoquímicas y redox.
- Metabolización microbológica.

Entre las características del plaguicida que determinan la facilidad para que se produzcan estos procesos, se pueden citar (Coscollá, 1993; Montemurro *et al.*, 2002):

- Coeficiente de partición (Kow) del plaguicida. En sustratos vegetales de naturaleza lipófila, la penetración aumenta con la liposolubilidad del ingrediente activo.
- Volumen molar y estructura molecular. Ciertas estructuras tienen mayor facilidad de penetración en el fruto por determinados transportes moleculares o radicales, como por ejemplo los grupos amida que se hidrolizan fácilmente.
- Tensión de vapor de la sustancia. A menor tensión, mayor facilidad para evaporarse.
- Formulación del plaguicida. Normalmente los tensoactivos favorecen la penetración.
- Grado de esparcimiento del plaguicida. Cuanto más extendido esté, más superficie de penetración.
- Mecanismo de acción. Los plaguicidas de contacto, a diferencia de los sistémicos, están más expuestos a las degradaciones ambientales y por tanto la penetración es menor.

Las condiciones ambientales más influyentes son (Coscollá, 1993; Antón, 2004):

- Temperatura. Es un factor de degradación y volatilización.
- Humedad. Es un factor de degradación.
- Lluvias y viento. Producen el arrastre o derivas a otros medios como aguas superficiales, suelos y atmósfera. Igualmente, el viento favorece el fenómeno de volatilización, ya que renueva las capas de aire en torno a las plantas, impidiendo que éstas se saturen con el vapor del plaguicida.

También influyen las características del vegetal (Coscollá, 1993):

- Tasa de crecimiento.
- Dilución provocada por el crecimiento del vegetal.
- Naturaleza del vegetal. De hoja, cítricos, desecados, etc.
- Composición del vegetal.
- Forma, volumen, peso y superficie.
- Estructura y composición química de su cutícula, epidermis y parénquima (lisa, cérea, pilosa, porosa, etc.).

El resultado integral de estos procesos se expresa cinéticamente y en general, como una primera disminución rápida seguida por otra más lenta, conocido como una disipación en dos fases o bicompartimental, formada por una etapa de disipación rápida en la superficie del cultivo y otra de persistencia lenta en el interior (DG SANCO 4145/2000, 2002; Whitmyre *et al.*, 2004). Este tipo de cinética ha sido estudiada por diversos autores en profundidad, intentando ajustar los datos experimentales a ecuaciones lineales, no lineales y modelos mecanísticos. Sobresalen los trabajos realizados por los equipos de Timme y Walter, quienes propusieron un programa informático para ajustar estas cinéticas a ecuaciones de regresión de primer orden logarítmicas en base 10; de orden 1,5; de segundo orden y funciones de raíz de primer, 1,5 y segundo orden (Timme y Frehse, 1980; Timme *et al.*, 1986; Walter *et al.*, 1993). Sin embargo, se puede afirmar que en la mayoría de los estudios, este tipo de cinéticas sigue ecuaciones exponenciales, obtenidas por inferencia de su correspondiente ecuación de regresión lineal de pseudo-primer orden [ $\ln$  Concentración = f (Tiempo)] a partir de los datos experimentales, mediante el método de mínimos cuadrados (DG SANCO 4145/2000, 2002; Martínez-Galera *et al.*, 2003; López-López *et al.*, 2004; Abreu *et al.*, 2006).

Habitualmente una cinética bifásica es exponencial, sobre todo para plazos de seguridad largos (más de treinta días) en los que da tiempo a observar las dos fases (Generalitat Valenciana, 2001; Martínez-Galera *et al.*, 2003), aunque es posible también observar cinéticas lineales cuando la disipación esté marcada más por las degradaciones rápidas que por los procesos de metabolización y transporte.

Análogamente, en los plazos de seguridad cortos (hasta un mes), la disipación suele seguir cinéticas lineales de primer orden, observándose un modelo de disipación monofásico o monocompartmental, produciéndose una disipación rápida en la superficie del cultivo debido a las reacciones de degradación. Estos modelos se investigan en la disipación de plaguicidas en suelos, follaje, cultivos al aire libre y en invernadero (Willis y Mc Dowell, 1987; Coscollá, 1993; Miliadis *et al.*, 1994; Beulke y Brown, 2001; Montemurro *et al.*, 2002; Martínez-Galera *et al.*, 2003; López-López *et al.*, 2004; Antonious, 2004; Juraske *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008).

No obstante, se debe asumir que el estudio de las cinéticas es de las cuestiones más complejas en el conocimiento de un proceso biológico, puesto que se pretende modelizar matemáticamente algo que no siempre sigue un patrón constante.

Para el posterior establecimiento del riesgo, actualmente se comprueba un marcado interés científico por aquellos estudios de disminución o desaparición de residuos bajo condiciones de uso agrícola en la práctica; interesando más los datos de residuos que abarcan todas las rutas de pérdida que los estudios centrados en el metabolismo vegetal. Además, hay un gran interés en conocer la desaparición en las primeras semanas después de su aplicación, lo que ofrecerá datos de la disipación del producto en el medio vegetal. Por lo tanto, los valores de tiempo de disipación medio (DT50) u otros descriptores de la disipación, como el tiempo de vida media, deben ser derivados de este intervalo de tiempo, no de periodos posteriores (Antonious y Snyder, 1994; Brouwer *et al.*, 1997; DG SANCO 4145/2000, 2002; Antonious, 2004; Li *et al.*, 2008).

En este sentido, Willis y McDowell, publicaron una revisión de aproximadamente 450 valores de DT50 para 81 plaguicidas en un amplio espectro de alimentos de origen vegetal (gramíneas, cereales, cultivos forrajeros, algodón, hortalizas, tabaco, follaje de árboles frutales), resultando la media de valores de DT50 y las desviaciones estándar para el total de residuos (Willis y Mc Dowell, 1987):

- Organoclorados:  $5.8 \pm 6.0$  días.
- Organofosforados:  $3.3 \pm 2.6$  días.
- Carbamatos:  $2.7 \pm 1.2$  días.

- Piretroides:  $5.9 \pm 5.0$  días.

Incluso los propios autores informaron que debido al plan de muestreo, estos valores podían estar sobreestimados. Por tanto, esto indica que la desaparición de los residuos en el material vegetal es de forma global bastante rápida, incluso en el caso de que los residuos sean persistentes en otros medios (DG SANCO 4145/2000, 2002).

#### **1.7.4. Persistencia y degradación de los plaguicidas en la cadena agroalimentaria**

La Estrategia Global de Inocuidad de los Alimentos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se proponía como meta reducir el impacto social y de salud de las enfermedades de transmisión alimentaria, incluyendo los residuos químicos (OMS, 2002). Establecía tres líneas de actuación principales:

- Promover y apoyar el desarrollo de sistemas sostenibles e integrados de inocuidad de alimentos fundamentados en riesgos.
- Formular medidas fundamentales en ciencia a lo largo de toda la cadena de producción alimentaria que prevengan la exposición a niveles inaceptables de agentes microbiológicos y de productos químicos en los alimentos.
- Evaluar y gestionar los riesgos de transmisión alimentaria y transferir información, en cooperación con otros sectores y aliados.

En concreto, FAO/OMS establecen que las preocupaciones sobre los riesgos alimentarios se centran en general, por motivos científicos y sociológicos, en los residuos de plaguicidas, los riesgos microbiológicos, utilización inadecuada de los aditivos alimentarios, presencia de otros contaminantes químicos, adulteración de los alimentos, organismos modificados genéticamente, presencia de alérgenos, residuos de medicamentos veterinarios y hormonas que promueven el crecimiento de la producción animal (FAO/OMS, 2003). En este sentido, expertos de la OMS advierten que el vehículo de exposición de plaguicidas más importante son los alimentos, responsables de un 90% de las exposiciones, frente a un 10% por agua (OMS, 2002).

Además FAO/OMS establecen los criterios para conseguir esta inocuidad de los alimentos y garantizar por tanto la seguridad alimentaria, recogiendo aspectos como (FAO/OMS, 2003):

- Lograr la máxima reducción de riesgos aplicando el principio de prevención en la medida de lo posible a lo largo de toda la cadena alimentaria.
- Considerar el continuo “de la granja a la mesa”.
- Establecer procedimientos de emergencia para hacer frente a riesgos particulares (por ejemplo retirada de productos).
- Establecimiento de estrategias de control de los alimentos de base científica.
- Establecimiento de prioridades basadas en el análisis de riesgos y en la eficacia en la gestión de riesgos.
- Establecimiento de iniciativas distintas e integradas que tengan en cuenta los riesgos y efectos del bienestar económico.
- Reconocimiento de que el control de los alimentos es una responsabilidad ampliamente compartida que requiere la interacción positiva entre todas las partes interesadas.

Por tanto, el control de residuos de plaguicidas a lo largo de toda la cadena agroalimentaria, tanto en producción como en transformación, es fundamental para establecer los riesgos derivados de la exposición a los alimentos. No basta con el cumplimiento de los LMRs a través de los programas oficiales de control de alimentos, sino que el control de residuos se debe hacer también en el producto transformado que le llega al consumidor para derivar actuaciones futuras.

De hecho, las autoridades internacionales como FAO y OMS, inciden en la importancia de promover sistemas nacionales de control de los alimentos que estén basados en principios y directrices de carácter científico y que abarquen todos los sectores de la cadena alimentaria para que la producción, manipulación, almacenamiento, elaboración y distribución sean inocuos, sanos y aptos para el consumo humano y cumplan los requisitos de inocuidad y calidad, de acuerdo con las disposiciones de la ley.

Los estudios de persistencia y disipación de residuos de plaguicidas durante la etapa de producción y transformación de alimentos agrícolas se enmarcan en los objetivos anteriores en cuanto a la protección de la seguridad alimentaria.

Con el cumplimiento de los LMRs, controlados por las autoridades sanitarias y agrícolas nacionales e internacionales, propuestos por la Comisión para Residuos de Plaguicidas del Codex Alimentarius, se aseguran niveles de ingestión inferiores a los niveles máximos admisibles respecto de la toxicidad del producto activo y a la proporción del alimento fresco en la dieta normal. Pero se necesita conocer el destino de los residuos de plaguicidas durante el procesamiento de los alimentos básicos para una estimación más realista de la ingesta alimentaria de los plaguicidas, lo que ayudaría a formular directrices normativas para la gestión de los residuos en dichos productos fijando o reevaluando niveles máximos para su garantía y control de calidad.

#### **1.7.5. Efectos derivados del uso de plaguicidas en viticultura**

Como ya se ha mencionado en epígrafes anteriores, la utilización de productos fitosanitarios en agricultura es un hecho irrefutable, y desde luego, la viticultura no escapa a esta regla. Incluso la lucha integrada, donde se tienen en cuenta auxiliares biológicos, prevé el empleo de los plaguicidas marcando unos límites de aplicación por lo nocivos que puedan ser estos productos. Su uso es necesario para la obtención de una vendimia cualitativa y cuantitativamente correcta (Giraudon *et al.*, 2000).

Ahora bien, de la aplicación de fitosanitarios se desprenden una serie de consecuencias que hay que tener en cuenta. Tal vez la mayor preocupación al respecto corresponde a los problemas de orden toxicológico, bien directamente porque entrañan un riesgo para el consumidor o indirectamente por el perjuicio que puedan ocasionar al medio ambiente (De Cormis, 1991). Así pues, se citan como efectos más inmediatos los siguientes:

- Contaminación ambiental.
- Presencia de residuos en uvas, mostos y vinos.
- Influencia en la fermentación y características organolépticas de los vinos.

- Efecto toxicológico sobre el consumidor.

#### 1.7.5.1. Contaminación ambiental

El uso continuado de plaguicidas y su incorporación al suelo, puede plantear problemas de acumulación de residuos afectando incluso a plantas y organismos beneficiosos. Estos residuos llegan al suelo bien por la aplicación directa, en tratamientos de desinfección, o bien por deriva de la aplicación a la planta (arrastre por aguas de lluvia o riego, viento, etc.).

En el suelo, el producto queda sometido a procesos de inactivación más o menos intensos, cuya velocidad depende de factores como la naturaleza del plaguicida y del suelo, la climatología y, por supuesto, las faenas de laboreo agrícola.

En efecto, una de las formas de desaparición de los plaguicidas en el suelo es su arrastre por lluvias o aguas de riego. Sin embargo, este hecho beneficioso para el terreno teóricamente contaminado, es por el contrario una fuente de contaminación potencial de aguas subterráneas y superficiales. En otros casos, la temperatura y las condiciones de iluminación permiten la volatilización del compuesto.

En cuanto a la naturaleza del fitosanitario, es importante conocer su movilidad y tiempo de vida media (tiempo necesario para que el depósito de materia activa se reduzca a la mitad) para mantener controlado el residuo. Así por ejemplo, maneb, fungicida ditiocarbámico muy empleado en viticultura, presenta una permeabilidad de menos de 13 cm y un  $t_{1/2}$  de 4 semanas.

Por otro lado, la conjunción de las características del suelo (pH, materia orgánica, naturaleza de los coloides, humedad, microflora y microfauna), y las propiedades fisicoquímicas del plaguicida (grupo químico, densidad, punto de fusión, solubilidad, etc.) además de las prácticas culturales que se realizan en el cultivo (Khan, 1980; Navarro García *et al.*, 1992), condicionan en gran medida la presencia durante más o menos tiempo del residuo en el suelo. También es necesario considerar la degradación química o metabólica del producto, ya que en algunos casos, el metabolito resultante puede ser tanto o más tóxico que el original y no siempre valorable por el método analítico empleado para el producto inicial.

En general, los plaguicidas utilizados en la defensa fitosanitaria de la vid presentan una escasa movilidad en el suelo, y rara vez penetran más de 30 cm. Su degradación aumenta al hacerlo la materia orgánica y los productos de metabolización suelen ser, en la mayoría de los casos, menos tóxicos que el original. Incluso la etilentiourea, compuesto carcinogénico derivado de la degradación de los etilenbisditiocarbamatos, posee una mínima persistencia debido a su rápida transformación en etilenurea (Cabras *et al.*, 1987).

Expuestos estos argumentos, se podría afirmar que dada la breve persistencia de estos plaguicidas en el suelo y su relativa inmovilidad, las posibilidades de acumulación y contaminación en suelos y acuíferos del subsuelo son mínimas, siempre y cuando se apliquen de forma apropiada, siguiendo las normas especificadas por las casas comerciales.

#### 1.7.5.2. Residuos en uva, mosto y vino

Durante el ciclo vegetativo de la vid y especialmente entre el envero y la maduración, el viticultor emplea toda una gama de plaguicidas; insecticidas, fungicidas, herbicidas, etc. Aquellos que son penetrantes y/o sistémicos presentan mayor probabilidad de encontrarse después en el zumo de la uva y, posteriormente, en el vino. Los que son de contacto, se quedan en la superficie de las bayas y pueden dejar residuos sobre todo cuando son utilizados poco antes de la vendimia. Esta es la razón por la que las autoridades imponen un plazo de seguridad (tiempo entre el último tratamiento fitosanitario y la vendimia) en función de la persistencia del producto (Giraudon *et al.*, 2000). Es decir, la detección de mayor o menor concentración de residuos en uvas, mostos y vinos depende fundamentalmente del plaguicida empleado (naturaleza del producto, formulado, dosis, plazo de seguridad), aunque también influyen factores tan poco controlables como el clima (Coscollá, 1993; Celik *et al.*, 1995; Pimentel, 1997; Montemurro *et al.*, 2002; Whitmyre *et al.*, 2004).

Los datos experimentales disponibles ponen de manifiesto que si los productos fitosanitarios se emplean tal y como indican los fabricantes, no deben aparecer residuos superiores a los establecidos por la legislación en el momento de la vendimia.

Si la uva recolectada va a ser utilizada en vinificación, es transportada a la bodega, donde comienza la elaboración del vino mediante procesos enotécnicos como: estrujado, escurrido, maceración, prensado, desfangado, fermentación alcohólica, trasiego, clarificado, estabilización y filtrado. En este sentido, el tipo de vinificación y la correcta utilización de los procesos enotécnicos pueden influir de manera decisiva en la desaparición o eliminación de los residuos de plaguicidas.

Una extensa revisión bibliográfica demuestra que se producen importantes pérdidas de residuos de plaguicidas en el paso de uva a mosto y de éste a vino. Es importante señalar la influencia de la velocidad de disipación de los residuos en el cultivo en su posible presencia en el vino; por otra parte, los procesos enológicos son factores muy importantes en la desaparición de los residuos de fungicidas en el vino. Finalmente, la técnica de vinificación con o sin maceración, adición de taninos, criomaceración, etc., influyen también en la desaparición o disminución de los residuos de fungicidas (García y Xirau, 1994; Navarro *et al.*, 1997; Cabras *et al.*, 1997; Flori *et al.*, 2000; Angioni *et al.*, 2003; Ruediger *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2006, 2007a y 2007b).

En este sentido, estudios de acumulación de iprodiona, procimidona y vinclozolina en uvas, tras realizar tres tratamientos con los correspondientes formulados comerciales, a intervalos de un mes y siguiendo las normas de aplicación, muestran concentraciones de 1,01; 0,78 y 0,37 ppm respectivamente; todas dentro de los límites máximos permitidos por la ley (García y Xirau, 1994). Ensayos similares, manifiestan la rápida disipación de plaguicidas en uva incluso cuando se utilizan dosis mayores a las recomendadas. Así por ejemplo, los tiempos de vida media de ciproconazol y quinalfos oscilan entre 3-4 días y 2-3 días respectivamente (Papadopoulou-Mourkidou *et al.*, 1995). Sin embargo, el tratamiento de uvas con insecticidas y fungicidas sin respetar los plazos de seguridad, conduce a altos contenidos iniciales de residuos en los mostos, aunque también hay que apuntar que durante el proceso de elaboración (desfangado y fermentación alcohólica principalmente), las concentraciones disminuyen drásticamente, situándose por debajo de los niveles establecidos (Guasch *et al.*, 1995).

Además, es importante señalar que los residuos que aparecen en las uvas (no siempre se localizan en los hollejos) también pueden encontrarse en la pulpa o, incluso, en ambas partes del grano. Así, Alonso-Allende (1981) comprueban que, a lo largo de la maduración, productos antibotánicos experimentan un aumento de sus niveles residuales en la pulpa y, por consiguiente, una disminución en los hollejos.

Otros ensayos, en este caso con herbicidas, ponen de manifiesto que tras 28 días de estudio siguen detectándose residuos tanto en uvas tintas como blancas, pero iniciada la vinificación, únicamente norfluzaron persiste en los niveles iniciales, mientras que el resto de productos (oxifluorfen, oxadiazon y trifluralin) se degrada durante la fermentación (Guang-Guo y Williams, 1999).

En cuanto a insecticidas no sistémicos como teflubenzuron, (Tsiropoulos *et al.*, 1999) observan que en uvas blancas y durante 49 días, la concentración de plaguicida se sitúa en torno a 0,89 mg/kg, se mantiene en mosto, y desaparece casi por completo tras el centrifugado del mismo.

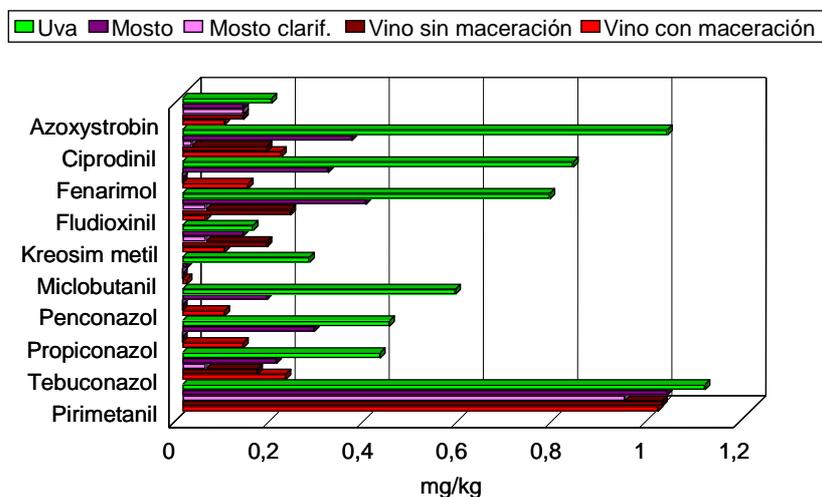
Kresoxim-metil y tetraconazol no dejan residuos detectables en bayas transcurridos 21 días de su aplicación. Otros como, azoxistrobin, fluazinam y mepanipirim (el más persistente de los cinco ensayados) sí aparece en las uvas, aunque sus niveles residuales disminuyen en los mostos, mucho más en los obtenidos en las vinificaciones con maceración (0,12 frente a 0,20 ppm de azoxistrobin en mostos con y sin maceración respectivamente). En cuanto al proceso de clarificación estática de los vinos resultantes, únicamente en presencia de carbón se produce una eliminación total de residuos (Cabras *et al.*, 1998).

Cuando el tratamiento en campo se realiza con quinoxifen, fungicida para el control del Oidio, se detectan en uvas recogidas tras la aplicación del producto concentraciones de 0,38 mg/kg (inferiores al LMR establecido en Italia; 0,5 mg/kg). Catorce días después, los niveles residuales han disminuido hasta 0,09 mg/kg.

Tras el prensado de la vendimia, únicamente se encuentra en el mosto el 45% de los residuos presentes en las bayas. Si éste se somete a centrifugación, desaparece el 8% de su concentración residual, no detectándose en vinos al final del proceso fermentativo (Cabras *et al.*, 2000).

En general, se puede afirmar que todas las investigaciones realizadas en el campo de la vitivinicultura evidencian la gran influencia que tienen los procesos enotécnicos en la eliminación de residuos de plaguicidas.

Así, sirvan como ejemplos algunos estudios donde se ha comprobado cómo los residuos de fungicidas como pirimetanil en uva se mantienen en el mosto y vino, y se reducen al 50% para tebuconazol; sin embargo otros fungicidas como fludioxinil y kresosim-metil, reducen sus contenidos al 50% en el mosto y se eliminan prácticamente en el vino acabado (Figura 1.8) (Cabras y Angioni, 2000).



**Figura 1.8.-** Influencia de los procesos enotécnicos en la desaparición de residuos de fungicidas (Fuente: Cabras y Angioni, 2000).

Algunos autores señalan que el estrujado de las uvas no afecta a la desaparición de fungicidas como azoxistrobin, ciprodinil, fludioxinil, pirimetanil y quinoxifen (Cabras *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 2005). Después del prensado, los residuos de penconazol, vinclozolina o fenarimol aparecen en mayor porcentaje unidos al orujo.

Sin embargo, también existen fungicidas como metalaxil que permanece en un alto porcentaje en el mosto, debido a su alta solubilidad en disoluciones hidroalcohólicas (Navarro *et al.*, 1999).

La mayoría de los fungicidas que aparecen en mosto, se degradan durante la fermentación, o bien son eliminados junto a los fangos cuando se realizan

operaciones de desfangado y trasiego. Las operaciones de estabilización de los vinos, clarificación y filtración procuran peores resultados, aunque en muchos casos participan de forma considerable, especialmente cuando se emplean para el clarificado productos como bentonita, carbón, gelatinas o PVPP, entre otros (Rudy y Scholten, 1997; Guang-Guo y Williams, 1999; Tsiropoulos *et al.*, 1999; Fernández *et al.*, 2001a y 2002).

Igualmente, la utilización de determinados medios como filtros de nylon, pueden influir de manera notable en la desaparición de algunos plaguicidas (Cabras *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 2005a; Oliva *et al.*, 2007a y 2007b).

Así por ejemplo, al eliminar las heces en suspensión del mosto, bien dinámica (centrifugación) o estáticamente (con o sin clarificantes) se pierde el 90% de azufre, el 70% de ftalimidas o el 40% de fungicidas dicarboximídicos, mientras que los productos solubles en agua permanecen en el mosto; debemos tener en cuenta, que la solubilidad en agua de la mayoría de los plaguicidas, es baja. Otros productos como los benzimidazoles tampoco son eliminados en el proceso anterior, pero sí lo hacen mediante tratamientos con bentonita como clarificante. Por último, el filtrado de los vinos antes del embotellado tiene algún efecto, aunque mínimo, en la eliminación de residuos (Navarro, 2000c; Soleas y Goldberg, 2000; Ruediger *et al.*, 2004).

Comparando la evolución de los residuos cuando se realiza la vinificación por procedimientos tradicionales frente a maceración carbónica, se observa mayor concentración remanente en este último proceso; posiblemente debido a que al permanecer intactas las uvas durante más tiempo no se produce el paso de los plaguicidas de las bayas a la fase líquida y no se producen reacciones de degradación. Sin embargo, después del prensado, las cantidades residuales en el mosto de la maceración carbónica son sensiblemente menores.

Estudiando la desaparición de los funguicidas benalaxil, metalaxil, ciproconazol, fenarimol, penconazol, vinclozolina y mancozeb, en procesos de vinificación tradicional frente a la realizada por maceración carbónica, se constata que los remanentes residuales en los vinos obtenidos por esta última técnica, son entre cinco y diez veces inferiores a los obtenidos con el proceso tradicional. El producto con la menor velocidad de desaparición es metalaxil (Navarro *et al.*, 2000a).

En el caso de vinificación tradicional, durante el proceso de maceración se mantienen porcentajes remanentes comprendidos entre 67-95% (para fenarimol y metalaxil, respectivamente). En el prensado se produce la primera disminución importante de los niveles residuales, quedando reducidos a valores medios del 30% del inicial en el orujo; destacando que el plaguicida que presenta una mayor desaparición es mancozeb. En la fermentación, los cambios son menores. En las lías se mantienen remanentes comprendidos entre 8 -17%. Finalmente la clarificación y el filtrado completan la desaparición de los residuos (Navarro *et al.*, 1999).

En el estudio de la desaparición de algunos fungicidas en uva Tempranillo en la Rioja, a lo largo del proceso de vinificación, se observó el diferente comportamiento que presentan los fungicidas ensayados (Tabla 1.6.). Así, en el proceso de maceración y fermentación, procimidona y vinclozolina se comportan de forma análoga; carbendazima no se elimina y diclofuanida desaparece en un 70-80%. Durante las operaciones de trasiego y clarificación las diferencias son mucho menores, y en la clarificación destaca diclofuanida que desaparece totalmente. Las pérdidas de los residuos de estos fungicidas durante el proceso de vinificación, oscilan entre el 50 y 100% (Santos, 1997).

**Tabla 1.6.-** Disminución de residuos en uva Tempranillo (Fuente: Santos, 1997).

**Tabla 1.6.-** Disminución de residuos en uva Tempranillo (Fuente: Santos, 1997).

Proceso	P	V	I	C	D
Maceración, fermentación y prensado	15%	12%	30-40%	--	70-80%
Trasiego	25%	45%	18-20%	30-40%	20%
Clarificación	12%	13%	20%	25-30%	100%
<b>Total</b>	<b>52%</b>	<b>70%</b>	<b>70-80%</b>	<b>55-70%</b>	<b>100%</b>

P: procimidona; V: vinclozolina; I: Iprodiona; C: carbendazima; D: diclofuanida.

El estudio de la evolución de los residuos de cuatro fungicidas (ciprodinil, fludioxonil, pirimetanil y quinoxifen) a lo largo del proceso de elaboración de tres vinos tintos (tinto tradicional, tinto con maceración carbónica y tinto de larga maceración y prefermentación a baja temperatura) y dos vinos sin maceración (rosado y blanco) mostró que, en vinificaciones sin maceración, fludioxinil es el

fungicida con mayor disipación a lo largo del proceso y en cada uno de las fases del mismo, mientras que pirimetanil es el de menor disipación en casi la totalidad de los casos (con y sin maceración). Por otro lado en las vinificaciones con maceración carbónica, la disipación de ciprodinil es la mayor de todos los principios ensayados, tanto de forma global como en cada una de las etapas de la vinificación (Fernandez *et al.*, 2005).

Otro estudio investiga la influencia que dos levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Kloeckera apiculata*) y dos bacterias lácticas (*Leuconostoc oenos* y *Lactobacillus plantarum*) tienen en la degradación de seis fungicidas (azoxistrobin, ciprodinil, fludioxonil, mepanipirim, pirimetanil y tretraconazol) durante la fermentación alcohólica y maloláctica. Los resultados obtenidos nos indican que sólo se produce degradación durante la fermentación alcohólica para el fungicida pirimetanil (descensos del 20-40% de la concentración del control a los 10 días de fermentación). Para los otros cinco fungicidas, la fermentación alcohólica no produce una eliminación, ni por degradación o por adsorción en las levaduras.

Tampoco las bacterias estudiadas muestran un efecto degradante sobre los fungicidas durante la fermentación maloláctica (Cabras *et al.*, 1999).

También se ha comprobado que el contenido de cobre en la uva y posterior transferencia al mosto y vino está influenciado por el número de aplicaciones, el periodo entre la aplicación y la vendimia, y la cantidad de cobre aplicada. Del total de muestras de vino analizadas en 16 bodegas italianas, el 18 % excedían el LMR establecido (20 mg/kg). Por lo tanto, se requiere que el plazo de seguridad pase de 20 a 40-50 días. Además, este estudio muestra que el contenido en cobre no depende de la estrategia de control de plagas (convencional, integrada u orgánica). De los tres factores expuestos, el más importante es la cantidad de cobre aplicada, ya que ésta implica alrededor del 50% de las concentraciones finales en uva y vino (García-Esparza *et al.*, 2006).

Otros investigadores estudiaron el posible efecto de los procesos de fermentación alcohólica en los niveles de arsénico total y sus especies inorgánicas [As (III) y As (V)] y orgánicas (ácido monometilarsónico [MMA] y ácido dimetilarsónico [DMA]) en 45 vinos del Sur de España. Los niveles de arsénico total fueron muy similares para los distintos tipos de vinos estudiados, sus valores en las muestras de vino analizadas oscilaron entre 2,1 y 14,6 µg/L.

Los resultados sugieren que el consumo de estos vinos no tiene una contribución significativa en la dieta de arsénico total e inorgánico para un bebedor moderado (Herce-Pagliai *et al.*, 2002).

En lo referente a la influencia del tiempo y temperatura de almacenaje de los vinos, existe un estudio que propone la creación de una ecuación basada en un análisis cinético que nos permita predecir la concentración de carbamato de etilo en vino después de un tiempo de almacenaje a una temperatura determinada. Con ella podemos predecir el momento de consumo para que los niveles de carbamato de etilo no superen ciertos niveles, que pudieran producir una toxicidad crónica para el consumidor (Hasnip *et al.*, 2004).

Estudios sobre el comportamiento de fenhexamida en la uva, durante la vinificación y el efecto de la microflora de la fermentación alcohólica y maloláctica en la degradación de este principio activo, muestran que la eliminación de este fungicida durante la vinificación depende de que el proceso se realice con o sin maceración. Así cuando no hay maceración, se produce una eliminación del 49% mientras que con maceración es del 62%. Por lo tanto la presencia del hollejo en contacto con el mosto durante un cierto tiempo produce un aumento en la eliminación del fungicida estudiado. No se observa efecto de las levaduras y bacterias de la vinificación en la degradación de fenhexamida (Cabras *et al.*, 2001).

Cuando estudiamos la eliminación de famoxadona durante la vinificación, nos encontramos que se produce una eliminación del 100% del fungicida en vinificaciones con y sin maceración.

Así, partiendo de niveles en uva vendimiada próximos a su LMR (2 mg/kg) se alcanzan en vinos niveles inferiores a su límite de cuantificación (0,05 mg/Kg) (De Melo Abreu *et al.*, 2006).

La eliminación de espiroxamina se ve afectada por la realización o no de maceración. Así cuando se vinifica sin maceración la eliminación se sitúa entre el 20-27%; mientras que para vinos obtenidos con maceración la eliminación aumenta hasta el 45-62%. El factor de transferencia entre uva y mosto fue de 0,55 por lo que la mitad del fungicida se elimina unido a las partes sólidas de la uva; en el caso de uva a vino fue de 0,26. En general, la eliminación de los residuos de espiroxamina oscila entre el 23-56%, dependiendo de la técnica de vinificación utilizada. Después de un tratamiento bajo buenas prácticas agrícolas no se

encuentran niveles en vino superiores al 10% de su LMR, por lo que no existe riesgo toxicológico en los vinos obtenidos con uvas tratadas con espiroxamina (Tsiropoulos *et al.*, 2005).

Por último, únicamente mencionar que si la uva no es destinada a la producción de vino sino a consumo en fresco o pasificada, la cinética del plaguicida es diferente, por lo que se hace necesario conocer la transformación del producto en la planta, el tiempo de comercialización de la uva fresca, la degradación en las cámaras frigoríficas y el proceso de pasificación (al sol o en hornos) (Cabras *et al.*, 1998a; Marín, 2000).

#### 1.7.5.3. Influencia en la fermentación y características organolépticas del vino

Entre los numerosos factores que influyen sobre la evolución de la flora levaduriforme durante la fermentación cabría destacar por su importancia la presencia de residuos de plaguicidas, ya que éstos pueden alterar las rutas bioquímicas de la fermentación debido a su efecto sobre reacciones de síntesis o a la inhibición de la respiración. Como consecuencia, puede producirse una caída progresiva de la viabilidad de población levaduriforme y un retardo de la fermentación, que en casos muy graves podría conllevar la parada total del proceso (Girond *et al.*, 1989; Frezier y Dubordieu, 1991; Doignon y Rozes, 1992; Hatzidimitriou *et al.*, 1997; Oliva *et al.*, 2000; García, 2002).

En este marco, se ha demostrado que la presencia de 10 ppm de Cu, inhibe de forma significativa el crecimiento de la especie *S. cerevisiae*, mientras que, preparados minerales de S, que no resultan altamente nocivos para las levaduras, confieren malos sabores a los vinos cuando su concentración es elevada (Monteil *et al.*, 1986; Úbeda *et al.*, 1996).

En cuanto a fungicidas orgánicos, podemos apuntar que algunos benzimidazoles como el benomilo tienen una acción muy leve sobre determinadas levaduras, aunque especies como *Zygosaccharomyces fermentati*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Rhodotorula glutinis* se ven inhibidas incluso a concentraciones muy bajas de este producto. Otros fungicidas del mismo grupo como carbendazima o metil-tiofanato no ejercen influencia alguna sobre las levaduras o si lo hacen es a dosis muy elevadas (Gnaegi y Aerny, 1984; Zabala *et al.*, 1992; Quesada, 1994).

Sin embargo, fungicidas como diclofuanida, captan y folpet sí que tienen un efecto muy marcado sobre el proceso fermentativo, induciendo retrasos en el mismo a bajas dosis, y siendo capaces incluso de provocar la parada fermentativa a concentraciones más elevadas. Inhiben la reproducción y el desarrollo de las levaduras, alterando la cantidad y calidad de la microflora espontánea de uvas y mostos, reduciendo la presencia y la actividad de especies como *Hanseniaspora uvarum*, *S. cerevisiae* y *S. bayanus* e incrementando la de *S. Ludwigii*, *Torulopsis bacillaris* y *Candida mycoderma*, todas de escaso poder alcohólico (Cabras *et al.*, 1997a; Hatzidimitriou *et al.*, 1997; Oliva *et al.*, 1999).

Los triazoles ciproconazol, triadimefon o triadimenol, que son inhibidores de la síntesis de esteroides, componentes necesarios para el crecimiento anaerobio de las células de levadura, influyen en la cinética fermentativa de los mostos, aunque lo hacen en función de la dosis (Zamorano *et al.*, 1999). Otros triazoles como hexaconazol, tetraconazol y penconazol no provocan alteración alguna sobre la cinética fermentativa; sin embargo se han observado efectos biocidas iniciales en su presencia a diferentes dosis, lo que provoca pequeñas ralentizaciones en el inicio de la fermentación (Cabras *et al.*, 1999; Oliva *et al.*, 2000).

En otras ocasiones, los residuos de fungicidas actúan como estimulantes de algunas levaduras para producir más alcohol. Tal es el caso de azoxistrobin, mepanipirim o pirimetanil sobre la especie *Kloeckera apiculata* (Cabras *et al.*, 1999).

Finalmente, en ensayos con nuevos compuestos de acción fungicida no sistémica (fludioxonil y fenilpirrol), algunas anilipirimidinas (ciprodinil y pirimetanil) y nuevas materias activas de estructura similar a las estrobirulinas naturales (azoxistrobin y kresoxim-metil), se ha comprobado que no afectan significativamente al desarrollo de la fermentación en vinificaciones en blancos de la variedad Airén, aunque puedan influir más concretamente sobre algunas características del vino acabado (García, 2002).

Mucho menos conocido es el efecto de los plaguicidas sobre la fermentación malo-láctica del mosto. Radler y Schoning (1974) demostraron que mancozeb y metilmetiram inhibían la actividad de las bacterias lácticas. Cimoxanilo, diclofuanida, vinclozolina e iprodiona también se han señalado como depresores de este proceso, aunque se ha demostrado que los dos últimos favorecen el

desarrollo de bacterias acéticas (San Romáo y Belchior, 1982; Haag *et al.*, 1988). Exceptuando el primer caso, ningún plaguicida ha mostrado efectos negativos relevantes sobre este tipo de fermentación (Cabras *et al.*, 1994 y 1994a; Cabras *et al.*, 1999).

Por último, cabe señalar algunos estudios sobre el efectos que los residuos de plaguicidas pueden ocasionar en la calidad organoléptica de los vinos.

Para comprobar la influencia de la presencia de residuos de plaguicidas en las características principales del vino, Oliva *et al.* (1998a) estudiaron los parámetros generales: densidad, acidez total, acidez volátil, grado alcohólico y tiempo de fermentación, en vinos obtenidos de uvas testigo (sin ningún tratamiento fitosanitario), uvas cultivadas tradicionalmente (con tratamientos típicos de la zona de cultivo) y uvas tratadas con vinclozolina, fenarimol, mancozeb, metalaxil y penconazol. En todos los casos la evolución de la fermentación fue correcta; no observándose paradas fermentativas. Los valores de grado alcohólico alcanzados en todos los vinos se encontraron dentro de los valores mínimos exigidos en la D.O. de la zona. Los valores y evolución de la fracción ácida, no ponen en peligro su conservación, ni el equilibrio de su constitución.

En otro estudio sobre uva vendimiada, tratada con los fungicidas pirimetanil, ciprodinil (Switch), fludioxinil (Switch), azoxistrobin, kresoxim-metil y quinoxifen se realizaron vinificaciones con maceración a 5°C cuatro días y seis días a 25°C; finalizada la fermentación alcohólica se trasegó, estabilizó mediante clarificación y filtración y, posteriormente, se embotelló. Sobre el vino embotellado se realizaron las determinaciones de los parámetros generales (Tabla 1.7.).

**Tabla 1.7.-** Parámetros generales medidos en el vino (Fuente: Fernández *et al.*, 2001).

	Testigo	Q (a)	K (b)	A (c)	Sw* (d)	P (e)	GS
AT	7,58±0,28	7,19±0,07	7,26±0,30	7,13±0,02	7,15±0,18	7,23±0,07	a,c,d,e
AV	0,040±0,000	0,040±0,000	0,043±0,006	0,040±0,000	0,040±0,000	0,060±0,010	e
pH	3,38±0,02	3,453±0,006	3,45±0,06	3,413±0,006	3,456±0,006	3,493±0,006	a,b,d,e
GA	12,26±0,06	12,40±0,20	12,66±0,28	12,80±0,65	12,40±0,30	13,43±0,40	e

Q: quinoxifen; K: kresoxim-metil; A: azoxistrobin; S: switch; P: pirimetanil; AT: acidez total (g/l ácido tartárico); AV: acidez volátil (g/l de ácido acético); pH: unidades de pH; GA: grado alcohólico (% v/v de etanol); GS: Grado de significación ( $p \leq 0,05$ ); \* Mezcla de ciprodinil y fludioxonil, no se formulan por separado.

En cuanto a la fracción ácida, cabe señalar que sólo en la vinificación en presencia de kresoxim-metil no existen diferencias significativas con respecto al vino testigo para los valores de acidez total. Lo mismo ocurre con el pH, pero en este caso en el vino elaborado con residuos de azoxistrobin. En cambio, para la acidez volátil, únicamente la vinificación con residuos de pirimetanil difiere del control de forma significativa; igual que ocurre para el grado alcohólico (Fernández *et al.*, 2001).

Aunque se ha estudiado ampliamente la ascendencia en los aromas del vino de diversos factores como variedad de uva, práctica cultural, clima, tipo de elaboración, procesos, etc., son escasos los trabajos sobre la posible influencia que tienen los residuos de plaguicidas, pudiendo su presencia en la uva provocar una serie de efectos, la mayoría de las veces indeseables, que pueden alterar la calidad del elaborado vínico introduciendo malos sabores y olores en mosto y vino.

En este sentido, se ha constatado la influencia de algunos fungicidas en la composición aromática del vino observándose diferencias significativas en los niveles de volátiles mayoritarios (acetato de etilo, metanol, isobutanol y dietilacetil) de los vinos considerados clásicos en cuanto a tratamientos fitosanitarios (3 tratamientos habituales en la zona) y los de los vino control (Tabla 1.8.) (Oliva *et al.*, 1999b).

Las cantidades de metanol son ligeramente superiores a las del vino control, pero dobles a las del clásico; concretamente en el caso de fenarimol, el nivel alcanza 107 mg/L (frente a 54,5 en el control), lo que puede deberse a la mayor actividad del enzima pectin-metil-esterasa en su presencia.

La concentración de isobutanol en los vinos se debe a la asimilación del aminácido valina, su precursor, por las levaduras; causa posible del bajo nivel encontrado en el vino clásico debido a sus tratamientos.

El resto de niveles de los demás alcoholes es normal comparado con los valores aportados por diferentes investigadores (Santos, 1997; Aubert *et al.*, 1997 y 1998).

**Tabla 1.8.-** Diferencias en la composición aromática entre vinos tratados con fungicidas y vino control (Fuente: Oliva *et al.*, 1999b)

Comp. Aromático	C	F	M	Me	P	V
<b>Mayoritarios</b>						
Acetato etilo	*					
Dietil acetal		*	*	*		*
Metanol		*				
Isobutanol	*					
<b>Minoritarios</b>						
Ác. Hexanoico	*	*			*	*
Ác. Heptanoico	*					
Ác. Decanoico	*		*	*		
Acetato isoamilo		*				*
Acetato hexilo	*			*	*	
Decanoato etilo	*	*			*	
Acetato 2 feniletilo	*				*	
Dodecanoato etilo		*				
1-octen-3-ol	*	*	*	*	*	
2-etil-1-hexanol	*	*				
1-octanol					*	

C: Clásico; F: Fenarimol; M: Mancozeb; Me: Metalaxil; P: Penconazol; V: Vinclozolina

En cuanto a los volátiles minoritarios, agrupados en ácidos, ésteres, alcoholes y aldehídos, se ha comprobado que no hay diferencias significativas entre los valores de los ácidos isobutírico e isovalérico (índices de la actividad bacteriana, factor de pobre calidad) por tanto los plaguicidas estudiados no afectan la actividad bacteriana.

Los niveles de los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico, presentan diferencias significativas en el vino clásico y también en los tratados con fenarimol, penconazol y vinclozolina (la alta concentración de hexanoico puede deberse al aumento de la cantidad de levaduras en la etapa de fermentación más intensa).

De los quince ésteres determinados, solo se encontraron diferencias significativas en acetato de isoamilo, acetato de hexilo, decanoato de etilo, acetato de fenil etilo y dodecanoato de etilo; aunque sus niveles son normales. Este

último, junto con el hexanoato de etilo, tiene una fuerte influencia sobre el perfil aromático de vinos jóvenes.

De los dieciséis alcoholes analizados, solamente 1-octanol y 1-octen-3-ol difieren significativamente en cantidad; aunque éstos si están presentes a altas concentraciones pueden considerarse como un defecto. Finalmente, no se encontraron diferencias en los aldehídos analizados y sus valores fueron normales.

Existen referencias de que algunos plaguicidas de la familia de los triazoles (penconazol, hexaconazol, fluquinconazol, etc.) producen alteraciones en la síntesis de esteroides y alteran la composición de la fracción de ésteres en el aroma de los vinos (Aubert *et al.*, 1997 y 1998; Oliva *et al.*, 1999b).

Otro estudio sobre la influencia de tres fungicidas (ciprodinil, fludioxonil y pirimetanil) sobre la composición aromática (ácidos, alcoholes y ésteres) en vinos blancos de la variedad Airén, inoculados con tres cepas distintas de *Saccharomyces* (*S. bayanus*, *S. cerevisiae* y *S. cerevisiae var. uvarum*) muestra que la adición de estos tres principios activos a distintas dosis (1 y 5 mg/L) produce diferencias significativas en la fracción ácida del aroma, especialmente en aquellos vinos inoculados con *Saccharomyces cerevisiae*, aunque su contenido final no supera los umbrales de percepción. En base a su contenido en Z-3-hexen-1-ol y 3-metiltiopropán-1-ol, los vinos de menor calidad son aquellos inoculados con *Saccharomyces bayanus* y tratados con ciprodinil. El tratamiento con fungicidas en los vinos inoculados con *Saccharomyces bayanus* provoca un aumento en el contenido de acetato de etilo y de acetato de isoamilo, lo que causa un descenso en la calidad sensorial del vino obtenido (García *et al.*, 2004).

En los estudios ya citados, realizados en La Rioja, sobre uva Tempranillo, se constató que los vinos obtenidos con uvas tratadas no alcanzan ni el mínimo de la dosis de referencia (36-350 mg/L) de metanol proveniente de la hidrólisis de las pectinas de la uva que, sin importancia en el aroma, se considera por su efecto tóxico.

Todos los vinos cumplieron que el acetaldehído, producido en la primera fase de la fermentación como producto intermedio del metabolismo de las levaduras a partir del piruvato, permanece a niveles lo más bajo posible (6-190 mg/L).

Los vinos con diclofuanida y con coadyuvantes de formulaciones de procimidona e iprodiona presentan alcoholes amílicos, formados en las levaduras, superiores a 180 mg/L (aparición de sensaciones vegetales), aunque no se encuentran diferencias significativas entre las muestras. Estos alcoholes superiores, de más de dos carbonos, se transfieren al medio y sus variaciones se deben al proceso de fermentación; sus rangos normales son de 150-500 mg/L, pero a niveles superiores a 300 mg/L su efecto es negativo y comunica sensaciones herbáceas desagradables.

Los vinos de la experiencia presentan niveles de acetato de etilo dentro de los márgenes de calidad aceptados, excepto la muestra con diclofuanida que supera el umbral de percepción (más de 150 mg/l).

Dicho éster es el más abundante y su contenido elevado proviene del desarrollo accidental de levaduras oxidativas que no modifican la acidez volátil o de bacterias que oxidan el etanol a acético; concentraciones elevadas confieren dureza y aspereza, sensaciones a pegamento y picado del vino. Tampoco se encuentran diferencias significativas en la formación de ésteres etílicos de ácidos grasos (responsables de sensaciones afrutadas y florales); aunque el vino con diclofuanida presenta la mitad de concentración.

No se encuentran diferencias significativas respecto al contenido total de acetatos y acetato de metilo. No sucede así con los acetatos responsables del afrutado y olor floral de los vinos, como acetato de isoamilo (principal responsable de aroma afrutado), de hexilo, de 2 feniletilo. El vino con diclofuanida no contiene acetato de hexilo, ni de 2-feniletilo, y no alcanza el nivel de percepción de isoamilo. El contenido total de ácidos grasos de más de cinco carbonos es semejante a los encontrados en la bibliografía, por lo que estos fungicidas tienen escasa influencia sobre ellos; excepto para diclofuanida que presenta los valores más bajos (Santos, 1997).

La fracción ácida de los vinos también se ve afectada, y aunque las concentraciones de tartárico, málico y láctico no muestran diferencias significativas con respecto a los testigos, las de acético, cítrico y succínico sí las presentan en algunos ensayos que contienen residuos de clorpirifos, fenarimol, metalaxil, penconazol o mancozeb (Oliva *et al.*, 1998b). Otros trabajos ponen de manifiesto que residuos de diclofuanida, a dosis altas, causan la acidificación del

vino, incrementando las concentraciones de cítrico y láctico y disminuyendo paralelamente las de tartárico y succínico (Santos, 1997).

Al estudiar el efecto de la presencia de azoxistrobin, kresosim-metil y quinoxifen sobre el contenido final de ácidos orgánicos (cítrico, láctico, succínico y tartárico), en vinos blancos de la variedad Airén inoculados con diferentes cepas de *Saccaromyces*, se observó que los valores absolutos de ácidos orgánicos se encontraban dentro del rango óptimo para vinos de calidad, excepto para tartárico, cuyos valores fueron excesivamente bajos.

Desde el punto de vista analítico, la levadura más afectada por la presencia de residuos de los fungicidas es *Saccharomyces cerevisiae var. uvarum*, ya que provoca descensos con respecto al testigo de cítrico, láctico y tartárico, y un aumento de succínico. Por tanto, y aunque existe una influencia de los residuos de estos fungicidas, no influye de manera importante en la calidad organoléptica de los vinos acabados, ya que además producen disminuciones del contenido final de éstos ácidos (García, 2002).

En relación al color, se ha observado que algunos plaguicidas como clorpirifos, fenarimol o mancozeb, pueden influir en ciertas magnitudes físicas (calculadas atendiendo al método CIELab) como S (saturación, relación entre cromaticidad y luminosidad), pero no en otras como H (tono) (Oliva *et al.*, 1999d).

Al estudiar la influencia de los fungicidas azoxistrobin, ciprodinil (Switch), fludioxonil (Switch), kresoxim-metil, pirimetanil y quinoxifen en el color final de los vinos, aparecen diferencias significativas entre las vinificaciones con uvas tratadas y la testigo. De los datos obtenidos y expuestos en la Tabla 1.9. se desprende que existen diferencias significativas entre el vino testigo y los elaborados en presencia de residuos de fungicidas para todos los parámetros, excepto para el contenido total en antocianos y el de ortodifenoles. Estas diferencias son más acusadas para los vinos obtenidos en presencia de pirimetanil (Fernández *et al.*, 2001).

**Tabla 1.9.- Índices y compuestos colorantes en vino testigo y vinos tratados (Fuente: Fernández *et al.*, 2001).**

	Testigo	Quinoxifen (a)	Kresoxim (b)	Azoxistrobin (c)	Switch* (d)	Primetanil (e)	G.S.
Intensidad colorante	19,27±0,58	15,16±1,26	15,34±0,99	16,15±1,09	15,97±2,75	15,26±0,22	a,b,c,d,e
Tono	0,45±0,01	0,46±0,01	0,47±0,02	0,47±0,01	0,46±0,01	0,47±0,01	b,c,e
PT	2,45±0,32	1,96±0,08	1,81±0,25	2,12±0,16	1,80±0,16	1,51±0,10	a,b,d,e
Índice de Folin	48,40±1,05	38,57±4,54	40,50±2,86	42,97±2,56	38,57±4,76	33,80±1,60	a,b,d,e
Índ. Polifenoles Totales	83,47±2,45	58,67±4,92	67,97±2,61	71,67±3,70	59,47±7,71	53,10±0,20	a,b,c,d,e
Cat.	257,9±5,1	233,8±24,7	203,2±8,5	221,7±31,9	213,9±23,9	174,0±17,6	b,d,e
Ant.	445,9±29,5	410,4±32,9	385,0±34,6	392,4±40,2	425,2±52,5	421,3±12,6	NS
Tan.	361,9±12,9	309,3±72,5	281,1±17,5	304,2±26,1	298,4±44,1	254,2±8,7	b,e
%Monómeros	48,27±3,19	47,52±3,49	47,92±1,50	46,95±0,55	38,23±2,14	41,15±1,84	d,e
%Polímeros rojos	33,58±1,80	38,50±3,44	36,00±0,88	36,44±0,72	44,07±1,61	44,34±2,74	a,d,e
%Polímeros pardos	18,13±1,46	14,65±0,95	16,08±0,73	16,60±1,04	17,69±0,71	14,51±1,05	a,b,e
OD	12,53±3,41	10,28±0,37	9,68±2,24	12,77±1,73	12,31±0,13	11,51±1,51	NS
H (tono)	19,10±0,10	23,43±1,70	23,93±0,35	23,34±0,74	24,20±2,76	22,10±1,11	a,b,c,d,e
Saturación	5,26±0,02	4,87±0,54	4,17±0,10	4,33±0,13	4,27±0,50	4,66±0,32	b,c,d,e

PT: Polifenoles totales (g/L ácido gálico); Cat: Catequinas (mg/L D-catequina); Ant: Antocianos totales (mg/L antocianos); Tan: Taninos (mg/L ácido tánico); OD: ortodifenoles (mg/L D-catequina); GS: Grado de significación ( $p \leq 0,05$ ); NS: No significativo; \* Mezcla de ciprodinil y fludioxonil, no se formulan por separado.

La intensidad colorante constituye el principal elemento de juicio en la fase visual del análisis sensorial. El mayor o menor valor de este parámetro está muy influenciado por el grado de madurez de la uva, el tiempo de maceración y la temperatura a la que ésta se realiza. Si tenemos en cuenta que en todas las vinificaciones estos factores han sido los mismos, cabe pensar que la presencia durante la vinificación de residuos de los fungicidas estudiados haya influido en la disminución de la difusión de los compuestos fenólicos del hollejo al mosto durante el período de maceración.

El valor absoluto del índice de polifenoles totales es indicativo de la capacidad de ese vino para ser sometido a crianza. En este estudio, se observa una gran diferencia entre los valores de índice de polifenoles totales para el vino testigo y los obtenidos en presencia de residuos de plaguicidas.

Cuando estudiamos la composición fenólica de estos vinos, se comprueba por análisis estadístico de los datos que existen diferencias significativas entre el vino testigo y los restantes (Oliva *et al.*, 2005) (Tablas 1.10. y 1.11.).

En cuanto a los compuestos fenólicos de bajo peso molecular (Tabla 1.10.), cabe señalar que para todos los compuestos estudiados, excepto tirosol, existen diferencias significativas entre el vino testigo y los obtenidos en presencia de residuos de fungicidas.

Como conclusión, los vinos obtenidos a partir de uva tratada con todos los fungicidas presentan, para la mayoría de compuestos, diferencias significativas. Los fungicidas que más influyen en los compuestos fenólicos estudiados son azoxistrobin, kresoxim-metil y pirimetanil. El de menor influencia es quinoxifen. Los contenidos finales de todos los compuestos estudiados se encuentran dentro de los valores dados en la bibliografía.

**Tabla 1.10.-** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular (mg/L) en vinos (media ± DS) (Fuente: Oliva *et al.*, 2005).

Compuesto	Testigo	K (a)	Q (b)	A (c)	S* (d)	P (e)	G.S.
Ác.gálico	19,08±1,81	13,88±1,16	14,10±3,16	14,08±3,27	12,60±2,19	6,19±0,55	a,b,c,d,e
Tirosol	27,52±9,29	21,41±6,26	32,05±3,94	24,38±3,33	32,22±8,95	29,78±6,44	-
Ac. 4-hid.benz.	10,34±1,05	5,32±2,31	6,16±2,43	6,87±0,36	4,95±1,06	2,58±1,78	a,b,c,d,e
Ác. vainillico	4,23±1,78	4,18±1,26	3,28±1,00	7,93±2,24	3,50±1,88	3,67±1,57	C
Catequina	29,28±11,96	10,25±3,16	12,43±5,57	9,26±3,20	10,12±4,01	14,44±3,88	a,c,d,e
Ác. Siringico	13,48±1,66	11,07±0,75	10,52±3,25	12,14±2,26	8,63±1,22	7,43±2,53	a,d,e
Ác. 4-cumárico	3,81±2,63	1,65±0,17	2,08±0,40	1,86±0,84	1,66±0,48	2,53±2,09	a,d,e
Ác. Ferúlico	1,39±0,28	4,75±0,62	5,92±0,48	0,89±0,09	3,36±0,76	0,81±0,42	a,b,c,d,e
Tr.-resveratrol	0,52±0,08	1,24±0,34	1,97±0,14	1,74±0,12	1,63±0,14	1,42±0,53	a,b,c,d,e

**K:** Kresoxim-metil; **Q:** Quinoxifen; **A:** Azoxistrobin; **S:** Switch; **P:** Pirimetanil; **GS:** Grado de significación.

Tabla 1.11.- Antocianinas (mg/l) en vinos (media  $\pm$  DS) (Fuente: Oliva *et al.*, 2005).

Compuesto	Testigo	Kresoxim (a)	Quinoxifen (b)	Azoxistrobin (c)	Switch* (d)	Pirimetanil (e)	G.S.
Delfinidin-3-gl.	0,62 $\pm$ 0,08	0,66 $\pm$ 0,19	0,52 $\pm$ 0,07	0,31 $\pm$ 0,08	0,82 $\pm$ 0,23	0,88 $\pm$ 0,35	c
Cianidin-3-gl.	0,26 $\pm$ 0,03	0,26 $\pm$ 0,06	0,29 $\pm$ 0,06	0,26 $\pm$ 0,08	0,31 $\pm$ 0,05	0,35 $\pm$ 0,09	e
Petunidina-3-gl.	1,79 $\pm$ 0,18	1,94 $\pm$ 0,38	1,78 $\pm$ 0,24	0,99 $\pm$ 0,32	2,46 $\pm$ 0,53	2,60 $\pm$ 0,71	c
Peonidina-3-gl.	0,94 $\pm$ 0,05	1,11 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,13	0,85 $\pm$ 0,17	1,26 $\pm$ 0,25	1,86 $\pm$ 0,42	a,e
Malvidina-3-gl.	13,17 $\pm$ 0,64	13,22 $\pm$ 1,56	10,83 $\pm$ 1,42	7,88 $\pm$ 1,63	13,46 $\pm$ 1,97	15,91 $\pm$ 3,03	a,b,c

GS: Grado de significación.

#### 1.7.5.4. Efecto toxicológico sobre el consumidor

El gran número de plaguicidas utilizados en la actualidad hace imprescindible la realización de controles que permitan identificar y cuantificar los residuos que estos compuestos pueden dejar en las uvas. Si como se ha venido reiterando con anterioridad no se guardan las debidas precauciones, y la vinificación no se conduce de forma correcta, parte de los residuos pueden transferirse al mosto y aparecer después en los vinos. Es obvio, que este hecho preocupa en gran medida al consumidor, destinatario final del producto.

En España, al igual que en el resto de países de la UE, se hacen regularmente análisis del contenido de residuos de fitosanitarios en uvas, pues hoy en día, no existen LMRs establecidos específicamente para vinos. Es decir, los LMRs (cantidad máxima de residuo de un determinado plaguicida sobre un producto agrícola permitida por la ley) se fijan sobre uva, y son los que hay que cumplir independientemente que su destino sea para consumo en fresco o para producción de vino (Coscollá, 1993; Dugo *et al.*, 1993; Juban, 1996; Ruggeri *et al.*, 1996).

Sólo la legislación alemana establece LMRs para algunos antibottríticos concretos, únicamente para uvas destinadas a vinificación; y en Suiza, metiltiofanato y vinclozolina tienen estipulados LMRs tanto en uva como en vino, pero éstos son casos excepcionales.

En Italia, aunque los LMRs se fijan en uvas, se permite la estimación del límite en vinos considerando el porcentaje de transformación, siempre y cuando se sigan las técnicas normales de buena elaboración (Cabras *et al.*, 1986).

La presencia de los residuos de fungicidas en vinos preocupa en gran manera al consumidor. Por ello, tanto la Unión Europea como los países individualmente considerados, están realizando estudios para determinar los factores de transferencia en los procesos de vinificación, comprobando también la inocuidad de los residuos remanentes en los vinos acabados.

Como complemento al establecimiento de factores de transferencia debemos resaltar la importancia de los plaguicidas, como tóxicos que pueden generar efectos perjudiciales en el ser humano.

Además, su biodisponibilidad en el organismo depende de su toxicocinética: absorción, distribución, metabolismo y eliminación, por lo que

resulta interesante su estudio. Estos procesos están influenciados tanto por factores externos relacionados con los patrones de exposición y con la sustancia química (tipo de empleo, temperatura ambiental, tipo de plaguicida, frecuencia, intensidad y duración de la exposición, etc.), como por factores inherentes al individuo (edad, sexo, dotación genética, estado de salud, estado nutricional, estilos de vida, vía principal de absorción, etc.) (Fait y Colosio, 1998; Bollinger *et al.*, 2005).

Por todo lo anteriormente expuesto, en la presenta Memoria se pretende aportar nuevos datos, para los fungicidas estudiados, de la dinámica de desaparición de los mismos durante la vinificación, la influencia sobre la flora levaduriforme y su acción sobre la calidad organoléptica de los vinos obtenidos.

## **OBJETIVOS**



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVOS GENERALES

Los objetivos generales que pretende alcanzar este proyecto se pueden resumir en:

Determinar los efectos de los fungicidas estudiados sobre la flora levaduriforme, principal responsable de la fermentación de los mostos.

Conocer la dinámica de desaparición de estos fungicidas durante las distintas etapas de la vinificación.

Establecer los efectos de los fungicidas estudiados sobre la calidad organoléptica del vino.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El planteamiento del trabajo que se expone en esta Memoria, pretende conseguir los siguientes objetivos específicos:

Determinar mediante ensayos *in vitro* la influencia de los fungicidas seleccionados sobre diversas cepas de levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*.

Estudio del efecto de dichos fungicidas sobre la flora microbiana, tanto para fermentaciones espontáneas como para las desarrolladas con levaduras secas activas.

Obtención y validación de la metodología analítica para el control de los residuos de los fungicidas seleccionados en uva, mosto y vino, de acuerdo con los criterios de calidad de la norma ISO/IEC 17025 y las recomendaciones de la Guía SANCO (UE).

Establecer los niveles finales de estos fungicidas en uva, mosto y vino, tras su aplicación en diferentes condiciones: buenas prácticas agrícolas y condiciones más desfavorables.

Determinar la influencia de los procesos enotécnicos sobre la eliminación de los fungicidas utilizados, en condiciones de buenas prácticas agrícolas y en las más desfavorables provocadas por la aplicación el día de la vendimia.

Estudiar la influencia que los residuos de estos productos fitosanitarios pueden tener sobre diversos parámetros que afectan la calidad organoléptica del vino, como: ácidos orgánicos, compuestos fenólicos y aromáticos.

**MATERIAL GENERAL UTILIZADO Y PLANTEAMIENTO  
EXPERIMENTAL**



### 3. MATERIAL GENERAL UTILIZADO Y PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

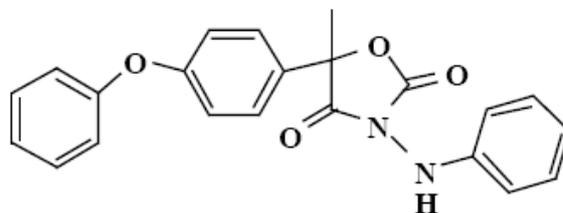
#### 3.1. FUNGICIDAS ESTUDIADOS

A continuación se resumen las principales características y propiedades fisicoquímicas de los productos estudiados (FAO/OMS, 2005; European Commission, 2010; MARM, 2010a; OMS, 2010).

##### **Famoxadona**

##### Nomenclatura y estructura:

- Nombre común: Famoxadona.
- Nombre químico según IUPAC: 3-anilino-5-metil-5-(4-fenoxifenil)-1,3-oxazolidina-2,4-diona.



##### Propiedades físico-químicas:

Se presenta en forma de polvo de color crema pálido. Su punto de fusión se encuentra entre 141,3 y 142,3°C, su presión de vapor es de  $6,4 \times 10^{-7}$  Pa (20°C) y posee un coeficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ) de 4,8 (20°C y pH 5).

Su densidad es de 1,31 kg/L (22°C); su solubilidad (20°C) en agua es de: 243 µg/L (pH 5), 111 µg/L (pH 7) y 38 µg/L (pH 9). Su solubilidad en disolventes orgánicos (25°C) es de: 274 g/L en acetona, 13,3 g/L en tolueno, 239 g/L en diclorometano, 0,048 g/L en hexano, 10 g/L en metanol, 125 g/L en acetato de etilo, 1,78 g/L en octan-1-ol y 125 g/L en acetonitrilo.

### Aplicaciones:

Fitosanitario utilizado para el control de las principales enfermedades fúngicas en uva, tomate y cereales.

Inhibe el crecimiento del micelio e impide la supervivencia de las esporas en los hongos no oomicetos y en varios hongos oomicetos, como *Plasmopara viticola*, causante del mildiu en la uva.

La actividad antifúngica de Famoxadona se debe a su capacidad de inhibición del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial, que resulta en una disminución de la síntesis de ATP.

### Formulaciones: (MARM, 2010a)

Equation Pro (Cimoxanilo 30% + Famoxadona 22,5% p/p) comercializada por Du Pont Ibérica, S.L.

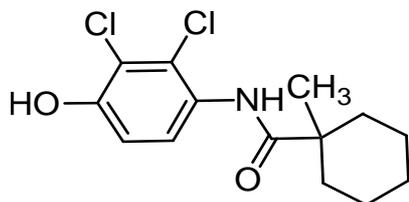
### Aspectos toxicológicos:

- Clasificación de la UE: Xn; R48/22 N; R50/53.
- DL<sub>50</sub> oral y aguda: en ratas > 5000 mg/kg de peso corporal.
- NOAEL: 1,2 mg/kg de peso corporal y día (lesiones oculares).
- IDA: 0,012 mg/kg de peso corporal.
- Genotoxicidad (*in vitro*): positiva en síntesis de ADN no programada y débilmente clastogénico en linfocitos humanos cuando no existe activación metabólica.
- Carcinogenicidad: no oncogénico.
- Reproducción: sin efecto en los parámetros reproductivos.
- Neurotoxicidad retardada: negativo.

## **Fenhexamida**

### Nomenclatura y estructura:

- Nombre común: Fenhexamida.
- Nombre químico según IUPAC: 2',3'-dicloro-4'-hidroxi-1-metilciclohexanocarboxanilida.



#### Propiedades físico-químicas:

Se presenta en forma de cristales de color blanco. Su punto de fusión se encuentra en 153°C, su presión de vapor es de  $4 \times 10^{-4}$  mPa (20°C) y posee un coeficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ) de 3,51 (20°C y pH 7). Su densidad es de 1,34 kg/L (20°C); su solubilidad (20°C): en agua 20 mg/L, en n-hexano < 0,1 g/L, en isopropanol 91 g/L, en acetonitrilo 15 g/L, en tolueno 5,7 g/L y en diclorometano 31 g/L.

#### Aplicaciones:

Fungicida no sistémico derivado de la hidroxianilida capaz de inhibir el crecimiento del micelio y del tubo germinal de las esporas en hongos. Está indicado para el control de la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*), *Monilia spp.* y demás patógenos relacionados en vid, fresas, frutas de hueso, bayas, kiwi, tomate y plantas ornamentales.

#### Formulaciones: (MARM, 2010a)

Teldor (Fenhexamida 50% p/p) comercializada por Bayer Cropscience, S.L.

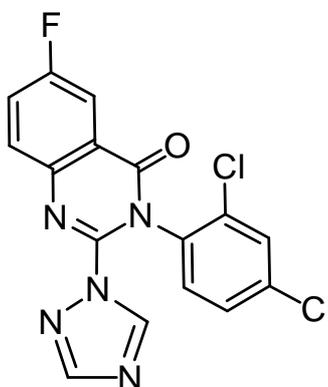
#### Aspectos toxicológicos:

- Clasificación de la UE: N; R51/53.
- $DL_{50}$  oral y aguda: en ratas > 5000 mg/kg de peso corporal.
- NOAEL: 17,4 mg/kg de peso corporal y día en perros (1 año).
- IDA: 0-0,2 mg/kg de peso corporal.
- Genotoxicidad: sin potencial genotóxico.
- Carcinogenicidad: poco probable que represente un riesgo cancerígeno.
- Reproducción: sin efectos toxicológicos relevantes.
- Neurotoxicidad retardada: sin evidencia de neurotoxicidad a dosis hasta 2000 mg/kg de peso corporal en ratas.

### **Fluquinconazol**

#### Nomenclatura y estructura:

- Nombre común: Fluquinconazol.
- Nombre químico según IUPAC: 3-(2,4-diclorofenil)-6-fluoro-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)-quinazolin-4(3H)-ona.



#### Propiedades físico-químicas:

Se presenta en forma de cristales de color marrón pálido. Su punto de fusión se encuentra entre 191,9 y 193°C, su presión de vapor es de  $6,4 \times 10^{-6}$  mPa (20°C) y posee un coeficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ) de 3,24 (pH 5,6). Su densidad es de 1,58 kg/L (20°C) y su solubilidad (20°C): en agua 1 mg/L, en acetona 50 g/L, en xileno 10 g/L, en etanol 3 g/L, en dimetil sulfóxido 200 g/L.

#### Aplicaciones:

Fungicida inhibidor de la síntesis de ergosterol.

Se utiliza para el control de *Uncinula necator* en la vid, *Puccinia* y *Septoria spp.* en trigo y *Cercospora*, *Erishype spp.* en remolacha azucarera. También se aplica para el control de un amplio espectro de ascomicetos, deuteromicetos y basidiomicetos en cultivos de hoja ancha y cereales.

#### Formulaciones: (MARM, 2010a)

Castelan (Fluquinconazol 25% p/p), comercializado por Basf Española, S.L.

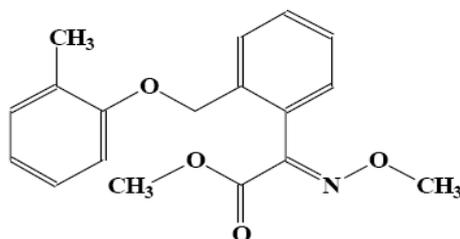
#### Aspectos toxicológicos:

- Clasificación de la UE: T; R23/25, T; R48/25, Xn; R21, Xi; R38, N; R50/53.
- DL<sub>50</sub> oral y aguda: en ratas, 112 mg/kg de peso corporal.
- NOAEL: 0,31 mg/kg de peso corporal y día en ratas.
- IDA: 0,005 mg/kg de peso corporal.
- Negativo para Ames y otros tests de mutagenicidad.

### Kresoxim-metil

#### Nomenclatura y estructura:

- Nombre común: Kresoxim-metil.
- Nombre químico según IUPAC: metil(E)-2-metoximino-2-[2-(o-toliloximetil) fenil] acetato.



#### Propiedades físico-químicas:

Se presenta en forma de cristales de color blanco. Su punto de fusión se encuentra entre 101,6 y 102,5°C, su presión de vapor es de  $2,3 \times 10^{-6}$  Pa (20°C) y posee un coeficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ) de 3,4 (25°C). Su densidad es de 1,258 kg/L (20°C) y su solubilidad (20°C) en agua de 2 mg/L. Su solubilidad en disolventes orgánicos (20°C) es de: 1,72 g/L en n-heptano, 14,9 g/L en metanol, 217 g/L en acetona, 123 g/L en acetato de etilo y 939 g/L en diclorometano.

#### Aplicaciones:

Fungicida sistémico derivado de la estrobirulina A, metabolito fúngico secundario aislado del hongo *Strobilurus tenacellus*.

De acción translaminar, se extiende en su mayor parte sobre las hojas a través de su difusión en fase gaseosa. Una vez seca la solución sobre las hojas, permanece en forma de depósito sólido sobre su superficie. Sólo es absorbido por la planta en una proporción relativamente baja y tiene una acción casi sistémica.

Posee actividad preventiva, curativa y erradicante, así como un prolongado efecto residual. Muy eficaz contra *Botrytis cinerea*, *Plasmopara viticola*, *Uncinula necator*, entre otros.

#### Formulaciones: (MARM, 2010a)

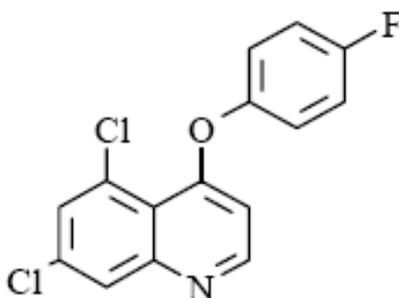
Stroby (Kresoxim-metil 50% p/p) comercializado por Basf Española, S.L.

Aspectos toxicológicos:

- Clasificación de la UE: Carc. Cat. 3; R40 N; R50/53.
- DL<sub>50</sub> oral y aguda: en ratas > 5000 mg/kg de peso corporal.
- NOAEL: 146 mg/kg de peso corporal y día en ratas macho (90 días).
- IDA: 0,4 mg/kg de peso corporal.
- Genotoxicidad: sin potencial genotóxico.
- Carcinogenicidad: tumores hepáticos a partir de la dosis máxima tolerada (800 ppm).
- Reproducción: sin efecto.
- Neurotoxicidad retardada: sin efecto relevante.

**Quinoxifen**Nomenclatura y estructura:

- Nombre común: Quinoxifen.
- Nombre químico según IUPAC: 5,7-dicloro-4(p-fluorofenoxi) quinolina.

Propiedades físico-químicas:

Se presenta como un sólido floculante blanquecino. Su punto de fusión se encuentra entre 100 y 106°C, su presión de vapor es de  $1,2 \times 10^{-5}$  Pa (20°C) y posee un coeficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ) de  $4,66 \pm 0,002$  (20°C y pH 6,6). Su densidad es de 1,56 kg/L (99,75% de pureza) y su solubilidad (20°C) en agua de: 0,116 mg/L (pH 6,45), 0,128 mg/L (pH 5), 0,047 mg/L (pH 7) y 0,036 mg/L (pH 9). Su solubilidad como sustancia pura en disolventes orgánicos (20°C) es de: 9,64 g/L

en hexano, 21,5 g/L en metanol, 272 g/L en tolueno, 589 g/L en diclorometano, 116 g/L en acetona y 179 g/L en acetato de etilo.

Aplicaciones:

Fenoxiquinolina con actividad fúngica.

Su bioquímica no está aún determinada pero, se ha comprobado que no actúa en la desmetilación de esteroides ni como inhibidor de la cadena de transporte de electrones en las mitocondrias. Su modo de acción permite usarlo como protector fungicida actuando a través de la inhibición de supresores del desarrollo.

Ampliamente utilizado contra el oidio (*Uncinula necator*). Este compuesto es altamente activo contra cepas resistentes a los actuales fungicidas y muestra un bajo riesgo de resistencia generacional.

Formulaciones: (MARM, 2010a)

Arius (Quinoxifen 25% p/v) comercializado por Dow Agrosciences Ibérica, S.A.

Aspectos toxicológicos:

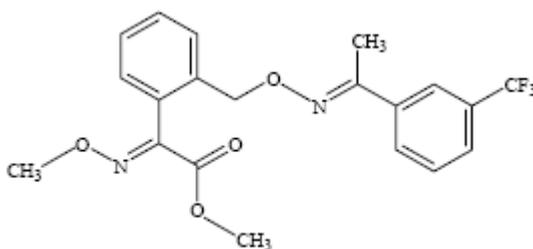
- Clasificación de la UE: R43 N; R50/53.
- DL<sub>50</sub> oral y aguda: en ratas > 5000 mg/kg de peso corporal.
- NOAEL: 20 mg/kg de peso corporal y día en perros (1 año).
- IDA: 0,2 mg/kg de peso corporal.
- Genotoxicidad: negativo.
- Carcinogenicidad: negativo.
- Reproducción: leve reducción en la ganancia de peso corporal en gazapos durante la lactancia.
- Neurotoxicidad retardada: sin efectos específicos.

### **Trifloxistrobin**

Nomenclatura y estructura:

- Nombre común: Trifloxistrobin.

- Nombre químico según IUPAC: Metil(E)-metoxiimino-{(E)-a-[1-a-(a,a,a-trifluoro-mtolil)etilidenoaminoxil]-o-tolil} acetato.



#### Propiedades físico-químicas:

Se presenta en forma de polvo de color blanco. Su punto de fusión es de 72,9°C, su presión de vapor es de  $3,4 \times 10^{-6}$  Pa (25°C) y posee un coeficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ) de  $4,5 \pm 0,0094$  (25°C). Su densidad es de 1,36 kg/L (20°C) y su solubilidad (25°C) en agua de 0,61 mg/L.

Su solubilidad en disolventes orgánicos (25°C) es de: > 500 g/L en acetona, > 500 g/L en diclorometano, > 500 g/L en acetato de etilo, 11 g/L en hexano, 76 g/L en metanol, 18 g/L en octanol y 500 g/L en tolueno.

#### Aplicaciones:

Fungicida foliar de amplio espectro derivado de la estrobirulina producida por *Strobilurus tenacellus*. Se utiliza en el control de hongos de las clases *Ascomycetes*, *Deuteromycetes*, *Basidiomycetes* y *Oomycetes*, en particular para el tratamiento del oidio en frutas de pepita, uva y plátano.

Trifloxistrobin inhibe la respiración mitocondrial al bloquear la transferencia de electrones dentro de la cadena respiratoria. Este hecho provoca que se interrumpan importantes procesos bioquímicos celulares, cesando el crecimiento del hongo.

#### Formulaciones: (MARM, 2010a)

Flint (Trifloxistrobin 50% p/p) comercializado por Bayer Cropscience, S.L.

#### Aspectos toxicológicos:

- Clasificación de la UE: R43 N; R50/53.

- DL<sub>50</sub> oral y aguda: en ratas > 5000 mg/kg de peso corporal.
- NOAEL: 6,4 mg/kg de peso corporal y día en ratas (90 días).
- IDA: 0,1 mg/kg de peso corporal.
- Genotoxicidad: sin potencial genotóxico.
- Carcinogenicidad: sin potencial carcinogénico.
- Reproducción: descenso en la ganancia de peso corporal y retraso en la apertura de los ojos en crías de rata y conejo a las dosis tóxicas parentales.
- Neurotoxicidad: sin evidencias de neurotoxicidad.

### 3.2. UVA TINTA DE VINIFICACIÓN (*Vitis vinifera* var. *Monastrell*)

Las principales variedades para vinificación en España se agrupan en variedades de uva blanca, de uva tinta y de uva tintorera. Las de uva tinta se caracterizan por una pulpa de color amarillo-verdoso y un hollejo azul-violáceo.

Entre las variedades de uva tinta en nuestro territorio destacan: *Bobal*, *Cabernet Sauvignon*, *Garnacha*, *Graciano*, *Jaén tinta*, *Mazuela*, *Mencia*, *Merlot*, *Monastrell*, *Pinot Noir*, *Prieto Picudo* y *Tempranillo*.

La variedad *Monastrell*, característica de toda la zona levantina, predomina en las Denominaciones de Origen: Jumilla, Yecla, Bullas, Alicante y Almansa.

Variedad de gran rusticidad y elevada resistencia a la sequía, necesita de una buena insolación. Las temperaturas mínimas que puede aguantar esta vid son de hasta 20°C bajo cero; sin embargo, las temperaturas demasiado altas (30-34°C) acompañadas de viento caliente y seco pueden quemar las hojas y los racimos.

Así pues, las temperaturas consideradas óptimas para el cultivo de la vid en sus distintas etapas de desarrollo son: apertura de yemas (9-10°C), floración (18-22°C), de floración a cambio de color (22-26°C), de cambio de color a maduración (20-24°C) y en vendimia (18-22°C) (Payá, 2008).

En lo concerniente a las precipitaciones, su distribución idónea en el cultivo sería como sigue: durante la brotación (14-15 mm), durante la floración (10 mm), de la floración al cuajado de los frutos (40-115 mm), entre el cuajado y la maduración (80-100 mm) y durante la vendimia (0-40 mm). El granizo es el fenómeno climatológico más dañino para la viticultura.

La variedad *Monastrell* es capaz de adaptarse a podas diferentes con distinta carga así como a una gran variedad de terrenos donde la materia orgánica es el componente fundamental que asegura el buen crecimiento de la misma. Por otro lado, el pH del suelo es de vital importancia a la hora de seleccionar el portainjerto (Payá, 2008).

Esta variedad de brotación precoz presenta una sensibilidad media o alta frente al mildiu y oidio, muy resistente a la Excoriosis, la Podredumbre gris y la Polilla. Asimismo, su resistencia frente a la filoxera es alta, de aquí que todavía existan plantaciones de pie franco (Pardo, 1996).

Desde un punto de vista ampelográfico, la variedad *Monastrell* presenta cepas de porte erguido, con sarmientos gruesos, cortos y poco ramificados. Las yemas son algodonosas, blancas o ligeramente carminadas, con eje veloso.

Los pámpanos son de porte erguido, la cara dorsal de los entrenudos es verde con rayas rojas, sin pelos o muy pocos en los nudos y los entrenudos. Con costillas poco pronunciadas y bastante arañosas.

Los zarcillos tienen una distribución discontinua a lo largo del pámpano, existiendo dos o menos en cada uno con una longitud media de unos 20 cm.

Los sarmientos son de porte erguido, gruesos, poco ramificados, largos y fuertes, de sección transversal circular, de color marrón-amarillento con bandas oscuras; entrenudos de 9,3 cm de longitud media, nudos poco salientes y yemas en dardo.

Las hojas jóvenes son algodonosas, tornándose el follaje de color verde poco intenso con zonas rojas oscuras en otoño.

Las flores, muy abundantes y de color malva, son hermafroditas, presentando una fertilidad de cinco racimos por cada diez yemas. Los racimos, a su vez, son pequeños y bastante compactos. Nacen a partir de la tercera yema con pedúnculos de hasta 3 cm de longitud.

Sus bayas de pulpa carnosas son de tamaño mediano, forma esférica y sección transversal regular, de color azul-negro en la epidermis e incolora en la pulpa. Con bastante pruina, una piel gruesa y pepitas sin estrías transversales en su cara dorsal, estas bayas contienen fundamentalmente agua (81,1%) e hidratos de carbono (15,6%) y, en menor medida proteínas (0,7%) y lípidos (0,3%) por cada

100 g de porción comestible. Dentro de los macronutrientes destacan los azúcares, principalmente glucosa y fructosa, mientras que en los micronutrientes las vitaminas se encuentran representadas por el ácido fólico y la vitamina B6 y los minerales por el potasio, encontrándose magnesio y calcio en cantidades moderadas.

Se debe resaltar su contenido en antocianos, flavonoides y taninos ya que son sustancias de reconocidas propiedades terapéuticas. En el hollejo o piel destacan los antocianatos, responsables del color rojizo y flavonoides, responsables del tono amarillo; polisacáridos y taninos, muy abundantes en las semillas.

Los antocianos, flavonoides y taninos son responsables del color, aroma y textura característicos de esta fruta y de sus actividades antioxidantes, que le confieren sus propiedades terapéuticas en la prevención de enfermedades cardiovasculares, envejecimiento, procesos cancerígenos, etc. (Pardo, 1996).



**Figura 3.1.-** Fotografía de la variedad de uva (*Monastrell*) utilizada en este estudio.

En lo concerniente a su aptitud enológica, de la uva *Monastrell* se obtienen mostos de grado medio o alto, con acidez total media-baja, ricos en oxidadas y muy aromáticos.

Este hecho la convierte en una variedad de uva adecuada para obtener vinos rosados y tintos para su consumo en el año, que presentan un aroma varietal extraordinario, con sensaciones de fruta madura, dulce y baja astringencia. No soportan envejecimientos prolongados.

La variedad *Monastrell* está plenamente identificada con la Denominación de Origen Jumilla constituyendo prácticamente un monocultivo. Está totalmente adaptada a las condiciones climáticas de la zona siendo capaz, como se citó anteriormente, de aguantar periodos prolongados de sequía. En estos periodos su producción baja considerablemente, pero cuando las condiciones vuelven a ser favorables se restablece su equilibrio y vuelve a desarrollarse y producir más.

Cuando el aporte de agua es mayor (por precipitaciones, riegos de socorro o goteo) el desarrollo y envergadura de las plantas y los sarmientos se incrementa de forma considerable, al igual que las producciones, que son mucho mayores, dando racimos de tamaño grande y una cantidad apreciable de uvas de segunda generación. Además, el aumento de estas uvas de segunda generación se ha visto incrementado en los últimos años por los riegos, los despuntes y la utilización de vides americanas.

Su adaptación a los diferentes suelos de la zona ha permitido, en épocas de gran expansión del cultivo, establecer plantaciones en lugares con condiciones adversas, en terrenos marginales y en el centro de zonas por las que discurren las aguas, y donde anteriormente existían plantaciones de olivo.

No obstante, la uva procedente de viñas que soportan condiciones extremas no está equilibrada, pudiendo estar demasiado madura o sin poder llegar a una correcta maduración. En el caso opuesto, cuando las producciones son muy altas, por riego fundamentalmente, las uvas tienen menos grado de dulce y algo más de acidez total, pero menos color y menos aromas. De aquí las limitaciones de rendimiento que impone el Consejo Regulador.

Finalmente, la uva *Monastrell* es una variedad muy versátil de la que se pueden obtener vinos rosados y tintos jóvenes, vinos para crianza no muy prolongada, así como los clásicos vinos de alto grado, secos generosos y dulces naturales. No obstante, y a pesar de su versatilidad, los vinos de *Monastrell* presentan una evolución bastante rápida, lo cual puede constituir un problema.

### 3.3. LEVADURAS TESTIGO PARA ENSAYOS *in vitro*

#### ***Hanseniaspora uvarum***

Clasificación taxonómica: reino *Fungi*, subreino *Dikarya*, phylum *Ascomycota*, subphylum *Saccharomycotina*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycodaceae*, género *Hanseniaspora*, especie *Hanseniaspora uvarum* (NCBI, 2010).

Dentro de este género, *Hanseniaspora uvarum* es la especie con mayor presencia en la uva. Presenta células ovoides u esféricas en cultivos frescos, cambiando a células de forma alimonada al envejecer el cultivo. La reproducción vegetativa se da por gemación en ambos polos celulares (Smith, 1998).

Sus ascosporas esféricas con forma de sombrero o de “Saturno” contienen entre 1 y 4 esporas por asca. A pesar de que metabólicamente sólo fermenta glucosa, *H. uvarum* es capaz de asimilar glucosa, celobiosa, 2-ceto-D-gluconato y salicina, así como de crecer en presencia de cicloheximida hasta concentraciones de 100 mg/L.

La cepa utilizada para este estudio fue *Hanseniaspora uvarum* (CECT-1120).

#### ***Torulasporea delbrueckii***

Clasificación taxonómica: reino *Fungi*, subreino *Dikarya*, phylum *Ascomycota*, subphylum *Saccharomycotina*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycetaceae*, género *Torulasporea*, especie *Torulasporea delbrueckii* (NCBI, 2010).

Presenta células cuya forma varía de esféricas a elipsoidales, que crecen de forma aislada (ocasionalmente en parejas) con posibilidad de formar pseudohifas. La reproducción vegetativa se da por gemación multilateral y sus ascas contienen de 1 a 4 ascosporas, tanto lisas como de superficie rugosa.

A pesar de la existencia de una considerable variabilidad entre cepas en cuanto a su capacidad para fermentar y asimilar compuestos carbonados, *Torulasporea delbrueckii* asimila D-manitol, 2-ceto-D-gluconato, etanol y glucosa, fermentando solamente esta última (Kurtzman, 1998).

La cepa utilizada para este estudio fue *Torulasporea delbrueckii* (CECT-10651).

### *Saccharomyces cerevisiae*

Clasificación taxonómica: reino *Fungi*, subreino *Dikarya*, phylum *Ascomycota*, subphylum *Saccharomycotina*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycetaceae*, género *Saccharomyces*, especie *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI, 2010).

Al microscopio, las células de *Saccharomyces* aparecen globosas u ovoides con gemación multilateral y posible formación de pseudohifas. Esta levadura forma de 1 a 4 ascosporas lisas y elipsoidales por asca.

*Saccharomyces cerevisiae* fermenta glucosa, sacarosa y rafinosa y asimila glucosa, sacarosa, maltosa, rafinosa y etanol. No obstante es incapaz de utilizar azúcares de cinco carbonos (Vaughan-Martini y Martini, 1998).

La cepa utilizada para este estudio fue *Saccharomyces cerevisiae* (CECT-1942).

### *Zygosaccharomyces rouxii*

Clasificación taxonómica: reino *Fungi*, subreino *Dikarya*, phylum *Ascomycota*, subphylum *Saccharomycotina*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycetaceae*, género *Zygosaccharomyces*, especie *Zygosaccharomyces rouxii* (NCBI, 2010).

Las células de *Zygosaccharomyces* son esféricas, elipsoidales o alargadas con gemación multilateral y posible formación de pseudohifas. Las ascosporas son lisas, elipsoidales o esféricas, encontrando de 1 a 4 por asca. *Zygosaccharomyces rouxii* fermenta glucosa y maltosa, asimilando glucosa, trehalosa, glicerol, D-manitol y D-glucitol (Kurtzman, 1998a). Esta levadura es extraordinariamente resistente a los conservantes de uso común en la industria del vino; de hecho, su resistencia al SO<sub>2</sub> parece deberse a su capacidad para sintetizar compuestos extracelulares, como el acetaldehído, que pueden unir sulfitos (Deak y Beuchat, 1996).

La cepa utilizada para este estudio fue *Zygosaccharomyces rouxii* (CECT-1232).

### 3.4. LEVADURAS SECAS ACTIVAS UTILIZADAS EN VINIFICACIÓN

Las Levaduras Secas Activas utilizadas en las microvinificaciones se obtuvieron a partir de preparados comerciales proporcionados por Bio Springer (Francia).

Todas las levaduras pertenecen a la cepa UCLM S377 de esta casa comercial.

Clasificación taxonómica: reino *Fungi*, subreino *Dikarya*, phylum *Ascomycota*, subphylum *Saccharomycotina*, clase *Saccharomycetes*, orden *Saccharomycetales*, familia *Saccharomycetaceae*, género *Saccharomyces*, especie *Saccharomyces bayanus* (NCBI, 2010).

Origen: La cepa UCLM S377 ha sido seleccionada por la Universidad de Castilla La Mancha, para la producción de vinos tintos de gran calidad en condiciones extremas de vinificación.

Aptitudes fermentativas:

- Rápido arranque de la fermentación.
- Cinética fermentativa muy regular.
- Agotamiento total de los azúcares.
- Poder alcoholígeno 15% alc./vol.
- Temperatura de fermentación: de 16 a 35°C.
- Exigencia media en nitrógeno.
- Rendimiento de azúcar/alcohol: 16,5 g/L para 1% alc./vol
- Fuerte resistencia al anhídrido sulfuroso.

Características metabólicas:

- Ausencia de producción de compuestos sulfurosos.
- Baja producción de SO<sub>2</sub>.
- Baja producción de acetaldehído (inferior a 28 mg/L generalmente).
- Fuerte producción de glicerol (10 g/L).

Su lenta cinética fermentativa optimiza los resultados en los vinos de maceraciones largas en fermentación, superiores a 10 días.

### 3.5. TRATAMIENTOS EN CAMPO

La parcela experimental se ubicó en el término municipal de Jumilla, zona más representativa de la D.O. Jumilla, en la Región de Murcia. Una vez identificada de forma adecuada, la parcela se dividió en 7 subparcelas de ensayo (Tabla 3.1.): la primera se mantuvo sin tratamiento de los fungicidas seleccionados (testigo); en las otras seis, se realizaron los tratamientos manteniendo criterios de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), observando los correspondientes plazos de seguridad. Posteriormente se realizaron los tratamientos en las condiciones más desfavorables o Críticas Prácticas Agrícolas (CPA) (6 horas antes de la vendimia).

La parcela experimental no había recibido ningún tratamiento con los fungicidas estudiados y en el momento de la primera aplicación no se detectaron residuos de ningún producto fitosanitario.

**Tabla 3.1.-** Características de las subparcelas experimentales.

<b>Forma de cultivo</b>	Aire libre
<b>Plantación</b>	Por estacas
<b>Antigüedad</b>	14 años
<b>Localización</b>	Paraje Hoya Torres, Jumilla
<b>GPS (°N; °W; m)</b>	38,3492°; 115,334°; 772
<b>Área (m<sup>2</sup>)</b>	225
<b>Marco de plantación (m)</b>	2,5 x 2,5
<b>Nº de cepas / parcela</b>	36

Los ensayos supervisados en uva *Monastrell* para vinificación, se llevaron a cabo en dos años sucesivos. En el primero se realizaron dos tipos de tratamiento: observando buenas prácticas agrícolas y en condiciones adversas; en el segundo, los tratamientos se realizaron únicamente en condiciones adversas. En estos ensayos de campo se aplicaron formulados comerciales de las siguientes materias activas: famoxadona, fenhexamida, fluquinconazol, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin. En la Tabla 3.2., se exponen de forma resumida las características de los formulados, sus dosis de aplicación y los LMRs que presentan en el cultivo.

**Tabla 3.2.-** Formulados de los fungicidas utilizados y dosis de aplicación.

Preparado comercial	Materia activa	LMR (mg/kg)	Dosis (%)	PS (Días)
Equation Pro 22,5% p/p	Famoxadona	2	0,04	28
Teldor 50% p/p	Fenhexamida	5	0,02	14
Castelan 25% p/p	Fluquinconazol	0,05	0,025	21
Stroby 50% p/p	Kresoxim-metil	1	0,025	35
Arius 25% p/v	Quinoxifen	1	0,025	21
Flint 50% p/p	Trifloxistrobin	5	0,015	30

\*PS: plazo de seguridad

La vendimia se realizó en el momento de madurez óptima, vendimiándose en cajas (15 kg) para que la uva no sufra deterioro.

Esta recogida se realizó al azar, tomando muestras de todas las cepas y zonas de las parcelas; incluyendo tanto frutos cubiertos por follaje como aquellos más expuestos a la luz, evitándose los puntos de inicio y final de la aplicación por posibles derivas.

Las muestras fueron recogidas con adecuadas medidas de protección, evitando contaminaciones entre áreas y procurando la mínima manipulación.

En el caso de las muestras destinadas a vinificación se recogieron unos 25 kg de uva para cada una de ellas.

El primer ensayo supervisado realizado en la parcela fue siguiendo el código de BPA (CARM, 2003; FAO, 2003). Para ello, se respetaron dichas normas y las dosis y plazos de seguridad registrados en cada caso. Las dosis aplicadas se encontraban situadas en el intervalo recomendado por el fabricante del fitosanitario.

En los ensayos supervisados bajo CPA, se introdujeron dos condiciones críticas desde el punto de vista de la presencia de residuos: nueva dosis transcurrido el plazo de seguridad y toma de muestra inmediata, de manera que no se respetaron los plazos de seguridad preceptivos en ningún caso. Así, el día que cumplía el plazo de seguridad en el ensayo bajo BPA, y una vez finalizado

éste, se aplicaron otra vez las mismas dosis sobre el cultivo; posteriormente y transcurridas seis horas, se recogieron muestras destinadas a la vinificación en bodega.

Asimismo, se registraron las condiciones ambientales más relevantes (temperatura y humedad relativa) en el momento de la aplicación, medidas en un punto representativo de la parcela, obteniéndose una temperatura media de 23°C y una humedad relativa del 55% para BPA y de 24°C y 45% para CPA. El segundo año de vendimia la aplicación de los fungicidas se realizó solamente en CPA; en este caso la temperatura media y la humedad relativa en el momento de la aplicación fueron de 25°C y del 47% respectivamente.

### 3.6. MICROVINIFICACIONES

Se realizaron microvinificaciones (15 kg), separadamente y por duplicado, para cada tipo de tratamiento de la uva en origen. La elaboración de los vinos se llevó a cabo en la planta piloto de la Bodega San Isidro (Murcia) perteneciente al Consejo Regulador de la D.O. Jumilla. El proceso y la manipulación tuvieron lugar tal y como lo realiza esta bodega en la práctica. Los procesos fueron secuenciales, recogiendo una muestra de 1 kg o 1L al cabo de cada etapa influyente en la disipación de residuos.

Las vinificaciones se realizaron sin adición de levaduras secas activas en el primer año, y con adición de éstas en el segundo. A las uvas despalilladas y estrujadas, se añadieron 80 mg/L de SO<sub>2</sub> para controlar la fermentación. El estrujado se mantuvo en maceración dinámica durante 10 días a una temperatura controlada de 26-28°C.

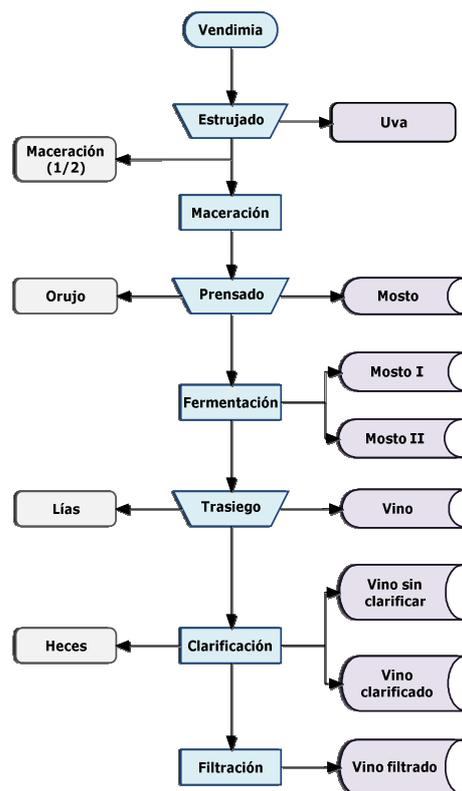
Tras el prensado mecánico y finalizado el periodo de fermentación del mosto (10 días), el vino resultante se trasegó y clarificó utilizando 40 g/hL de bentonita y 8 g/hL de gelatina.

Finalmente, los vinos fueron filtrados a través de filtros de nylon de 0,45 µm de diámetro.

En la Figura 3.2. se expone el diagrama de flujo de la vinificación y los puntos donde se tomaron las muestras para el análisis de residuos, tanto en los

productos líquidos (mostos y vinos), como en los subproductos sólidos o semisólidos (estrujado, orujo, lías y heces de clarificación).

Las muestras de mosto I se tomaron a los 3 días de fermentación, y las correspondientes a mosto II a los seis días de fermentación. La duración total de la fermentación fue de 10 días.



**Figura 3.2.-** Diagrama de flujo de vinificación toma de muestras.

### 3.7. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

En una agricultura moderna, difícilmente se puede prescindir de la utilización de productos fitosanitarios de síntesis para garantizar una producción regular, cuantiosa y de calidad de uva para vinificación. Sin embargo, el uso de estos productos de síntesis, sobre todo fungicidas, puede provocar problemas de contaminación ambiental, presencia de residuos en uvas, mostos y vinos, influencia en la cinética fermentativa y en la calidad organoléptica del vino.

Ante esta situación, las cuestiones inmediatas que se plantean son: cómo pueden influir los residuos de fungicidas en la fermentación (flora levaduriforme) y en qué medida los diversos procesos enotécnicos pueden eliminarlos.

Cada año aparecen nuevas materias activas que rápidamente son utilizadas por los viticultores. Pero, aunque sobre estos productos se realizan multitud de estudios previos a su comercialización, no se encuentran datos referidos a la influencia que puedan tener sobre la flora levaduriforme ni tampoco de los factores de transferencia desde la uva al vino durante la vinificación.

El planteamiento de estudio, por tanto, se articula en tres bloques:

- Estudio 1 (*Disipación de los fungicidas*): pretende conocer la dinámica de desaparición de los seis fungicidas aplicados, tanto en BPA como en CPA, a la uva durante los procesos enotécnicos de la vinificación; y así, conocer los factores de transferencia y niveles finales de sus residuos en los vinos acabados.
- Estudio 2 (*Efecto sobre las levaduras*): mediante ensayos *in vitro*, tipificación y análisis de la evolución de la flora durante la vinificación, se intentan determinar los efectos que los seis principios activos aplicados (famoxadona, fenhexamida, fluquinconazol, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin) pueden tener sobre la flora levaduriforme, principal responsable de la fermentación de los mostos.
- Estudio 3 (*Influencia sobre la calidad organoléptica*): se busca comprobar los efectos que los fungicidas seleccionados ejercen sobre la calidad organoléptica del vino (fracción ácida, azúcares residuales, color, etc).

En la Figura 3.3., se esquematiza el plan de trabajo seguido:

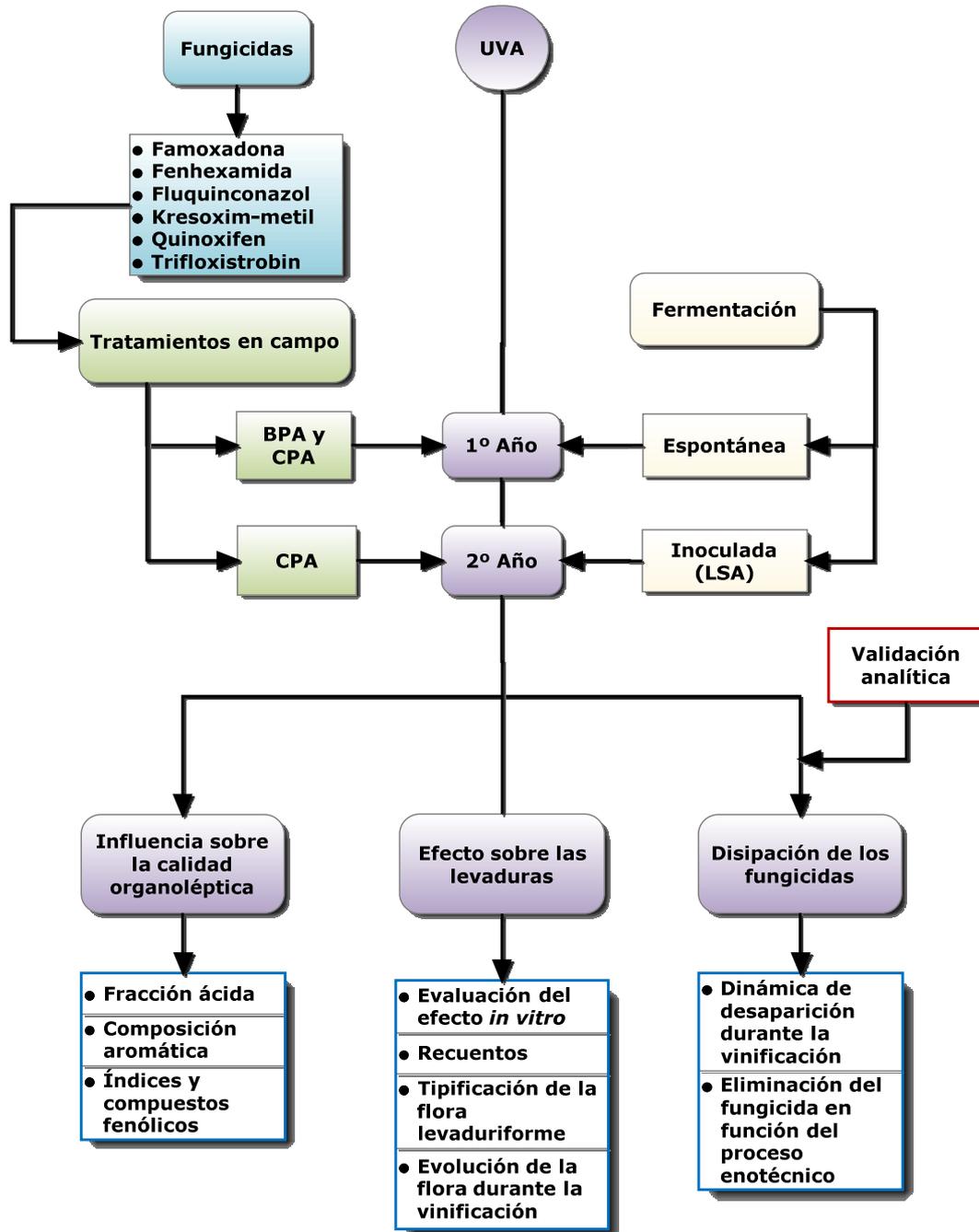


Figura 3.3.- Esquema de realización del trabajo.



## **ESTUDIO 1.- DISIPACIÓN DE LOS FUNGICIDAS**



## 4. ESTUDIO 1.- DISIPACIÓN DE LOS FUNGICIDAS

### 4.1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

El consumo de uva no ocupa un puesto relevante en el presupuesto de las familias españolas ya que es una fruta exclusivamente de temporada y la importación internacional para otras épocas sigue siendo limitada.

La última encuesta de presupuestos familiares publicada por el Instituto Nacional de Estadística (INE), y el análisis del consumo de vino en hostelería y restauración del Ministerio de Agricultura (MARM) muestran un descenso en el consumo de vino, si bien este descenso es más acentuado en vinos rosados y blancos, por ese orden. No obstante, el vino tinto desciende menos que la media; de hecho, en términos de gasto, los vinos tintos incrementan su valor, destacando el aumento de consumo observado en los Vinos de Calidad Producidos en una Región Determinada (VCPRD) (INE, 2010; MARM, 2007).

En la Región de Murcia el viñedo de vinificación y el de uva de mesa presentan proporciones muy similares en la producción regional, con un 46,6% y 53,4% respectivamente (CARM, 2011). Por último, en la elaboración de vinos de nuestra Región, destaca sobre todo la variedad *Monastrell*.

Por tanto, y para estudiar más detalladamente los factores de transferencia entre la uva y el vino, consideramos muy importante conocer el impacto y comportamiento de los residuos de los seis fungicidas objeto de estudio durante la vinificación y en los vinos tintos acabados de *Monastrell* de la D.O. Jumilla.

Para ello se aplicaron al viñedo los correspondientes formulados comerciales de los fungicidas, según criterios de BPA y CPA en ensayos supervisados, con objeto de conocer su disipación durante el proceso de vinificación y la influencia de los diferentes procesos enotécnicos en la eliminación de estos principios activos.

El planteamiento de estudio se representa esquematizado en la siguiente Figura 4.1.

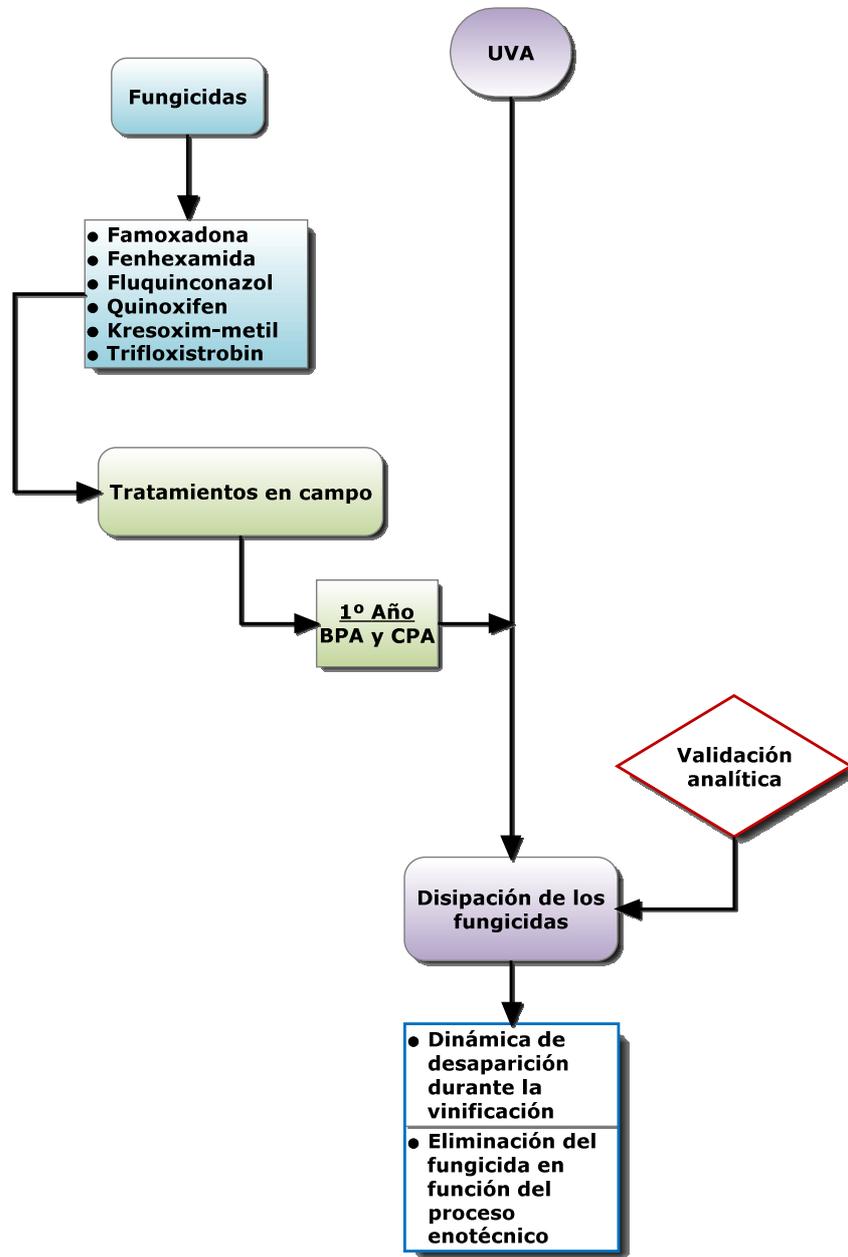


Figura 4.1.- Planteamiento del estudio de disipación de los fungicidas.

## 4.2. ESTÁNDARES Y PRODUCTOS QUÍMICOS

Se utilizaron estándares analíticos de los seis fungicidas, de pureza  $\geq 98\%$ , proporcionados por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania).

Se empleó formiato amónico, de pureza 95%, de Fluka (Buchs, Suiza); sulfato magnésico anhidro, de pureza 97%, de Fluka (Buchs, Suiza); sulfato sódico anhidro, de pureza 99%, de Panreac (Barcelona, España); cloruro sódico, de pureza 99,5%, de Fluka (Buchs, Suiza); citrato disódico sesquihidratado, con pureza de 99%, de Aldrich (Milwaukee, USA) y citrato trisódico dihidratado, con pureza de 99%, de Sigma (St. Louis, USA); ácido fórmico, con pureza 98%-100%, de Merck (Darmstadt, Alemania) (se preparó una disolución de ácido fórmico al 5% v/v en acetonitrilo); amina primaria/secundaria (PSA), de Sigma (St. Louis, USA).

Los disolventes empleados fueron: acetonitrilo de calidad cromatografía líquida, de Scharlau (Barcelona, España); agua milli Q procedente de un sistema Millipore de Purificación Pack QPAK-2 (Billerica, USA); metanol de calidad cromatografía líquida, de Merck (Darmstadt, Alemania); acetona, acetato de etilo y hexano para análisis de residuos, de Panreac (Barcelona, España).

## 4.3. INSTRUMENTACIÓN

### 4.3.1. Determinación de fluquinconazol por CG-ECD

Fluquinconazol se determinó por cromatografía de gases (CG) con detector de captura de electrones  $\text{Ni}^{63}$  (ECD). Se utilizó un integrador HP Vectra VL en combinación con el cromatógrafo de gases (Autosystem Perkin-Elmer). La columna capilar utilizada fue una HP-5 de sílice fundida (Hewlett-Packard) empaquetada con difenil (5%) y metil (95%) siloxano (30 m x 0,32 mm; esto es, un grosor de film de 0,25  $\mu\text{m}$ ). Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 250°C y 320°C respectivamente.

La muestra (2  $\mu\text{L}$ ) se inyectó en modo splitless (45 s), programándose la temperatura del horno de la siguiente forma: 90°C durante 1 minuto, incremento de 90°C a 180°C siguiendo un gradiente programado de 30°C/min, mantenimiento

durante 1 min, incremento de 180°C a 300°C siguiendo un gradiente programado de 15°C/min y mantenimiento durante 10 minutos.

El gas usado como portador y auxiliar fue N<sub>2</sub> en ambos casos, con un flujo de 3 mL/min y 60 mL/min respectivamente.

La duración total del análisis fue de 23 minutos.

#### **4.3.2. Determinación de famoxadona por HPLC-DAD**

Famoxadona se determinó mediante un cromatógrafo líquido modelo 1100 de Agilent Technologies (Waldronn, Alemania) con detector de diode array (DAD). Se utilizó una columna Waters C<sub>8</sub> de fase reversa (4,6 x 250 mm, 5µm).

La fase móvil fue agua/acetonitrilo (30/70) en modo isocrático. Se utilizó un volumen de inyección de 10 µL y una velocidad de flujo de 0,5 mL/min. El análisis se llevó a cabo a una longitud de onda de 230 nm, teniendo una duración total de 15 minutos.

#### **4.3.3. Determinación de kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin por CG-MS/MS**

Kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin se determinaron mediante CG-MS/MS, utilizando un cromatógrafo Agilent (Santa Clara, CA, EE.UU.) 6890N equipado con un inyector automático Gerstel (Mülheim, Alemania) MPS2 y un Gerstel KAS 4 PTV. La separación se realizó en columna capilar (30 m x 0,25 mm) J&W Scientific de Agilent recubierta con film (0,25 µm) de DB-5MS y 10 m de Duraguard. El cromatógrafo se acopló a un detector MS/MS Quattro Micro de Waters (Milford, MA, EE.UU.)

La temperatura de la columna se mantuvo a 40°C durante 2 min; pasado este tiempo se elevó hasta 220°C a un ritmo constante de 30°C/min; posteriormente la temperatura se eleva hasta 260°C (5°C/min) para finalmente alcanzar 280°C (20°C/min), que se mantendrán durante 15 min. El tiempo total de análisis fue de 32 minutos a un flujo constante de 2 mL/min.

El inyector PTV se mantuvo a 50°C durante la inyección y durante otros 0,8 minutos tras la inyección de 3 µL de extracto. La ventilación del disolvente se

llevó a cabo a esta temperatura, manteniendo un flujo de helio de 20 mL/min a 5 kPa durante 0,5 min y abriendo la válvula de purga. Tras cerrar la válvula de purga, la temperatura del inyector se elevó hasta 300°C a la máxima velocidad (12°C/s), manteniéndose durante 5 min; pasado este tiempo la temperatura disminuye hasta 280°C y se mantiene durante 5 min. El split se volvió a abrir dos minutos después de la inyección para purgar el inyector. El inyector se enfrió para el siguiente análisis utilizando un Peltier.

Los gases utilizados fueron helio (pureza  $\geq 99,999\%$ ) como portador y argón como gas de colisión. La energía de ionización del MS fue de 70 eV, la temperatura de la fuente de iones fue de 200°C y la de la interfase CG-MS/MS de 280°C.

Con el fin de determinar los parámetros de adquisición MS/MS óptimos para cada fungicida, se llevó a cabo un barrido completo de espectros para cada fungicida, seleccionando los iones padre más adecuados en base a su intensidad y masas.

Se obtuvieron de esta forma dos o tres transiciones de masas para cada compuesto, una de las cuales fue utilizada para la cuantificación (Tabla 4.1.).

**Tabla 4.1.-** Transiciones de masas obtenidas de cada compuesto.

Fungicida	Transiciones de masas		
	Cuantificación	Confirmación	Confirmación
Kresoxim-metil	206 > 116	206 > 131	---
Quinoxifen	307 > 272	307 > 237	307 > 208
Trifloxistrobin	222 > 190	222 > 162	222 > 130

#### 4.3.4. Determinación de fenhexamida por CL-MS/MS

Fenhexamida se identificó mediante CL-MS/MS. Para ello se utilizó un cromatógrafo HPLC 1200 de Agilent acoplado a un detector MS/MS API 4000 Qtrap de Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.). La separación se llevó a cabo en una columna C<sub>18</sub> Aqua (150 mm x 2 mm, 3µm de tamaño de partícula) de Phenomenex (Torrance, CA, EE.UU.)

Se utilizó fase móvil en gradiente, con dos componentes A: agua/formiato amónico 5 mM y B: metanol/formiato amónico 5 mM, con un flujo de 300 µL/min.

El gradiente comenzó con un 100% de A en el momento de la inyección, alcanzando progresivamente 60% de A (40% B) en 3 minutos, y posteriormente 10% de A (90% B) a los 22 minutos después de la inyección.

Esta proporción se mantuvo durante 8 minutos y luego se restauraron las condiciones iniciales en 0,1 min, manteniéndose hasta 38 minutos después de la inyección.

La temperatura de la columna fue de 40 °C y el volumen de inyección de 5 µL. La detección por MS se realizó en MRM (multiple reaction monitoring) y la fuente fue ESI (electrospray ionization) en modo positivo. El voltaje de ionización fue de 5500V, el gas nebulizador fue aire sintético a 60 psi y el gas de cortina nitrógeno a 30 psi. La evaporación del disolvente en la fuente se llevó a cabo con la ayuda de un gas de secado (aire sintético caliente a 420°C/50psi).

La solución estándar de fenhexamida se infundió directamente en el cromatógrafo para obtener las transiciones óptimas, que fueron 302 > 97 y 302 > 55.

#### 4.4. EXTRACCIÓN

##### 4.4.1. Extracción de fluquinconazol y famoxadona

Se homogeneizaron 5 mL de cada muestra a 8000 rpm durante 2 min en un homogeneizador de alta velocidad (Polytron-Aggregate, Kinematica, Alemania) con 20 mL de acetona. Una vez homogéneo se añadieron 20 mL de acetato de etilo/hexano (1:1 v/v) y 10 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La mezcla se homogeneizó durante 2 min en un Polytron.

La mezcla homogénea se filtró mediante filtros de papel separador de fases de 150 mm de diámetro, de Filtros Anolia (Barcelona, España). El filtro se lavó con 10 mL de la mezcla de disolventes.

Se recogieron todas las fracciones en un matraz concentrador y se llevaron hasta sequedad mediante un evaporador rotatorio a vacío. Para la determinación de famoxadona, el extracto seco se disolvió en 5 mL de acetonitrilo; en el caso de fluquinconazol, la disolución se hizo en 5 mL de hexano/acetato de etilo (9:1 v/v).

No fue necesario realizar ninguna limpieza ni purificación.

#### 4.4.2. Extracción de fenhexamida, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin por método QuEChERS

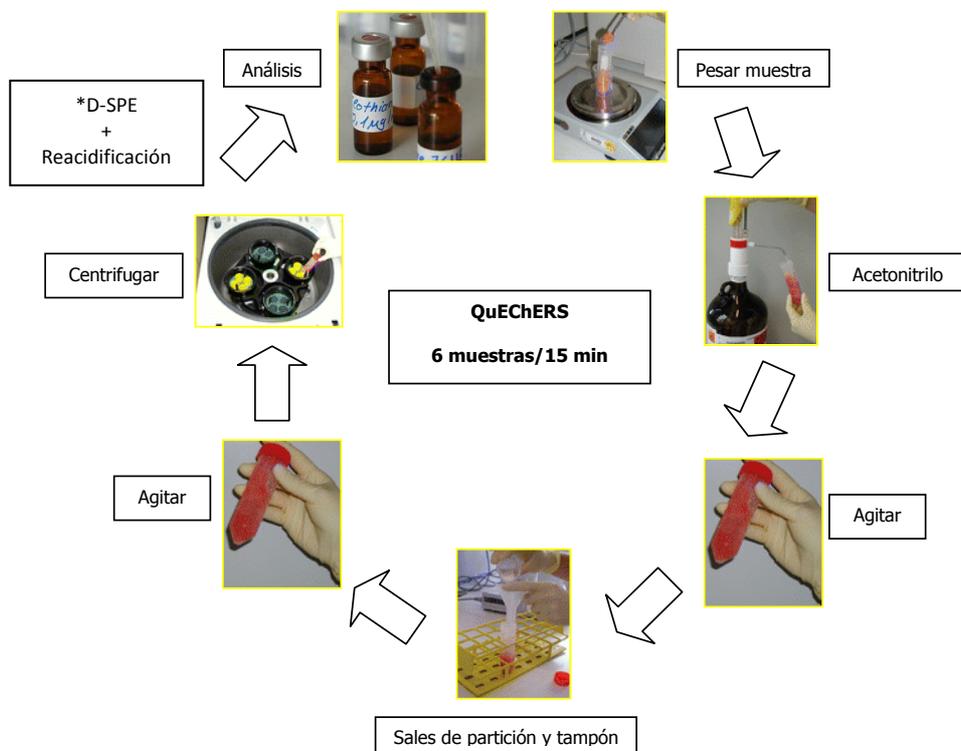
La extracción y partición de fenhexamida, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin se llevó a cabo de acuerdo con la versión modificada del método QuEChERS descrita por (Anastassiades *et al.*, 2003, 2007; European Committee for Standardization, 2007). En la Figura 4.2. se muestra un diagrama esquemático del procedimiento.

La extracción se realizó a partir de  $10 \pm 0,1$  g de matriz congelada en tubos de centrífuga de 50 mL de polipropileno. Se añadieron 10 mL de acetonitrilo. El tubo se cierra y se agita a mano vigorosamente durante 1 minuto.

Para inducir la separación de fases y la partición, a la suspensión anterior se añade una mezcla de sales tampón y de partición que consta de 4 g de sulfato de magnesio anhidro, 1 g de cloruro de sodio, 0,5 g de citrato disódico sesquihidratado y 1 g de citrato trisódico dihidratado. El tubo se cierra y se agita a mano enérgicamente durante 1 min. A continuación se centrifuga a 3500 rpm durante 5 min. Los extractos destinados a CL-MS/MS se pueden analizar directamente, mientras que los destinados a CG-MS/MS deben pasar por un proceso de limpieza previo con D-SPE (Dispersive-SPE).

Para la limpieza con D-SPE se transfiere una alícuota de la fase orgánica a un tubo de centrífuga de polipropileno que contiene 25 mg de PSA y 150 mg de sulfato de magnesio por cada mL de extracto. El tubo se cierra, se agita a mano vigorosamente durante 30 segundos y se centrifuga a 3500 rpm durante 5 min. Tras la purificación con PSA, los extractos se reacidifican para proteger a los fungicidas sensibles a la degradación por altos valores de pH. Para ello, se transfiere una alícuota del extracto purificado a un vial con tapón de rosca al que se añaden 10  $\mu$ L de ácido fórmico al 5% por cada mL de extracto.

En la siguiente figura se esquematiza el método QuEChERS empleado para la extracción de fenhexamida, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin.



\*para aquellas muestras analizadas por CG-MS/MS

**Figura 4.2.-** Diagrama del método QuEChERS empleado (fuente: adaptación de [www.springerlink.com](http://www.springerlink.com)).

#### 4.5. VALIDACIÓN ANALÍTICA

La validación se llevó a cabo bajo la normativa europea ISO 17025 y las recomendaciones de la guía SANCO (ISO 17025:2005; DG SANCO, 2010).

##### 4.5.1. Identificación, confirmación y cuantificación

La identificación de las materias activas se realiza por comparación de los tiempos de retención ( $t_R$ ) encontrados en la muestra con los de un patrón externo, inyectados ambos en el sistema cromatográfico con las mismas condiciones analíticas. Se admitirán como identificaciones positivas las que tengan un rango de  $t_R \pm 2\%$ .

Para la confirmación en los determinados por masas, se consideró que los fungicidas cumplen los criterios de confirmación si los tiempos de retención y los ratios de la abundancia de los iones hijos se encuentran dentro de los límites esperados, tal como se describe en el (DG SANCO, 2010). La desviación aceptable en el tiempo de retención fue 0,5% en CG y 2,5% en CL. La desviación máxima aceptable en las intensidades relativas de iones entre las señales de target y las de los iones de clasificación fueron como sigue: para CL-MS  $\pm 20\%$  cuando el área de señal del más pequeño de los dos picos era mayor del 50% de la del más grande;  $\pm 25\%$  si la relación es 20%-50%;  $\pm 30\%$  para 10%-20% y  $\pm 50\%$  si la señal del ión menor era  $\leq 10\%$  de la señal del ión mayor. Para CG-MS  $\pm 10\%$  cuando el área de señal del más pequeño de los dos picos era mayor del 50% de la del más grande;  $\pm 15\%$  si la relación es 20%-50%;  $\pm 20\%$  para 10%-20% y  $\pm 50\%$  si la señal del ión menor era  $\leq 10\%$  de la señal del ión mayor.

En el caso del detector DAD, la confirmación de los analitos se realizó mediante el análisis de su espectro, siendo válida la confirmación si el espectro tiene una pureza superior a 0,990.

Para MS, primero se seleccionaron las transiciones MRM y energías de colisión más óptimas, y se confirmó mediante espectro de masas, siendo el criterio de aceptación que los dos iones mayoritarios superaran una abundancia de 5000.

Para los extractos analizados por HPLC-DAD, la cuantificación se realizó por área cromatográfica, mediante la comparación con patrón externo, preparados en el mismo disolvente que los extractos. Para CL-MS/MS, el criterio también fue el área cromatográfica, mediante comparación con patrón externo, pero esta vez preparados en matriz en blanco.

La selectividad y especificidad se estudiaron mediante el método de adiciones, que se basó en adicionar una cantidad conocida de materia activa, equivalente a una concentración en muestra entre 0,05 mg/kg y 2 mg/kg, a extractos de la materia vegetal objeto de estudio y posteriormente, se comparó la respuesta de la muestra, que contiene posibles interferencias, con el resultado o respuesta de un patrón de la misma concentración, sin observar diferencias significativas entre ambas.

#### 4.5.2. Linealidad de respuesta del detector

La linealidad de respuesta de los detectores se determinó con cinco puntos de calibración y una sola inyección de cada uno, para cada materia activa. El ajuste lineal de los datos a una curva de regresión se evaluó mediante el método de mínimos cuadrados, aceptando la linealidad de respuesta del detector entre las concentraciones inyectadas siempre que el coeficiente de correlación lineal ( $r^2$ ) fuera superior a 0,98 y la desviación estándar  $< 20\%$  para los factores de respuesta. La recta de regresión no fue forzada a pasar por el origen.

#### 4.5.3. Límites de detección y de cuantificación

Para cada materia activa se calculó el límite de detección (LD) como la menor cantidad de disolución patrón que fue detectada en las condiciones experimentales del instrumento utilizado, teniendo en cuenta que la respuesta presentara una relación señal/ruido mayor de 3.

El límite de cuantificación (LQ) se calculó para cada uno de los productos objeto de análisis en las matrices seleccionadas, determinando la menor concentración de materia activa presente en el extracto vegetal cuya respuesta en el cromatograma fue cuantificable sin error, es decir que se puede cuantificar con exactitud y precisión (relación señal/ruido  $> 10$ ).

#### 4.5.4. Precisión y exactitud

La repetibilidad permite determinar el grado de concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas de forma independiente, para un mismo tipo de muestra, bajo unas mismas condiciones experimentales, y por un mismo operador. Se evalúa mediante la obtención del coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) de estos resultados. Para el cálculo de este parámetro se realizaron de forma consecutiva cinco inyecciones de un mismo estándar preparado a la menor y mayor concentración del rango de linealidad del plaguicida y lo mismo se realizó para muestras fortificadas. Los resultados obtenidos fueron sometidos a tratamiento estadístico y el criterio de aceptación fue que el valor de RSD obtenido fuese  $\leq 20\%$ .

La reproducibilidad permite determinar el grado de concordancia entre los resultados de mediciones obtenidas de forma independiente, para un mismo tipo de muestra, bajo las mismas condiciones experimentales pero a distinto tiempo o por distintos operadores. Típicamente, la reproducibilidad se evalúa en comparaciones interlaboratorios, con distintos operadores. Sin embargo, se acepta generalmente que este aspecto sea evaluado intra-laboratorio, mediante evaluación de los resultados de los controles de calidad del laboratorio y su variabilidad, suponiendo que, a lo largo del tiempo ha podido haber cambios en material o instrumentación que afectara al resultado de los análisis.

Se aceptó la reproducibilidad intra-laboratorio como válida cuando el RSD fue  $\leq 20\%$  en patrones y recuperaciones y además el valor medio de las últimas estaba comprendido entre 70-120%.

La exactitud o porcentaje de recuperación del analito de la matriz vegetal mediante el método de extracción se evalúa con la realización de fortificaciones comprendidas en el rango lineal. Así, se prepararon cinco réplicas a las concentraciones menor y mayor del rango lineal y se hallaron sus recuperaciones respecto de patrones preparados a las mismas concentraciones y analizados todos en la misma secuencia. El criterio de aceptación fue que la recuperación media para cada conjunto de cinco réplicas estuviese comprendida entre 70-120% con un  $CV \leq 20\%$ .

### Control de calidad

El control de calidad interno se llevó a cabo de manera rutinaria, incluyendo en cada secuencia de análisis tres puntos de calibración, análisis de blancos de disolvente y blancos de muestra y fortificaciones a la concentración mayor y menor del rango. Además, el blanco de disolvente fue inyectado a lo largo de las secuencias en aquellos puntos donde había más probabilidad de efectos de arrastre. Los datos obtenidos se revisaron en búsqueda de contaminaciones e interferencias y en particular, las recuperaciones y calibraciones sirvieron para examinar la reproducibilidad intra-laboratorio.

## 4.6. RESULTADOS

### 4.6.1. Resultados de validación

Tal y como se describió en el apartado anterior, la validación de la metodología analítica se llevó a cabo bajo la normativa europea ISO 17025 y las recomendaciones de la guía SANCO (ISO 17025:2005; DG SANCO, 2010). Los parámetros estudiados en la validación de la metodología fueron: linealidad de respuesta, precisión, exactitud, rango de trabajo y límite de cuantificación.

En la Tabla 4.2. se exponen los límites de cuantificación establecidos para cada uno de los fungicidas ensayados. En todos los casos, estos límites fueron iguales o inferiores a los LMRs establecidos para estos compuestos en uva de vinificación por la legislación europea.

**Tabla 4.2.-** Límites de cuantificación establecidos para cada fungicida.

Fungicida	Límite de cuantificación (ppm)
Famoxadona	0,05
Fenhexamida	0,01
Fluquinconazol	0,05
Kresoxim-metil	0,01
Quinoxifen	0,01
Trifloxistrobin	0,01

En todo el proceso de validación, el intervalo de concentración ensayado fue 0,05-0,2 mg/kg para fluquinconazol y trifloxistrobin, y 0,01-0,2 mg/kg para el resto de fungicidas ensayados.

Así, la linealidad de respuesta del detector se estudió en este rango; precisión y exactitud fueron estudiadas en 0,01 mg/kg, excepto famoxadona y fluquinconazol que fueron a 0,05 mg/kg, y 0,2 mg/kg en series de medidas (n=5), empleándose multipatrones para fortificar las muestras en blanco previamente analizadas. En la Tabla 4.3. se muestran los resultados obtenidos.

En todos los casos, el coeficiente de regresión es superior a 0,99, la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) presenta coeficientes de variabilidad inferiores al 15% en series de medidas (n=5).

Como se muestra, los niveles validados (0,01 a 0,2 ppm) abarcaron los LMRs fijados en uva de vinificación (rango 0,05-1 mg/kg). El límite de cuantificación fue siempre igual o inferior al LMR establecido. Los coeficientes de correlación lineal fueron  $\geq 99\%$ , indicando una respuesta lineal del detector adecuada para cada fungicida en el intervalo analítico estudiado. La precisión mostró valores de CV inferiores a 11%, con el 75% de los valores por debajo de 6. La recuperación media se mantuvo entre 70%-100% si bien las de kresoxim-metil a 0,01 ppm y fenhexamida a 0,2 ppm fueron de 101% y 104% respectivamente.

#### Controles de calidad

La recuperación de los analitos fortificados en vino, mosto y uva en dos niveles (límite de cuantificación y valor superior del rango de trabajo) estuvo en todos los casos entre el 70%-110%. En la Tabla 4.4., se pueden observar los valores medios.

Las inyecciones de blancos de matriz y disolvente, incluidas en las secuencias de análisis de las muestras, confirmaron la ausencia de contaminaciones o interferencias.

Tabla 4.3.- Resultados de la validación analítica

Matriz/Fungicida	Parámetros (%)	R <sup>2</sup>	CV		CV		Recuperación media	
			Repetibilidad	Reproducibilidad	Repetibilidad	Reproducibilidad		
	Nivel (ppm)	0,01-0,2	0,01	0,2	0,01	0,2	0,01	0,2
	Famoxadona*	1	1,9	0,3	4,8	0,5	79,3	70,6
	Fenhexamida	0,99	2,1	3,6	2,1	3,6	93	104
	Fluquinconazol*	0,99	10,7	5,3	9,2	6,1	72,9	76
	Kresoxim-metil	0,99	6	4	6	4	101	100
	Quinoxifen	0,99	1	1,2	1	1,2	99	98
	Trifloxistrobin	1	5,2	0,4	5,2	0,4	94	99

\* Rango de trabajo 0,05-0,2

Tabla 4.4.- Media de los resultados de los controles de calidad analizados.

Fungicida	Famox.	Fenhex.	Fluquin.	Kresoxim-m.	Quinox.	Triflox.
Nivel (ppm)	0,05	0,2	0,01	0,2	0,05	0,2
Recuperación media (%)	79,3	70,6	93	104	72,9	76
				101	99	98
				100	99	98
				101	99	94
				100	99	94

#### 4.6.2. Dinámica de desaparición durante la vinificación

En las Figuras 4.3. y 4.4. se representan los residuos encontrados, expresados en cantidad (mg), y calculados según los pesos y volúmenes de uva, orujo, vino, lías y heces para cada fungicida.

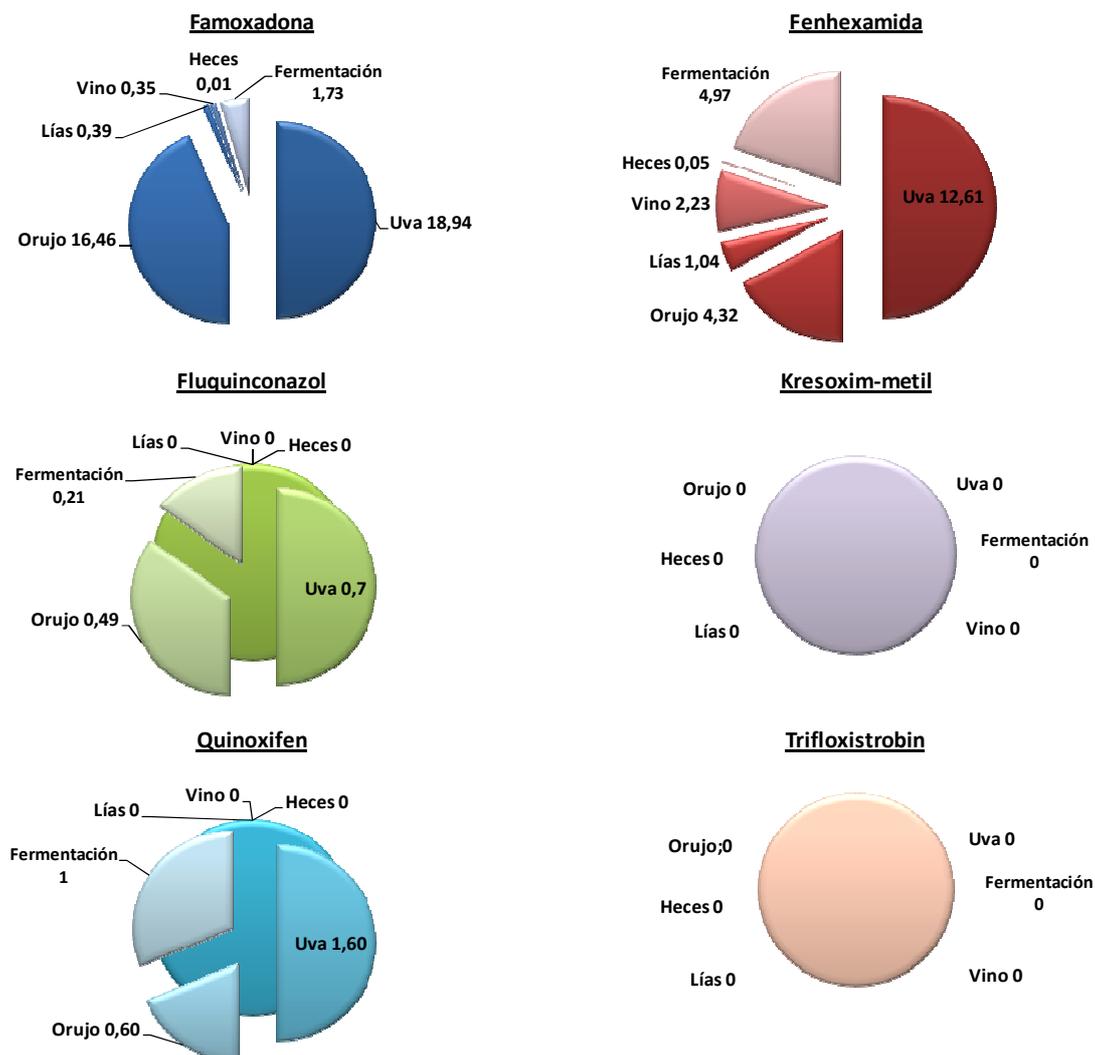


Figura 4.3.- Residuos (mg) encontrados en la vinificación bajo BPA.

En la experiencia realizada bajo condiciones de BPA, los residuos de los seis fungicidas ensayados no superaron en ningún caso los LMRs legislados para uva por la Comisión Europea durante el proceso de vinificación.

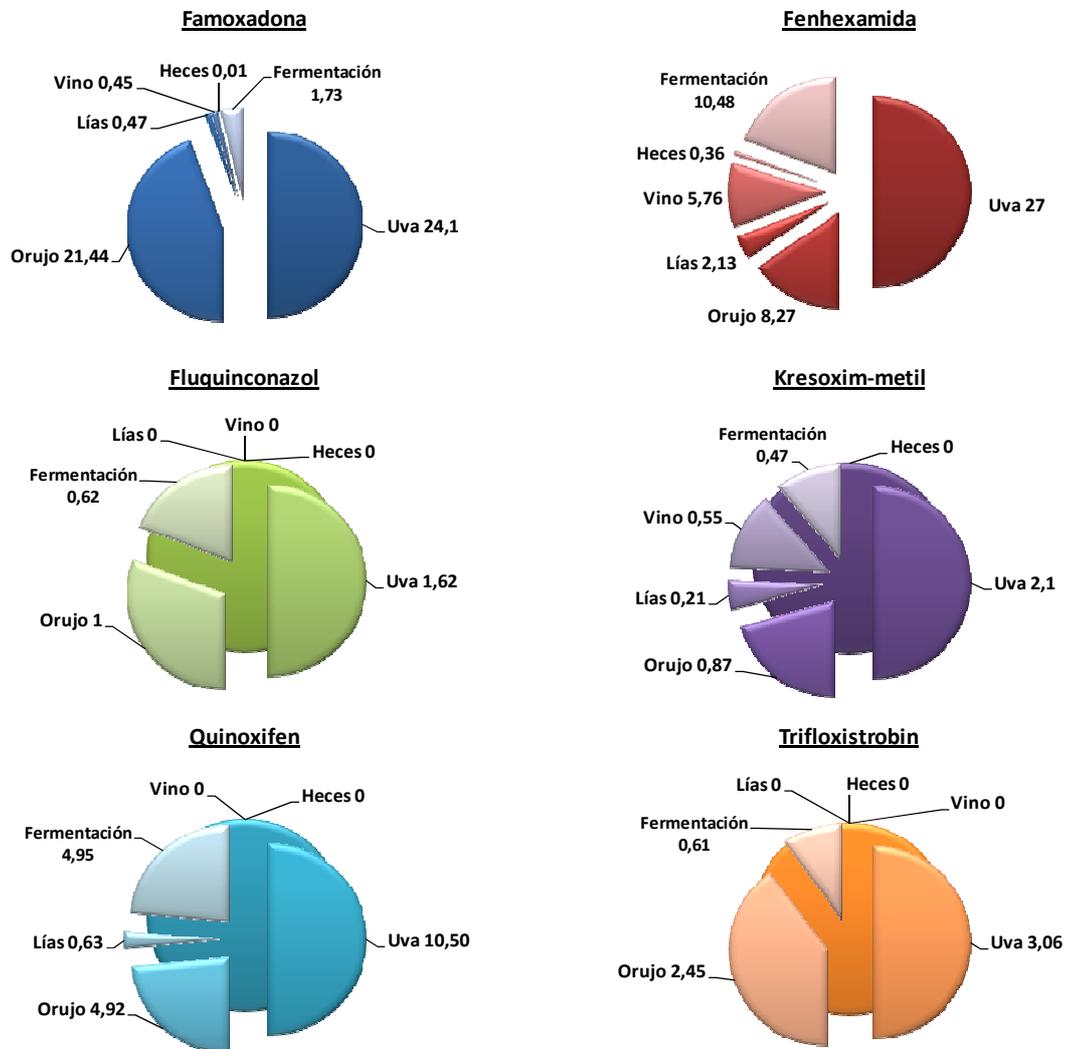
Se observa también la disipación de los residuos a lo largo del proceso de vinificación y su acumulación mayoritaria en el orujo. Un punto importante de disipación es el proceso fermentativo, destacando los casos de fenhexamida y quinoxifen, dónde la cantidad de fungicida eliminado durante la fermentación supera ligeramente a la contenida en los orujos. De hecho, en las muestras tratadas con fluquinconazol y quinoxifen, los residuos se distribuyen en su totalidad entre la cantidad arrastrada por el orujo y la disipada en el proceso de fermentación, no detectándose residuo alguno en las muestras de vino, lías y heces.

Por otro lado, cabe destacar la ausencia total de residuos en las vinificaciones correspondientes a las muestras tratadas con kresoxim-metil y trifloxistrobin respectivamente.

Así, de los seis principios, solamente en el caso de famoxadona y fenhexamida quedan residuos en el vino.

Para la experiencia realizada en condiciones de CPA, únicamente fluquinconazol superó los LMRs en uva, distribuyéndose la totalidad de los residuos entre la cantidad arrastrada por el orujo y la disipada durante la fermentación.

De esta forma, no se encontraron residuos en las muestras de vino, lías y heces.



**Figura 4.4.-** Residuos (mg) encontrados en la vinificación bajo CPA.

Al igual que ocurre cuando se aplican buenas prácticas agrícolas, se observa la disipación de los residuos a lo largo del proceso de vinificación y la acumulación mayoritaria en el orujo.

Asimismo el proceso fermentativo constituye otro punto importante en la disipación de los residuos, superando, en los casos de fenhexamida y quinoxifen, la cantidad eliminada en fermentación a la retenida por los orujos.

Finalmente, en la vinificación de las muestras tratadas con trifloxistrobin bajo CPA, los residuos se distribuyeron entre la cantidad arrastrada por el orujo y la disipada por fermentación. Así, las muestras de vino, lías y heces no presentaron residuo alguno de fungicida.

De esta forma fluquinconazol, quinoxifen y trifloxistrobin desaparecen en el vino, mientras que para el resto quedan remanentes comprendidos entre el 2 y el 26%.

Las Figuras 4.5. a 4.10. muestran la evolución de los distintos fungicidas ensayados a lo largo del proceso de vinificación, tanto en BPA como en condiciones desfavorables.

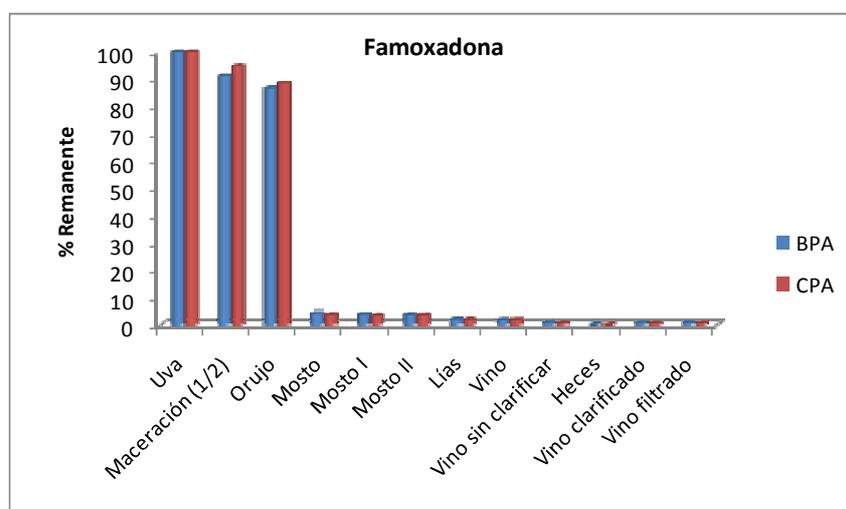
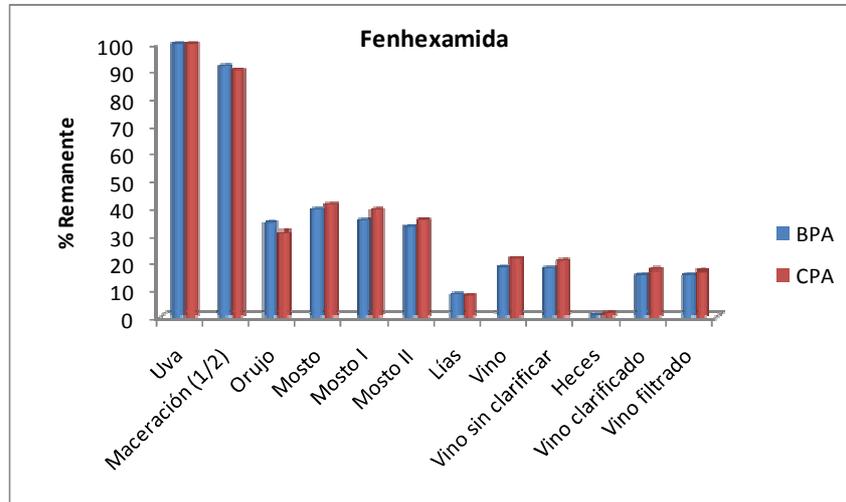
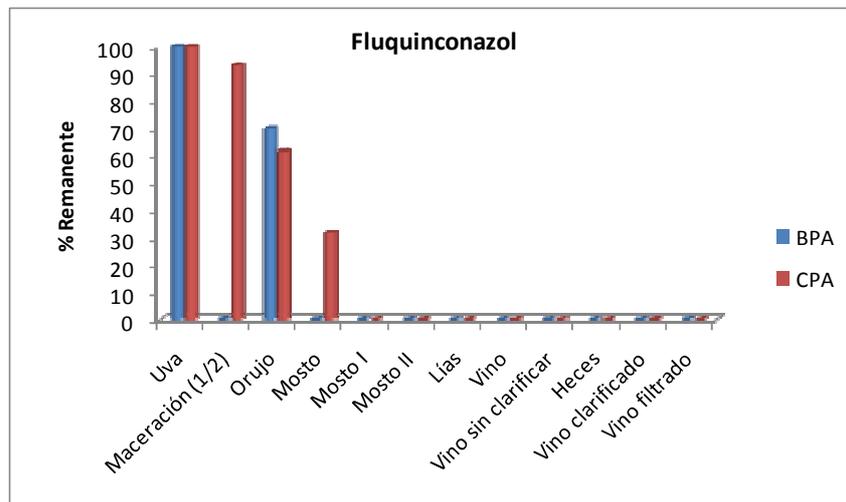


Figura 4.5.- Evolución de los residuos de famoxadona durante la vinificación.



**Figura 4.6.-** Evolución de los residuos de fenhexamida durante la vinificación.

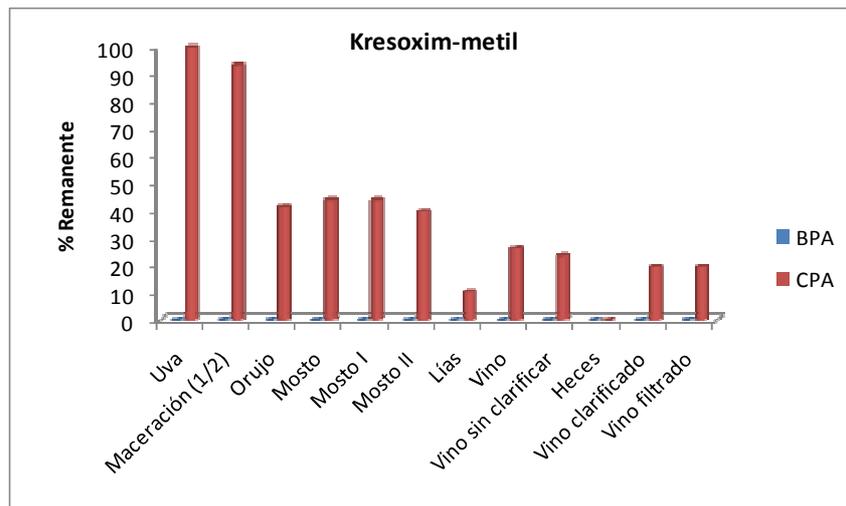
En los casos de famoxadona y fenhexamida, no existen apenas diferencias en la disipación de los fungicidas a lo largo de la vinificación, tanto si la aplicación se hace en BPA como si se lleva a cabo en condiciones adversas.



**Figura 4.7.-** Evolución de los residuos de fluquinconazol durante la vinificación.

En la vinificación de las muestras tratadas con fluquinconazol bajo las directrices de unas buenas prácticas agrícolas, la mayor eliminación se encuentra asociada al orujo, que arrastra casi un 80% del fungicida. De hecho, a partir de este punto se observa ausencia de fungicida en el resto de las muestras analizadas.

Por otra parte, cuando se vinifican las muestras tratadas en condiciones desfavorables la mayor eliminación sigue ligada al orujo, que se lleva más de un 60% del fungicida. Así, sólo en la primera muestra de mosto encontramos restos de fungicida, desapareciendo por completo en el resto.

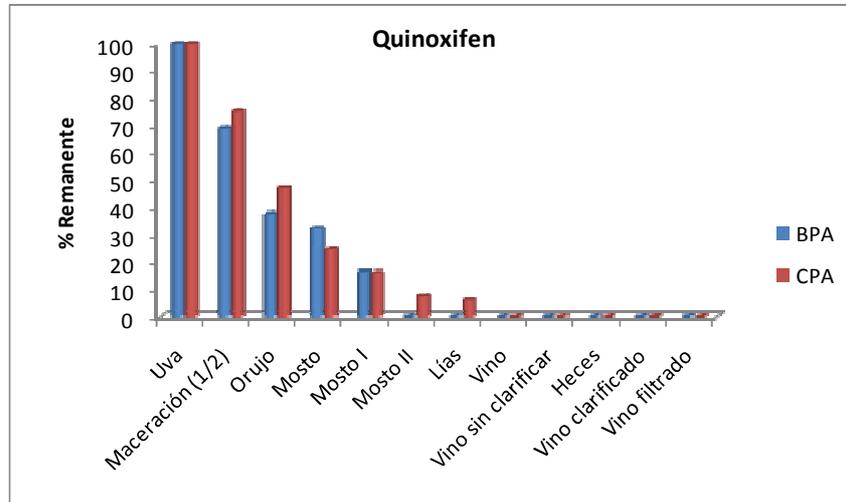


**Figura 4.8.-** Evolución de los residuos de kresoxim-metil durante la vinificación.

En las muestras tratadas con kresoxim-metil siguiendo condiciones de BPA destaca, como se indicó anteriormente, la ausencia total de fungicida a lo largo del proceso de vinificación

Sin embargo sí que se encuentran residuos de fungicida cuando se procesan las muestras tratadas en condiciones desfavorables. En estas condiciones la eliminación de fungicida con el orujo llega sólo a un 40%.

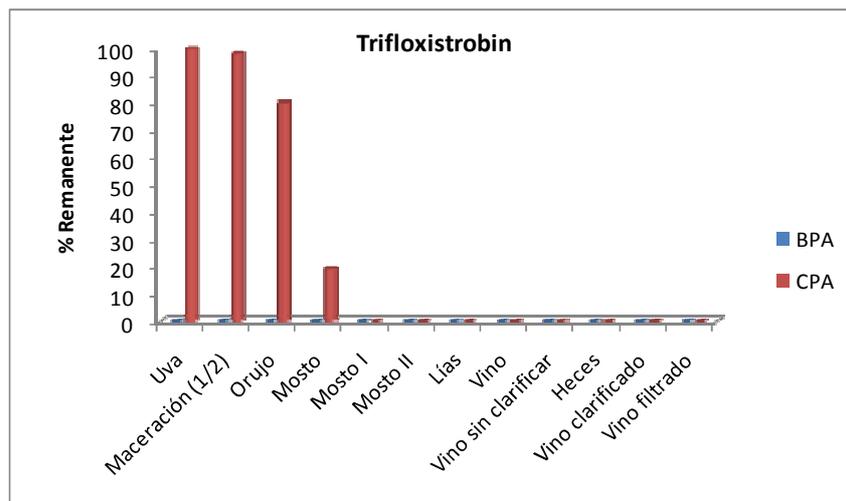
El análisis del resto de muestras presenta un patrón de disipación normal, destacando la ausencia de fungicida en las heces y los remanentes encontrados en el vino final, que son los más altos de todos los fungicidas ensayados.



**Figura 4.9.-** Evolución de los residuos de quinoxifen durante la vinificación.

En el caso de quinoxifen no existen apenas diferencias en la disipación del fungicida, tanto si se aplica en BPA, como si se hace en condiciones adversas.

La única diferencia destacable se encuentra en la ausencia de quinoxifen en mosto II y lías cuando se aplican BPA mientras que en CPA aún quedan remanentes cercanos al 10%.



**Figura 4.10.-** Evolución de los residuos de trifloxistrobin durante la vinificación.

Encontramos ausencia total de fungicida en todas las muestras ensayadas cuando se aplican BPA.

En condiciones adversas la mayor eliminación se produce unida al orujo, que arrastra el 80% del fungicida.

#### 4.6.3. Eliminación del fungicida en función del proceso enotécnico

Tal y como se ha podido observar al estudiar la disipación de los fungicidas a lo largo de la vinificación, la mayor eliminación se produce cuando se separan los orujos del mosto.

Así, si nos centramos en los residuos retenidos por las partes sólidas obtenidas durante la vinificación (orujo, lías y heces), éstas pueden ordenarse según su concentración en: **orujo > lías > heces**, a excepción en fenhexamida (Tabla 4.5.).

Por otro lado, no se encontraron residuos superiores a los LMRs en los productos líquidos: mostos y vinos (Tabla 4.6.).

**Tabla 4.5.-** Residuos de fungicidas (ppm) encontrados en los subproductos sólidos en condiciones de BPA y CPA.

Residuos (ppm)	Orujo		Lías		Heces	
	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA
<b>Famoxadona</b>	4,84	5,79	0,14	0,17	0,10	0,10
<b>Fenhexamida</b>	1,14	2,43	0,35	0,85	0,25	3,60
<b>Fluquinconazol</b>	0,11	0,26	< LQ	0,12	< LQ	< LQ
<b>Kresoxim-metil</b>	< LQ	0,21	< LQ	0,08	< LQ	< LQ
<b>Quinoxifen</b>	0,19	1,26	0,02	0,21	< LQ	< LQ
<b>Trifloxistrobin</b>	< LQ	0,49	< LQ	0,10	< LQ	< LQ

LQ. Límite de cuantificación

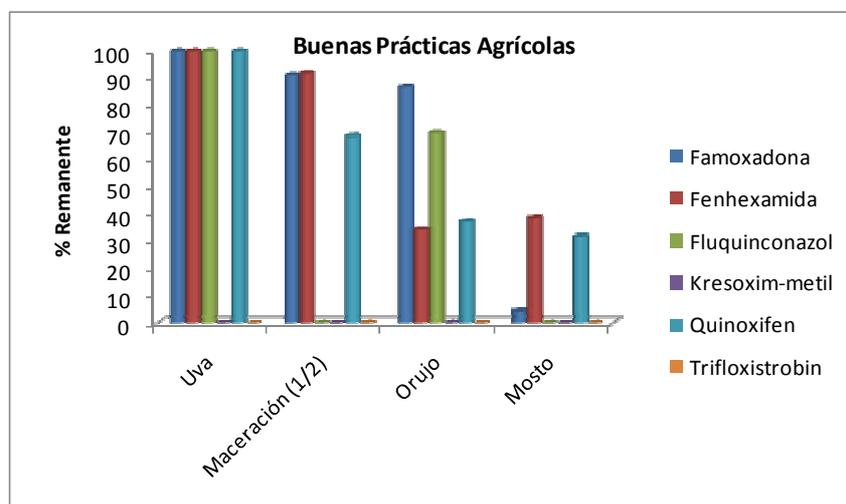
Tabla 4.6.- Residuos de fungicidas (ppm) encontrados en los productos líquidos.

Residuos (ppm)	Famox.		Fenhex.		Fluquin.		Kresox.		Quinox.		Triflox.	
	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA
Mosto	0,10	0,11	0,51	1,28	< LQ	0,05	< LQ	0,1	0,08	0,29	< LQ	0,05
Mosto I	0,10	0,10	0,46	1,22	< LQ	< LQ	< LQ	0,1	0,04	0,19	< LQ	< LQ
Mosto II	0,09	0,10	0,43	1,11	< LQ	< LQ	< LQ	0,09	< LQ	0,09	< LQ	< LQ
Vino	0,07	0,08	0,36	1,01	< LQ	< LQ	< LQ	0,09	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Vino S.C.	0,03	0,03	0,35	0,96	< LQ	< LQ	< LQ	0,08	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Vino C.	0,03	0,03	0,32	0,83	< LQ	< LQ	< LQ	0,07	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Vino F.	0,03	0,03	0,32	0,80	< LQ	< LQ	< LQ	0,07	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ

LQ. Límite de cuantificación; Vino S.C: vino sin clarificar; Vino C: vino clarificado; Vino F: vino filtrado.

Como puede observarse en las Figuras 4.11. y 4.12. a lo largo de los procesos de maceración y prensado tiene lugar una disminución progresiva de los contenidos residuales de fungicidas, excepto en los casos de kresoxim-metil y trifloxistrobin, ya que éstos no presentan residuos en la uva cuando la aplicación se lleva a cabo siguiendo buenas prácticas agrícolas.

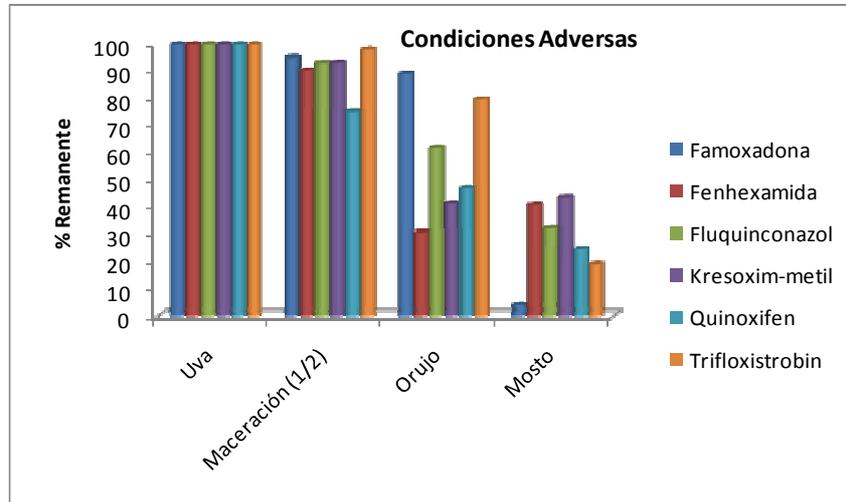
Durante la fase de maceración, en condiciones de BPA, desaparecen el 8,92% de famoxadona y el 8,25% de fenhexamida, así como el 31,25% de quinoxifen.



**Figura 4.11.-** Disipación de los residuos en maceración y prensado aplicando BPA.

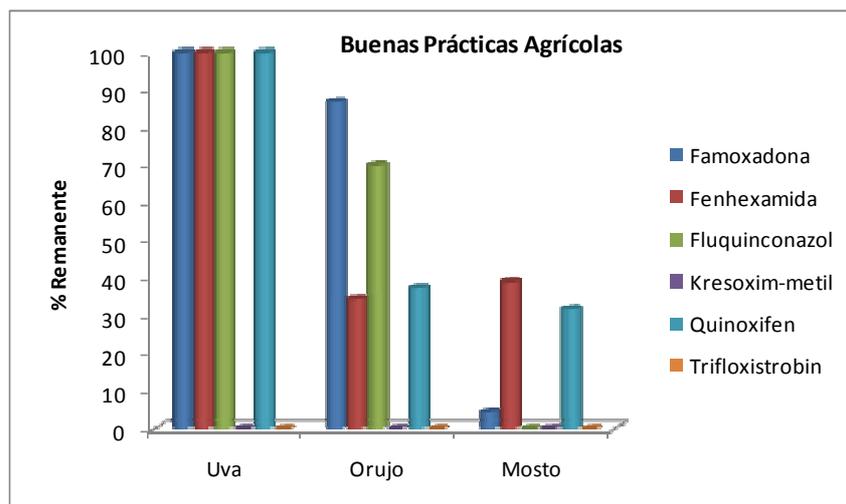
En la vinificación de las muestras sometidas a CPA, la eliminación durante el macerado de famoxadona y quinoxifen es menor (4,9% y 24,95% respectivamente). Fenhexamida, por su parte, aumenta su eliminación (9,78%).

En lo que se refiere a fluquinconazol, kresoxim-metil y trifloxistrobin, que no presentaban residuos en maceración, eliminan en este proceso un 6,79%, 6,67% y 1,96% respectivamente.



**Figura 4.12.-** Disipación de los residuos en maceración y prensado aplicando CPA.

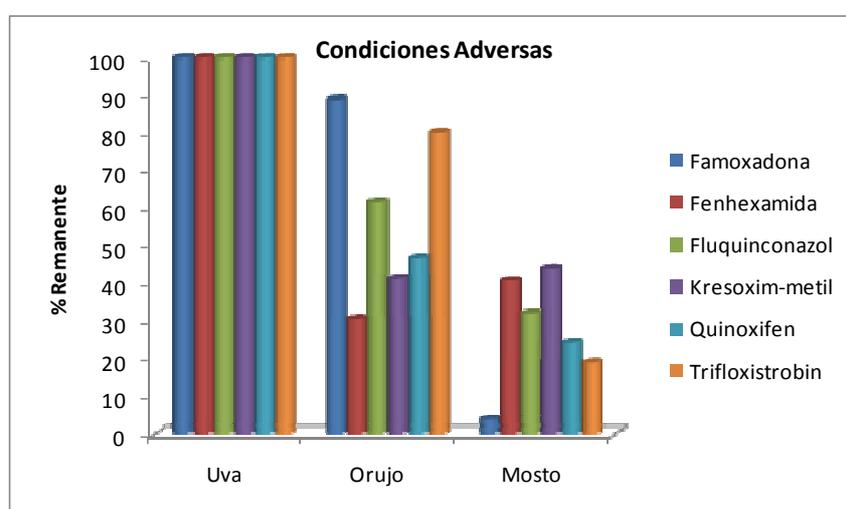
La mayor eliminación se produce, como se expuso anteriormente, cuando se separan las partes sólidas del mosto y del vino. Centrándonos en el prensado, las Figuras 4.13. y 4.14. recogen los porcentajes remanentes de cada uno de los fungicidas en orujo y mosto tras el prensado.



**Figura 4.13.-** Efecto del prensado sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando BPA.

Como se observa, tanto en BPA como en condiciones adversas, el prensado es un paso clave en la disipación de famoxadona, pues en ambos casos más del 90% del fungicida queda retenido en el orujo.

En el caso de fenhexamida, sin embargo, la eliminación de fungicida con el orujo es la menor de los principios estudiados. Así, la eliminación de este fungicida unida al orujo no llega al 35% en ninguna de las condiciones ensayadas (BPA y CPA).



**Figura 4.14.-** Efecto del prensado sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando CPA.

Cuando se estudia la evolución de fluquinconazol encontramos que en BPA la eliminación de fungicida en el orujo es ligeramente superior a la obtenida en CPA. La gran diferencia, sin embargo, aparece en el mosto. Así, en BPA no se detecta presencia de fluquinconazol en el mosto, mientras que en CPA el mosto presenta un remanente de más del 30%.

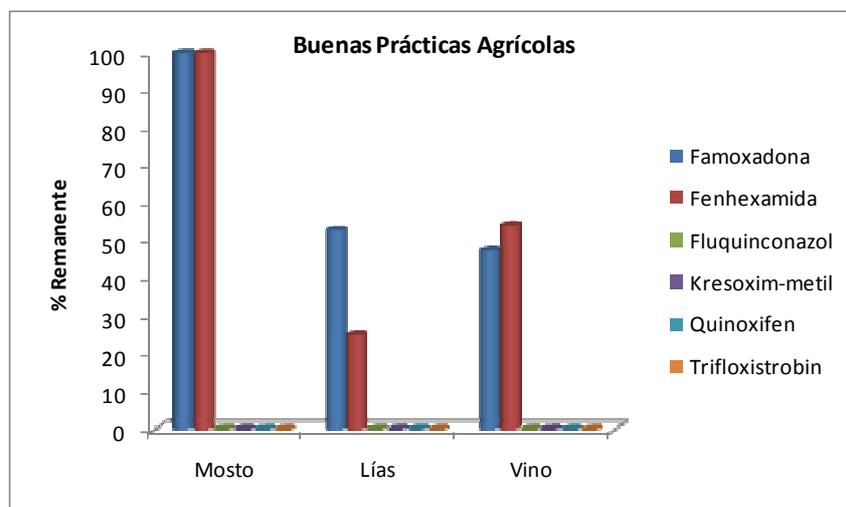
Como se indicó anteriormente, tras la aplicación de kresoxim-metil en BPA encontramos ausencia total de éste en las muestras de uva, orujo y mosto. Sin embargo, cuando kresoxim-metil se aplica en CPA, el contenido en fungicida de la uva se distribuye, tras el prensado, casi a partes iguales entre el orujo y el mosto.

Así, los productos que mayor cantidad de residuos dejan en el mosto son fenhexamida en BPA y kresoxim-metil en CPA, presentando unos remanentes del 38,86% y el 43,81% respectivamente.

El comportamiento de quinoxifen en BPA y, tras el prensado, muestra que el remanente de fungicida en orujo (40%) y mosto (35%) es casi igual. En CPA la diferencia es más acusada, pues en el orujo el remanente de fungicida es del 50% mientras en el mosto baja hasta el 25%.

Finalmente trifloxistrobin, al igual que ocurre con kresoxim-metil, presenta ausencia total en todas la muestras analizadas cuando se aplica siguiendo buenas prácticas agrícolas. En CPA, el prensado es la operación clave, quedando en el orujo más de un 80% del fungicida.

Una vez prensada la vendimia, las Figuras 4.15. y 4.16. muestran el efecto del trasiego sobre la disipación de los residuos de cada uno de los fungicidas estudiados.

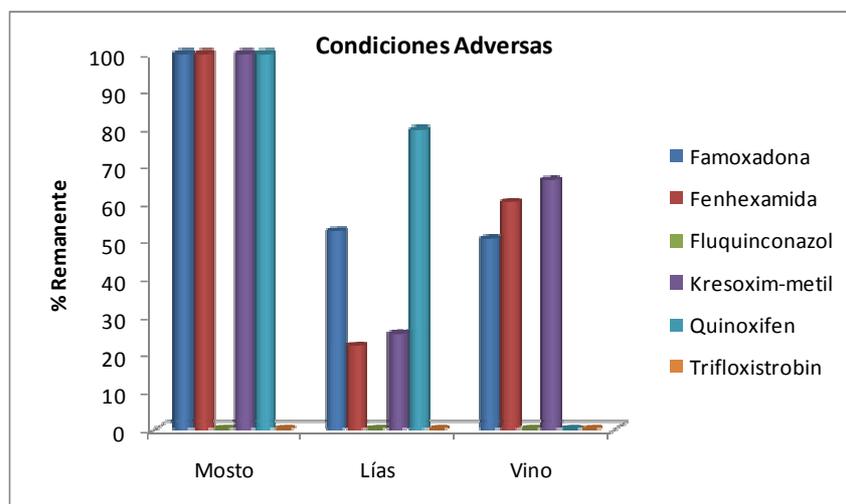


**Figura 4.15.-** Efecto del trasiego sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando BPA.

Como se observa en la Figura 4.15., de los fungicidas que presentan residuos en el mosto, tras la operación de trasiego los residuos de famoxadona se reparten de forma casi equitativa entre las lías y el vino, mientras que para fenhexamida el porcentaje de fungicida remanente en el vino es casi el doble que el encontrado en la lías.

Fluquinconazol, kresoxim-metil, y trifloxistrobin muestran ausencia total de fungicida en las muestras ensayadas.

Finalmente quinoxifen, que presentaba un remanente de hasta 35% en el mosto tras el prensado, muestra ausencia total de fungicida en las muestras ensayadas.



**Figura 4.16.-** Efecto del trasiego sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando CPA.

En condiciones adversas, famoxadona y fenhexamida presentan el mismo patrón de comportamiento que en BPA. Así, una vez efectuado el trasiego los porcentajes remanentes de famoxadona en lías y vino son muy semejantes, mientras que para la fenhexamida el remanente de fungicida en el vino es casi tres veces mayor que en las lías.

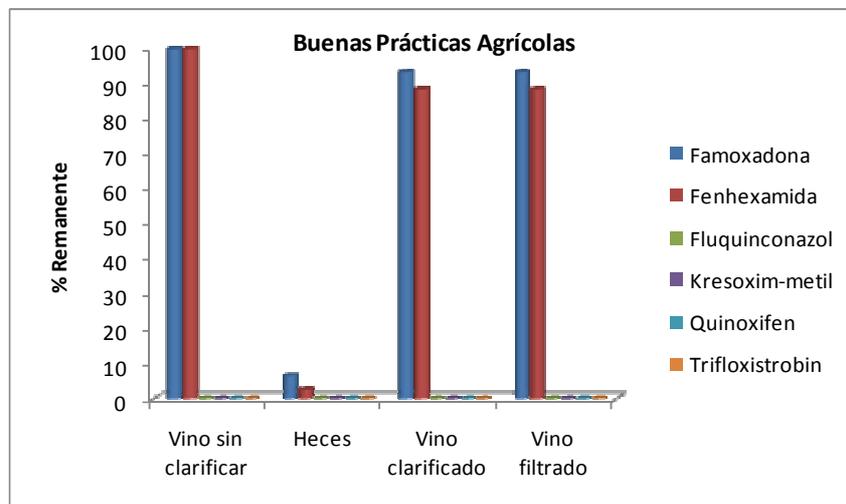
Comportamiento similar encontramos para kresoxim-metil, pues el remanente de fungicida en el mosto es más del doble del que es arrastrado por las lías.

Para quinoxifen el trasiego supone el paso definitivo en su eliminación, reteniendo las lías algo más del 80% del fungicida contenido en el mosto. Así, en el vino no se encuentran remanentes de este principio.

Finalmente fluquinconazol y trifloxistrobin que, tras el prensado, contenían remanentes del 32,10% y 18,95% en sus respectivos mostos, presentan ahora ausencia total de fungicida en todas las muestras ensayadas.

La cantidad porcentual de plaguicida calculada en los vinos apenas sufre alteración durante las últimas etapas de la vinificación, ya que una vez eliminadas las lías encontramos cantidades muy bajas e incluso nulas en las heces.

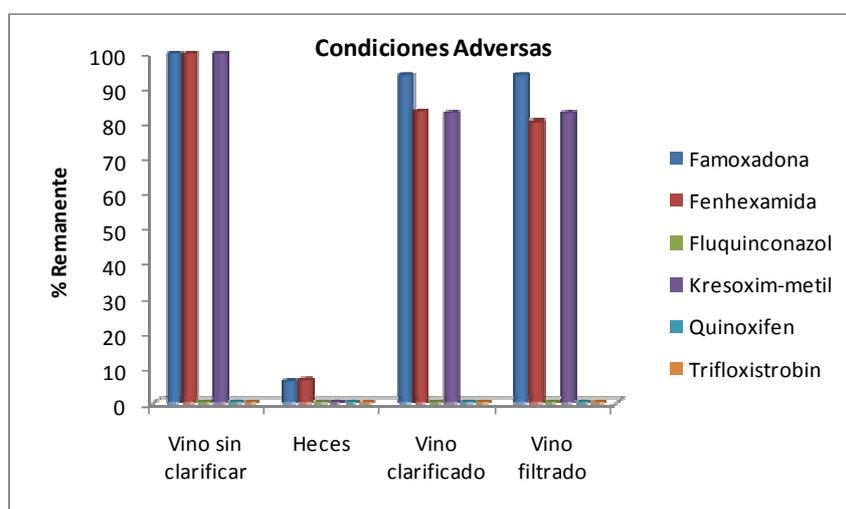
En las siguientes Figuras (4.17. y 4.18.) se muestra el efecto de los procesos de clarificación y filtración en la disipación de los fungicidas bajo las condiciones ensayadas (BPA y CPA).



**Figura 4.17.-** Efecto de la clarificación y el filtrado sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando BPA.

Así, en los casos de famoxadona y fenhexamida el clarificado afecta muy poco a la disipación de estos fungicidas, ya que el porcentaje remanente contenido en las heces casi no llega a un 10%. Por otro lado, tanto vino clarificado como vino filtrado contiene la misma cantidad de fungicida.

El resto de fungicidas estudiados (fluquinconazol, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin) presentan ausencia total de residuos en todas las muestras ensayadas.



**Figura 4.18.-** Efecto de la clarificación y el filtrado sobre la disipación de los fungicidas ensayados aplicando CPA.

En condiciones adversas, al igual que ocurría en BPA, encontramos que la clarificación provoca un reparto muy desigual de los residuos de fungicida entre heces y vino.

De esta forma, de las materias activas que presentan residuos en el vino, famoxadona y fenhexamida siguen eliminando menos de un 10% con las heces, mientras que para kresoxim-metil la eliminación con las heces es nula. En cuanto a filtración, el contenido en fungicida en vinos clarificados y vinos filtrados para estos principios activos es prácticamente igual. Por lo tanto, se puede considerar que la filtración no tiene influencia sobre su desaparición. Fluquinconazol, quinoxifen y trifloxistrobin muestran ausencia total de residuos en todas las muestras ensayadas.

## **ESTUDIO 2.- EFECTO SOBRE LAS LEVADURAS**



## 5. ESTUDIO 2.- EFECTO SOBRE LAS LEVADURAS

### 5.1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

El vino es un producto natural obtenido tras un proceso complejo de reacciones bioquímicas que se desarrollan en las etapas de crecimiento y maduración de la uva, continúan durante la fermentación y aún se mantienen durante las fases finales de elaboración como ocurre en la crianza, clarificación y embotellado (Romano *et al.*, 2003).

La fermentación es una reacción microbiológica compleja fundamental en la producción de vinos de calidad. Tradicionalmente, éste es un proceso natural y espontáneo en el que se produce un constante desarrollo e interacción entre levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Pretorius, 2000) procedentes de la superficie de las uvas o de la flora residente en el ambiente de la bodega (Querol *et al.*, 1990; Gutierrez *et al.*, 1999; Pretorius, 2000).

La diversidad y evolución de la flora levaduriforme contribuye de forma significativa a las características finales del vino. El desarrollo de cada especie, y dentro de ellas cada cepa, con una actividad metabólica única, conduce a la aparición de productos finales que condicionan las propiedades del vino (Querol y Ramón, 1996; Fraile *et al.*, 2000; Pretorius, 2000; Romano *et al.*, 2003).

Entre los factores que influyen en el proceso fermentativo, se cree que son los tratamientos fitosanitarios los que más pueden alterar las rutas bioquímicas de la fermentación. Los fungicidas provocan modificaciones en la carga microbiológica de la planta y el suelo produciendo alteraciones en el proceso fermentativo, que se traducirán en variaciones organolépticas en el vino final (Cabras *et al.*, 1998; Oliva *et al.*, 1998 y 1999 b y c; Cabras y Angioni, 2000; Cabras *et al.*, 2000).

Como ya se ha apuntado, la presencia de residuos de fungicidas empleados en viticultura modifica la población microbiana de la planta y el suelo pudiendo llegar a afectar al crecimiento y la viabilidad de algunas levaduras, alterando el proceso de fermentación y ocasionando cambios en las características organolépticas finales del vino.

Por todo lo anteriormente expuesto, consideramos de interés conocer el impacto que los seis principios activos estudiados tienen, tanto sobre la flora levaduriforme natural de la uva como sobre las Levaduras Secas Activas utilizadas como cultivos iniciadores en bodega. Para ello, se han llevado a cabo ensayos *in vitro*, tanto en medio sólido como en medio líquido; mediante PCR y posterior secuenciación se ha tipificado, a nivel de especie, la flora levaduriforme presente en uva, mosto y vino en ensayos con fermentación espontánea y en ensayos con adición de levaduras secas activas.

Finalmente, se ha estudiado la evolución de las distintas especies en la flora levaduriforme a lo largo del proceso de vinificación bajo dos condiciones: fermentación espontánea y fermentación con adición de levaduras secas activas (LSA).

En los ensayos con fermentación espontánea, las muestras fueron tratadas con fungicidas bajo dos condiciones: respetando los plazos de seguridad marcados por las buenas prácticas agrícolas y en condiciones desfavorables.

En los ensayos con adición de levaduras secas activas, la aplicación de los fungicidas se llevó a cabo en condiciones adversas (CPA) en todos los casos.

El planteamiento de estudio se representa esquematizado en la Figura 5.1.

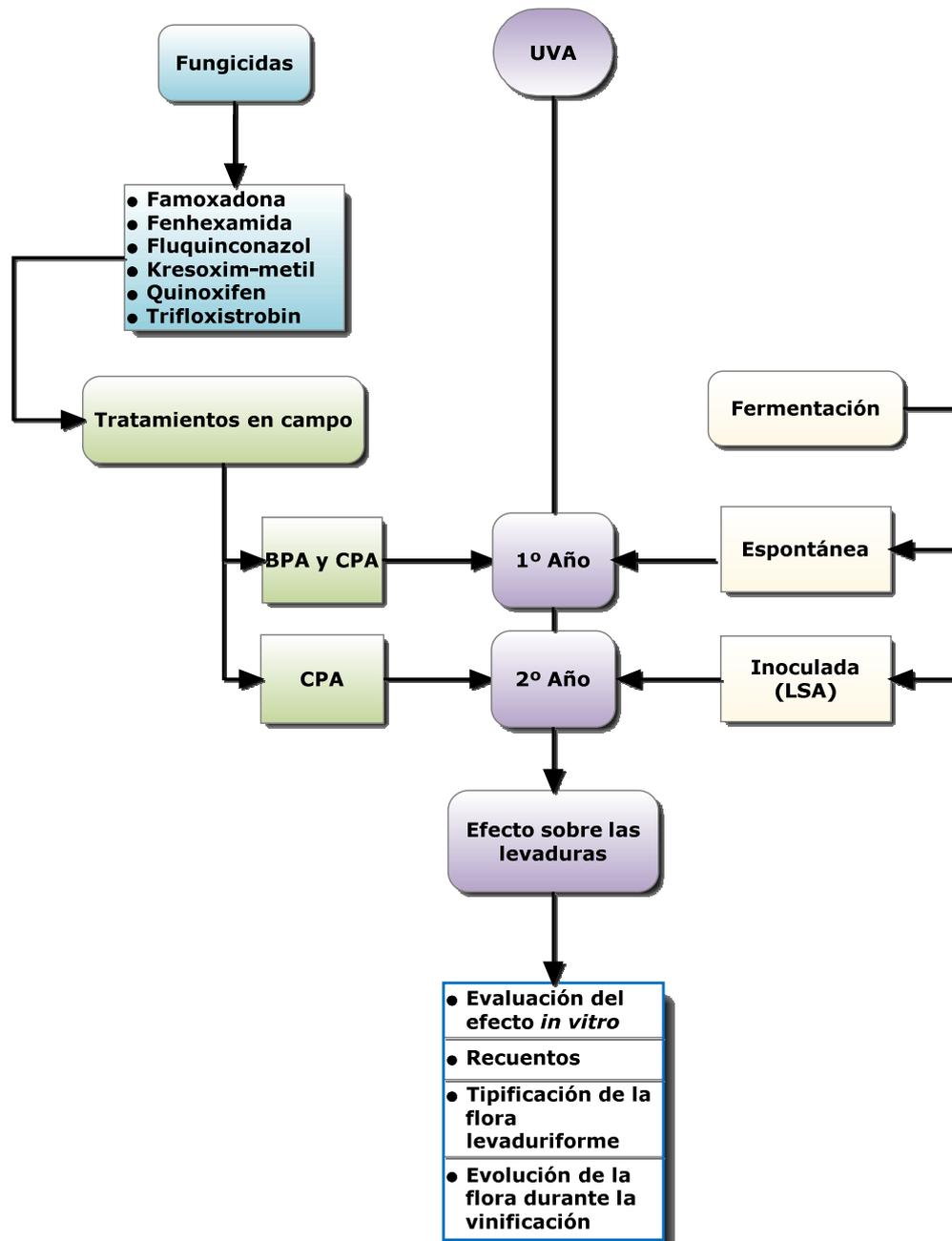


Figura 5.1.- Planteamiento del estudio de la influencia de los fungicidas sobre las levaduras.

## 5.2. ESTÁNDARES Y PRODUCTOS QUÍMICOS

Las levaduras testigo se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), utilizándose para los ensayos *in vitro* las siguientes especies y (cepas): *Saccharomyces cerevisiae* (CECT-1942); *Hanseniaspora uvarum* (CECT-1120); *Zygosaccharomyces rouxii* (CECT-1232) y *Torulaspora delbrueckii* (CECT-10651).

Los medios de cultivo utilizados fueron: caldo de peptona, de Panreac-Cultimed (Barcelona, España); medio GPYA (glucosa, de Guinama (Alboraya, España) 4% p/v; peptona micológica, de Oxoid (Madrid, España) 0,5% p/v; extracto de levadura granulado, de Merck (Darmstadt, Alemania) 0,5% p/v; agar-agar, de Merck (Darmstadt, Alemania) 2% p/v); caldo de cultivo GPY (glucosa, de Guinama (Alboraya, España) 4% p/v; peptona micológica, de Oxoid (Madrid, España) 0,5% p/v; extracto de levadura granulado, de Merck (Darmstadt, Alemania) 0,5% p/v) y Agar mosto, de Merck (Darmstadt, Alemania).

Para los controles positivos de inhibición en medio sólido se utilizó ketoconazol, de pureza  $\geq 98\%$ , de Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Los reactivos utilizados para los ensayos de PCR fueron: H<sub>2</sub>O para PCR, de JT Baker (Center Valley, USA); primers ITS 1 (20  $\mu$ M) (5'TCCgTAggTgAACCTgCgg) e ITS 4 (20  $\mu$ M) (5'TCCTCCgCTTATTgATATgC), ambos proporcionados por TIB molbiol (Berlín, Alemania); PCR Nucleotide Mix, Buffer MgCl<sub>2</sub> y Taq DNA Polymerase, de Roche (Madrid, España).

Para la electroforesis se utilizó: agarosa Type I Low EEO, de Sigma-Aldrich (Madrid, España); tampón de recorrido (Azul de bromofenol (12,5 mg/mL), de Scharlau (Barcelona, España) 1 mL; glicerol, de Panreac (Barcelona, España) 2,5 mL; EDTA, de Scharlau (Barcelona, España) 0,5M pH 8 10  $\mu$ L) y patrón de ADN DNA Molecular Weight Marker XIV, de Roche (Madrid, España).

Para la secuenciación se utilizó el kit ABI PRISM® BigDye™ Terminator cycle sequencing reaction (versión 3.1), de Applied Biosystems, con un paso previo de purificación de los productos amplificados mediante el kit Highpure PCR Products Purification, de Roche (Madrid, España).

### 5.3. ENSAYOS

#### 5.3.1 Evaluación del efecto de los fungicidas en medio líquido

El efecto de la aplicación de los fungicidas se determinó sobre la curva de crecimiento de cada cepa testigo en estudio y para cada fungicida en las distintas concentraciones ensayadas: concentración equivalente a la mitad de la recomendada por las Buenas Prácticas Agrícolas (BPA), equivalente a las BPA, equivalente al 150% de las BPA y equivalente al doble de las BPA.

Mediante un lector de placas Bio-Tek modelo Synergy HT, se cuantificó la absorbancia a 660 nm de longitud de onda durante 24h tomando medidas en intervalos de 10 minutos. Se utilizaron placas de 96 celdas optical Btm Plt polymerase base, fabricadas por Nalge Nunc International. Cada celda contiene un volumen de 200  $\mu$ L compuesto por 100  $\mu$ L de una disolución de fungicida al doble de la concentración ensayada y 100  $\mu$ L de cultivo líquido de levadura patrón incubada durante 24 horas a 26°C, y ajustada a un valor inicial de absorbancia de 0,18 mediante dilución del cultivo con caldo de peptona, lo que asegura una población microbiana inicial similar en todas las celdas.

Los datos obtenidos fueron procesados con la aplicación informática DMFit (DM: Dynamic Modelling) para el ajuste de las curvas de crecimiento según el modelo desarrollado por Baranyi y Roberts (1994), obteniendo los parámetros cinéticos más representativos (duración fase de latencia, lag, y velocidad máxima de crecimiento).

#### 5.3.2. Evaluación del efecto de los fungicidas en medio sólido

Se ha medido el efecto tóxico de los fungicidas seleccionados sobre las levaduras a partir de la determinación de halos de inhibición en las distintas cepas de estudio inoculadas sobre medio de cultivo GPYA.

En cada placa sembrada en superficie (siembra en césped) con la levadura testigo se depositaron 4 discos de celulosa estéril (Blank Discs, de Oxoid) cargados con 15  $\mu$ L de una disolución del preparado comercial de los fungicidas a cuatro concentraciones distintas: la equivalente a la dosis recomendada según las

BPA; la equivalente a la mitad de la dosis BPA; equivalente al 150% de la dosis BPA; y equivalente al doble de la dosis BPA.

Asimismo, en cada placa se depositó un disco con agua destilada (blanco) y un disco cargado con 15  $\mu\text{L}$  de una disolución de 25 mg de ketoconazol en 10 mL de agua destilada (prueba positiva de inhibición).

Tras 48 horas de incubación a 26°C se procedió a la medida de los halos de inhibición.

### 5.3.3. Recuento de levaduras en uva

Para el recuento de levaduras superficiales se seleccionaron 3 bayas de un peso entre 1,25 y 1,50 gramos. La selección y manejo de las bayas se realizó en condiciones de esterilidad procurando una mínima manipulación.

La flora superficial se obtuvo por lavado de los granos de uva en 50 mL de caldo de cultivo GPY.

A partir de esta muestra se prepararon diluciones decimales y se sembraron en masa en medio GPYA. Cada siembra se hizo por duplicado. Los resultados se expresaron en UFC/cm<sup>2</sup> (estimación de la superficie a partir del volumen de los granos utilizados).

La superficie de las bayas se obtuvo sumergiéndolas en una probeta con 50 mL de agua destilada y midiendo el volumen de agua (V) que desplazaba cada baya.

$$S = 4 \cdot \Pi \cdot \left( \sqrt[3]{\left( \frac{3}{4} \cdot \Pi \cdot V \right)} \right)^2$$

**Figura 5.2.-** Fórmula empleada para el cálculo de la superficie de las bayas.

### 5.3.4. Recuento de levaduras en mosto

Para llevar a cabo el recuento de las levaduras en el mosto se empleó el método de diluciones decimales con siembra en masa en Agar mosto y se incubó a 26°C durante 48 horas.

### 5.3.5. Tipificación de la flora levaduriforme

Para la tipificación de la flora levaduriforme a nivel de especie se muestrearon aleatoriamente 10 colonias de cada placa de los distintos recuentos realizados durante la vinificación. Las colonias obtenidas fueron congeladas en caldo GPY hasta el momento de su análisis.

La tipificación se llevó a cabo mediante la amplificación de las muestras por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y posterior secuenciación de las mismas.

Siguiendo el protocolo de Esteve-Zaroso *et al.* (1999) y utilizando los primer universales ITS1 e ITS4 descritos por White *et al.* (1990) se amplificó mediante PCR la región ITS1-ITS4 (5.8 rRNA). Las células obtenidas directamente de las colonias aisladas, se resuspendieron en 20  $\mu\text{L}$  de agua para PCR en un eppendorf para PCR de 200  $\mu\text{L}$ . Esta suspensión se sometió a un tratamiento térmico (95°C durante 15 minutos) para provocar la lisis de las paredes celulares y la liberación del material genético.

Tras el tratamiento térmico, las muestras se amplificaron por PCR: en un eppendorf para PCR se mezclaron, en ese orden, 20  $\mu\text{L}$  de un primer cocktail de PCR (disolución 1) (Tabla 5.1.) + 5  $\mu\text{L}$  del producto de lisis + 24,5  $\mu\text{L}$  de un segundo cocktail de PCR (disolución 2) (Tabla 5.2.). Una vez homogeneizada la mezcla, se añadieron 0,5  $\mu\text{L}$  de Taq DNA Polymerase a cada muestra.

**Tabla 5.1.-** Composición Disolución 1 para PCR.

Reactivo	Disolución 1
H <sub>2</sub> O para PCR	15 $\mu\text{L}$
ITS 1 (20 $\mu\text{M}$ ) (5'TCCgTAggTgAACCTgCgg)	1,5 $\mu\text{L}$
ITS 4 (20 $\mu\text{M}$ ) (5'TCCTCCgCTTATTgATATgC)	1,5 $\mu\text{L}$
PCR Nucleotide Mix	2 $\mu\text{L}$

**Tabla 5.2.-** Composición Disolución 2 para PCR.

Reactivo	Disolución 2
H <sub>2</sub> O para PCR	16,5 $\mu\text{L}$
Buffer	5 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub>	3 $\mu\text{L}$

Las condiciones establecidas para la PCR fueron: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, hibridación a 55,5°C durante 2 minutos, elongación a 72°C durante 2 minutos y un último paso de elongación a 72°C durante 10 minutos.

Se comprobó el resultado positivo de la PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 4%, utilizando un equipo CBS Scientific Company Inc modelo EPS 250 a 90 mA, cargando 1,5 µL de tampón de recorrido + 8 µL de muestra.

Las muestras amplificadas fueron purificadas mediante el kit Highpure PCR Products Purification, de Roche.

Tras la purificación, las muestras fueron secuenciadas mediante electroforesis capilar en un secuenciador automático Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer.

Las secuencias fueron identificadas en la base de datos *Sacharomyces* Genome Database y Fungal Genomes Search (Wu-Blast 2).

## 5.4. RESULTADOS

### 5.4.1. Evaluación *in vitro* del efecto de los fungicidas

#### 5.4.1.1. Evaluación *in vitro* en medio líquido

En la tabla 5.3. se recogen las concentraciones mínimas (ppm) a partir de las cuales los diferentes principios activos alargan significativamente la fase de latencia (lag) y/o disminuyen la velocidad máxima de crecimiento de las levaduras testigo estudiadas.

En los ensayos realizados bajo BPA (se incluyen aquí los ensayos con concentraciones equivalentes a las dosis BPA y los ensayos con concentraciones equivalentes a la mitad de la dosis BPA), los principios activos famoxadona, fluquinconazol, quinoxifen y trifloxistrobin presentaron efecto sólo sobre especies no *Saccharomyces*, mientras que kresoxim-metil afectó tanto a *Saccharomyces* como no *Saccharomyces*.

**Tabla 5.3.-** Concentración mínima (ppm) a la que los distintos principios activos ejercen un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) sobre la cinética de crecimiento (descenso en fase lag y/o velocidad máxima de crecimiento).

Lev./ Fung.	BPA	<i>S. cerevisiae</i>		<i>H. uvarum</i>		<i>Z. rouxii</i>		<i>T. delbrueckii</i>	
		v.m.	lag	v.m.	lag	v.m.	lag	v.m.	lag
FMX	400	800	x	200	x	x	x	x	x
FHX	200	x	x	300	x	x	x	x	x
FQC	250	x	x	x	x	250	250	x	x
K-M	250	125	125	250	125	250	375	125	375
QNX	250	500	x	125	x	x	x	125	500
TFX	150	x	300	300	300	x	150	150	x

Famoxadona (FMX), fenhexamida (FHX), fluquinconazol (FQC), kresoxim-metil (K-M), quinoxifen (QNX), trifloxistrobin (TFX); x: sin efecto a la concentración más alta ensayada; v.m.: velocidad máxima de crecimiento; BPA: concentración equivalente a la dosis BPA.

Por otra parte, si las concentraciones ensayadas equivalen a dosis superiores a las establecidas por las BPA, encontramos que famoxadona afectó solamente a *Saccharomyces*, fenhexamida, kresoxim-metil y trifloxistrobin afectaron sólo a no *Saccharomyces* y quinoxifen tanto a *Saccharomyces* como no *Saccharomyces*.

El análisis individualizado por principios activos del efecto de los mismos sobre las levaduras testigo ensayadas indica que:

Famoxadona afectó exclusivamente al crecimiento de las especies *S. cerevisiae* y *H. uvarum*, aunque de forma distinta debido a la sensibilidad propia de cada especie. Así, cuando este principio se aplica a concentraciones equivalentes a un 50% de las dosis recomendadas por las BPA, disminuye la velocidad de crecimiento de *H. uvarum* mientras que, en el caso de *S. cerevisiae* la velocidad no disminuye hasta duplicar la dosis recomendada.

Fenhexamida es, de los seis fungicidas estudiados, el que presenta el menor efecto actuando solamente sobre la velocidad de crecimiento de *H. uvarum* cuando se aplica a concentraciones equivalentes al 150% de la dosis recomendada por las BPA.

Fluquinconazol únicamente es efectivo frente a *Z. rouxii* provocando tanto disminución de la velocidad de crecimiento como aumento en la fase de latencia. Ambos efectos aparecen cuando se aplican concentraciones equivalentes a la dosis BPA.

Quinoxifen disminuye la velocidad de crecimiento de *H. uvarum* y *T. delbrueckii* con concentraciones equivalentes a la mitad de la dosis contemplada en las BPA. Asimismo, el crecimiento de *S. cerevisiae* se retarda cuando la concentración ensayada duplica la dosis admitida por las BPA. De igual forma, cuando se aplica quinoxifen a concentraciones equivalentes al doble de la dosis BPA, aumenta la fase de latencia de *T. delbrueckii*.

Trifloxistrobin aumenta la fase de latencia en todas las cepas excepto *T. delbrueckii*. Así, mientras que en el caso de *Z. rouxii* el efecto se obtiene a la concentración equivalente a la dosis BPA, en *S. cerevisiae* y *H. uvarum* se necesita una concentración equivalente al doble de la dosis recomendada. En lo que se refiere a la velocidad de crecimiento, ésta resultó afectada exclusivamente en las cepas de *T. delbrueckii*, cuando se aplican concentraciones equivalentes a las dosis BPA, y en *H. uvarum* cuando se aplican concentraciones equivalentes al doble de la dosis admitida por las BPA.

Centrando el análisis sobre las levaduras testigo utilizadas encontramos que:

*Hanseniaspora uvarum*, dentro de BPA, se ve afectada por famoxadona, kresoxim-metil y quinoxifen. Entre éstos, famoxadona y quinoxifen afectan a la velocidad máxima de crecimiento mientras que kresoxim-metil afecta tanto a la fase lag como a la velocidad máxima de crecimiento. El resto de fungicidas debe estar por encima de la concentración BPA para modificar el crecimiento de esta especie. Por último, *H. uvarum* se mostró resistente a fluquinconazol.

*Zygosaccharomyces rouxii*, en condiciones BPA, se ve afectada por fluquinconazol, kresoxim-metil y trifloxistrobin. Entre éstos, trifloxistrobin afecta a la fase lag, kresoxim-metil afecta a la velocidad máxima de crecimiento y fluquinconazol afecta tanto a la fase lag como a la velocidad máxima de crecimiento. De los principios activos ensayados, famoxadona, fenhexamida y quinoxifen no muestran efecto.

*Torulaspota delbrueckii*, dentro de BPA, se ve afectada en su velocidad máxima de crecimiento por kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin. De los principios activos ensayados, famoxadona, fenhexamida y fluquinconazol no muestran efecto.

Finalmente *Saccharomyces cerevisiae*, dentro de BPA, se ve afectada por kresoxim-metil tanto en la fase lag como en la velocidad máxima de crecimiento. El resto de fungicidas debe estar por encima de la concentración BPA para mostrar efecto. De los principios activos ensayados, fenhexamida y fluquinconazol no muestran efecto.

Los resultados obtenidos en los ensayos en medio líquido muestran que, de los seis fungicidas ensayados en este estudio, fenhexamida es el que presenta menor efecto. Este hecho concuerda con los estudios de Cabras *et al.* (2003), quienes observaron que la presencia de fenhexamida no afectaba a la fermentación alcohólica, incluso cuando las concentraciones de fungicida estaban por encima de las fijadas por la ley.

No se han publicado resultados sobre el resto de fungicidas ensayados por lo que no es posible la comparación con otros ensayos.

A continuación se recogen los resultados más relevantes encontrados por otros autores en ensayos sobre otros principios activos, algunos de ellos pertenecientes a las mismas familias químicas que los utilizados en nuestro estudio.

De esta forma, nuestros ensayos con fluquinconazol muestran resultados similares a los obtenidos por otros estudios sobre la familia de los conazoles.

Así, estudios llevados a cabo sobre tebuconazol, muestran que su presencia en el medio de cultivo a concentraciones de su LMR para uva de vinificación provoca un descenso en la velocidad de consumo del azúcar y, en consecuencia, una menor velocidad de crecimiento y de producción de etanol (González-Rodríguez *et al.*, 2009).

Estos resultados están en concordancia con el efecto inhibitorio general de los azoles en la transformación de lanosterol a ergosterol en la membrana celular de la levadura (Ji *et al.*, 2000).

No obstante, y a efectos prácticos, los estudios de González-Rodríguez *et al.* (2009) mostraron que, durante la vinificación en tinto los niveles de tebuconazol solubles en mosto son reducidos por adsorción en los sólidos de la uva hasta una concentración suficientemente baja como para hacer este efecto irrelevante, tal y como ocurre en nuestros resultados para fluquinconazol.

Asimismo, los estudios de Noguero-Pato *et al.* (2011) sugieren que las levaduras autóctonas son más tolerantes a tebuconazol que las cepas comerciales.

De la misma forma, la ausencia de efecto mostrada en nuestros resultados por trifloxistrobin sobre la velocidad de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, están en concordancia con los resultados obtenidos por González-Rodríguez *et al.* (2011) en sus estudios con otra estrobirulina, piraclostrobin.

Dentro del grupo de los organofosforados, los estudios realizados con dimetildicarbonato (DMDC): mostraron que las especies no *Saccharomyces*, siendo *Metschnikowia pulcherrima* una de las especies más resistente, sobreviven hasta una exposición de 400 mg/L de este principio activo. En cuanto al género *Saccharomyces*, *S. cerevisiae* resiste hasta 200 mg/L mientras que *S. bayanus* y *S. cerevisiae* var. *uvarum* se inhibieron a 150 mg/L (Delfini *et al.*, 2002). En todos los casos las curvas de producción de etanol fueron muy similares.

Finalmente, los estudios de Divol *et al.* (2005) encontraron que la eficacia del DMDC fue muy alta. Ninguna célula fue capaz de crecer en medio sólido 2 horas después de la adición de DMDC a cualquier concentración. La única excepción la constituyen aquellas cepas de *Zygosaccharomyces bailii* que, tratadas con bajas concentraciones de DMDC (menos de 200 mg/L), se recuperaron incluso en el caso de adición combinada de DMDC y SO<sub>2</sub>.

Los estudios llevados a cabo con pirimetanil, sin embargo, muestran resultados contradictorios. Así, mientras Cabras *et al.* (1999) no observan efecto inhibitorio de este principio activo en fermentaciones inoculadas, los resultados de Cus y Raspor (2008) demostraron, en experimentos *in vitro*, el efecto inhibitorio de este fungicida en el crecimiento de *H. uvarum*, siendo este efecto significativo en la segunda mitad del crecimiento exponencial.

A pesar de que los residuos de pirimetanil en la uva estaban por debajo de los LMRs, la utilización de azúcares y la concentración de células en los primeros días de la fermentación espontánea estuvieron influenciados por el uso de este

fungicida en el viñedo. Este hecho, junto con la inhibición en el crecimiento inicial de *H. uvarum* puede influir decisivamente en el desplazamiento de las especies no *Saccharomyces* por parte de *S. cerevisiae*.

Estudios con varios fungicidas como los de Calhelha *et al.* (2006) mostraron que la presencia de éstos en el medio de cultivo provoca inhibición del crecimiento de las levaduras. Así, *Rhodotorula glutinis* aparece como la especie más afectada, mientras que *Zygosaccharomyces rouxii* y *Saccharomyces cerevisiae* son más resistentes. Dentro de los fungicidas estudiados, diclofuanida y benomilo fueron los más tóxicos, mostrando benomilo la capacidad de retrasar el inicio de la fermentación. A pesar de que la presencia de fungicidas mostró efecto negativo *in vitro* sobre levaduras, tanto *Saccharomyces* como no *Saccharomyces* habitualmente presentes en la fermentación, en microvinificaciones sólo el benomilo retarda el inicio de la fermentación.

#### 5.4.1.2. Evaluación *in vitro* en medio sólido

En la Tabla 5.4. se recogen las concentraciones mínimas (ppm) a partir de las cuales los diferentes principios activos generan halos de inhibición en el crecimiento en medio sólido de las levaduras testigos ensayadas.

**Tabla 5.4.-** Concentración mínima (ppm) a la que los distintos principios activos inhiben el crecimiento de las levaduras en medio sólido.

Levaduras / Fungicidas	BPA	<i>S. cerevisiae</i>	<i>H. uvarum</i>	<i>Z. rouxii</i>	<i>T. delbrueckii</i>
<b>Famoxadona</b>	<b>400</b>	x	x	x	x
<b>Fenhexamida</b>	<b>200</b>	x	x	x	x
<b>Fluquinconazol</b>	<b>250</b>	x	x	x	x
<b>Kresoxim-metil</b>	<b>250</b>	x	125	x	x
<b>Quinoxifen</b>	<b>250</b>	x	x	x	x
<b>Trifloxistrobin</b>	<b>150</b>	x	x	x	x

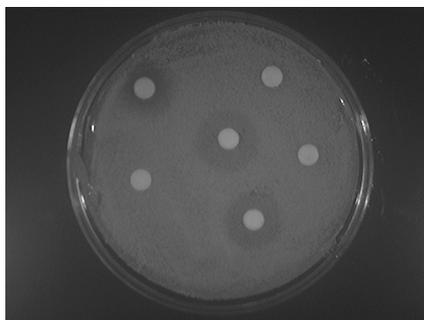
x: sin efecto a la concentración más alta ensayada; BPA: concentración equivalente a la dosis BPA.

Se pudo comprobar que el efecto inhibitorio observado en medio líquido no se extrapola al medio sólido. Así, sólo en el caso de kresoxim-metil se observa efecto inhibitorio sobre superficie sólida, apreciándose halos de inhibición a una concentración equivalente a la mitad de la dosis recomendada por las BPA.

Los efectos observados en medio líquido sobre la velocidad máxima de crecimiento y la fase de latencia no implican obligatoriamente la inhibición total del crecimiento y/o la muerte de la levadura. De ahí, la ausencia de halos de inhibición en casi la totalidad de los casos.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Zara *et al.* (2011) en sus estudios con piraclostrobin.

Así, el crecimiento mayoritario observado en medio sólido, medido tras 48 horas de incubación frente a las 24h de los ensayos en medio líquido, implica mayor población de levaduras y supone la posibilidad de desarrollo de mecanismos de adaptación por parte de estas levaduras a los distintos principios activos estudiados.



**Figura 5.3.-** Halos de inhibición sobre crecimiento de *Hanseniaspora uvarum*

En este sentido Costa *et al.* (2008), han demostrado la dependencia entre el efecto inhibitorio y el tamaño de la población, disminuyendo éste al aumentar el tamaño de la misma.

#### 5.4.2. Recuento de levaduras en la superficie de la baya

En la Tabla 5.5. se muestran los resultados obtenidos en los recuentos de levaduras en la uva tanto en las muestras control como en las tratadas (BPA y CPA).

El estudio de la cantidad superficial de levaduras en las bayas muestra que los niveles observados en la parcela control (1,9 log UFC/cm<sup>2</sup>) son similares a los determinados en estudios anteriores propios y de otros autores (Oliva *et al.*, 2006).

**Tabla 5.5.-** Resultados del recuento de levaduras en uva.

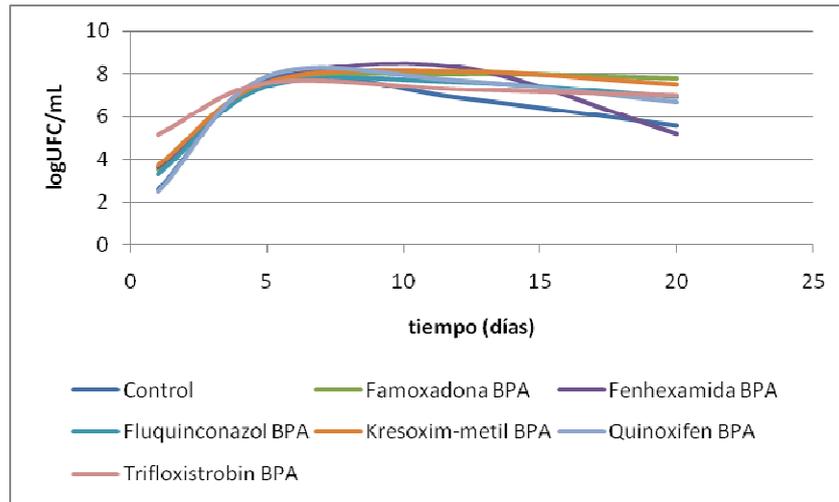
Fungicidas	UVA			
	Log UFC/g		Log UFC/cm <sup>2</sup>	
	BPA	CPA	BPA	CPA
<b>Famoxadona</b>	3,4	3,7	2,8	3,0
<b>Fenhexamida</b>	3,5	5,9	2,9	5,2
<b>Fluquinconazol</b>	3,3	3,6	2,6	3,0
<b>Kresoxim-metil</b>	3,7	3,3	3,0	2,6
<b>Quinoxifen</b>	2,5	3,2	1,8	3,8
<b>Trifloxistrobin</b>	5,2	3,7	4,5	3,0
<b>Control</b>	2,5		1,9	

Los recuentos encontrados en la parcela control no presentan diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) con los obtenidos en las parcelas tratadas con los distintos fungicidas, tanto en las condiciones del respeto de los plazos de seguridad (BPA) como en las condiciones más desfavorables consistentes en realizar el tratamiento el mismo día de la vendimia (CPA). No se observa, por tanto, ningún efecto perjudicial de estos agentes sobre el tamaño de población de levaduras en la baya de uva.

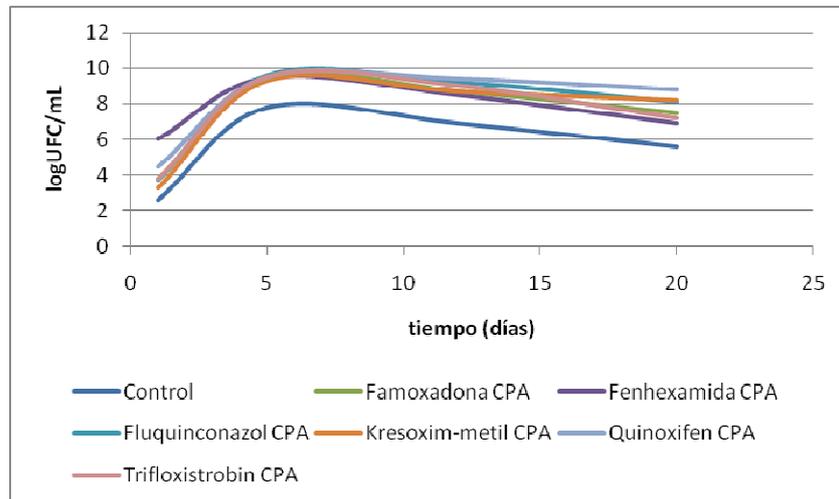
#### 5.4.3. Recuento de levaduras en el mosto

La evolución de los recuentos en mosto (Figuras 5.4. y 5.5.) describe la curva de crecimiento habitual asociada a los procesos fermentativos siguiendo las fases propias de adaptación o fase lag, crecimiento exponencial seguida de estabilización o fase estacionaria y finalmente la fase de declive.

Curva ésta asociada a los efectos tóxicos sobre las levaduras provocados por la acumulación de etanol en el mosto y el agotamiento de los hidratos de carbono fermentables (Suárez Lepe y Leal, 1992).



**Figura 5.4.-** Evolución de los recuentos de levaduras en mosto bajo condiciones BPA



**Figura 5.5.-** Evolución de los recuentos de levaduras en mosto bajo condiciones CPA.

En la Tabla 5.6. se muestran los resultados obtenidos en los recuentos en mosto y vino durante el proceso de fermentación espontánea tanto en condiciones BPA como en CPA.

**Tabla 5.6.-** Resultados de los recuentos de levaduras en mosto y vino en los ensayos con fermentación espontánea (log UFC/mL).

Mostos y vino								
Muestra / Fungicida	Mosto		Mosto I		Mosto II		Vino	
	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA
Famoxadona	3,5*	3,8*	7,5	9,5*	8,0*	8,7*	7,8*	7,5*
Fenhexamida	3,6*	6,0*	7,6	9,5*	8,3*	8,5*	5,2	6,9*
Fluquinconazol	3,3*	3,7*	7,4	9,6*	7,6	9,2*	6,9*	8,1*
Kresoxim-metil	3,7*	3,3*	7,6	9,3*	8,1*	8,7*	7,5*	8,2*
Quinoxifen	2,5	4,5*	7,9	9,5*	7,7	9,4*	6,7*	8,8*
Trifloxistrobin	5,2*	3,8*	7,6	9,5*	7,3	9,0*	7,0*	7,2*
Control	2,6		7,8		6,9		5,6	

\*Diferencia estadísticamente significativa respecto al control ( $p < 0,05$ )

El análisis de los recuentos de levaduras en mosto y vino indica que, al igual que ocurría en la uva, los fungicidas ensayados no presentan efecto negativo sobre éstas. Así, a lo largo de la fermentación, los recuentos de las muestras tratadas son superiores a los del control en la mayoría de los casos; destacando el hecho de que, en las condiciones más desfavorables, todas las muestras tienen recuentos superiores al control. Asimismo, en los ensayos con fermentación inoculada con LSA llevados a cabo durante el segundo año, no se encontraron diferencias significativas entre los recuentos de las muestras tratadas y los del control.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Cadez *et al.* (2010) en sus estudios con iprodiona, pirimetanil y fludioxonil+ciprodinil. Estos autores encontraron mayores recuentos en las uvas tratadas que en las muestras control, indicando que este efecto podría explicarse por la composición química de la preparación de los fungicidas que, además del principio activo, contienen otra serie de productos químicos como compuestos azufrados, sales de calcio, compuestos nitrogenados, etc, que pueden ser utilizados por las levaduras que viven en las bayas de la uva.

Finalmente, y teniendo en cuenta los datos de los recuentos de levaduras en superficie de la baya de uva, mosto y vino en los que no se aprecia efecto inhibitorio de ninguno de los principios activos ensayados, se puede deducir que aunque la determinación en medio líquido se presenta como una técnica de mayor sensibilidad para determinar los efectos tóxicos de los pesticidas sobre las levaduras, su correlación con las condiciones reales es menor que la determinación a partir de halos de inhibición.

#### 5.4.4. Tipificación de la flora levaduriforme

La composición de la flora levaduriforme de la uva depende de varios factores: la localización geográfica del viñedo (Longo *et al.*, 1991; Parish y Carrol, 1985), el tipo de suelo (Farris *et al.*, 1990), la edad del viñedo, la variedad de uva, la técnica de vendimia (Martini *et al.*, 1980; Rosini *et al.*, 1982; Pretorius *et al.*, 1999), el grado de madurez de la uva (Rosini *et al.*, 1982; Raspor *et al.*, 2006) y estado sanitario de la misma (Prakitchaiwattana *et al.*, 2004).

La rica composición del mosto permite el desarrollo de un amplio número de levaduras no *Saccharomyces* durante la vinificación. Estas especies pueden mejorar las propiedades organolépticas del vino, principalmente a nivel aromático, mediante la producción de enzimas específicas y compuestos volátiles (Zohre y Erten, 2002).

El crecimiento de las especies no *Saccharomyces* afecta tanto a la cinética de crecimiento como al metabolismo de las levaduras del género *Saccharomyces* (Lema *et al.* 1996). Estas levaduras capaces de crecer tanto en aerobiosis como en anaerobiosis, pueden competir con las especies *Saccharomyces* por los nutrientes durante la fermentación, aunque también se describen procesos simbióticos como en el caso de *Metschnikowia pulcherrima*, que poseen una actividad proteolítica significativa (Charoenchai *et al.*, 1997; Dizzy y Bisson 2000) y pueden generar aminoácidos útiles para *Saccharomyces cerevisiae*. Además, la autólisis de estas levaduras no *Saccharomyces* (Hernawan y Fleet 1995) constituye una posible fuente de nutrientes para *S. cerevisiae*.

En el pasado estas levaduras se consideraban alterantes, por conferir un perfil sensorial negativo al vino. De hecho, los mostos inoculados con cultivos puros de no *Saccharomyces* producen algunos metabolitos en niveles

desfavorables, incluido ácido acético, acetoina, etil acetato y acetaldehído; hecho este que excluiría el uso de levaduras no *Saccharomyces* como starters (Amerine y Cruess, 1960; Ribéreau-Gayon y Peynaud, 1960).

Sin embargo, cuando las levaduras no *Saccharomyces* se cultivan junto con *Saccharomyces cerevisiae*, su actividad metabólica negativa podría no expresarse o modificarse con la actividad metabólica de la cepa de *Saccharomyces*.

Dentro de este contexto, en los últimos años, varios estudios han propuesto el uso de levaduras no *Saccharomyces* junto con *S. cerevisiae* durante la fermentación, destacando los resultados positivos que se pueden obtener con las fermentaciones mixtas (Zironi *et al.*, 1993; Lema *et al.*, 1996; Romano *et al.*, 1997; Ciani y Maccarelli, 1998; Egli *et al.*, 1998; Henick-Kling *et al.*, 1998; Rojas *et al.*, 2001; Fleet 2003; Jolly *et al.*, 2003; Ciani *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008). Las posibles interacciones sinérgicas entre las diferentes especies de levaduras en fermentaciones mixtas representan un instrumento valioso para innovar en tecnologías de fermentación (Mendoza *et al.*, 2007; Fleet, 2008; Ciani *et al.*, 2010).

#### 5.4.4.1. Tipificación de levaduras no *Saccharomyces* en ensayo con fermentación espontánea bajo BPA y CPA

En la Tabla 5.7. se recogen las distintas especies no *Saccharomyces* encontradas en los ensayos con fermentación espontánea, junto con su distribución en base al tratamiento aplicado y las condiciones del mismo.

De esta forma, en las muestras procedentes de la parcela control, en la que no se aplica tratamiento alguno, se identificaron las especies *Candida tropicalis*, *Metschnikowia sp.*, *Clavispora lusitaniae*, *Debaryomyces hansenii* y *Metschnikowia pulcherrima*; éstas tres últimas se identifican también en todas las muestras tratadas.

En las muestras que fueron tratadas con famoxadona bajo BPA, se mantienen las especies identificadas en la parcela control a excepción de *C. tropicalis* y *Metschnikowia sp.*, que no se identificaron. Asimismo, se identifica una especie no presente en el control: *Kluyveromyces delphensis*.

En los tratamientos con fenhexamida bajo BPA, se mantienen las especies identificadas en el control a excepción de *Metschnikowia sp.*, que no se identificó. Además de estas especies, se identifica también a *K. delphensis*.

**Tabla 5.7.-** Tipificación de levaduras no *Saccharomyces* en ensayo con fermentación espontánea bajo BPA y CPA.

No <i>Saccharomyces</i>	Control		FMX		FHX		FQC		K-M		QNX		TFX	
	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA	BPA	CPA
<i>Candida tropicalis</i>		+			+		+	+				+		+
<i>Clavispora lusitanae</i>		+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i>		+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Kluyveromyces delphensis</i>			+											
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>		+	+		+	+	+	+	+		+	+	+	+
<i>Metschnikowia sp</i>							+	+			+	+	+	+
<i>Rhodotorula glutinis</i>									+					
<i>Saccharomycece sp</i>												+		

(FMX): famoxadona; (FHX): fenhexamida; (FQC): fluquinconazol; (K-M): kresoxim-metil; (QNX): quinoxifen; (TFX): trifloxistrobin.

Las muestras tratadas con fluquinconazol, tanto en BPA como en CPA, así como las tratadas con trifloxistrobin bajo CPA, presentan exactamente la misma distribución de especies que la parcela control.

En las muestras tratadas con kresoxim-metil, tanto BPA como CPA, se identificaron las mismas especies que en el control a excepción de *C. tropicalis* y *Metschnikowia sp.* Cabe destacar que únicamente en las muestras tratadas con kresoxim-metil aparece el género *Rhodotorula*, representado por la especie *R. glutinis*.

Cuando quinoxifen se aplica siguiendo buenas prácticas agrícolas, se identifican las mismas especies que en la parcela control junto con *Saccharomyces sp.*

En las muestras tratadas con trifloxistrobin bajo BPA y quinoxifen bajo CPA, las especies identificadas son las mismas que en el control a excepción de *C. tropicalis*, que no se identificó.

Finalmente, en las muestras tratadas tanto con famoxadona como con fenhexamida, ambas bajo CPA, se identifican las mismas especies que en la parcela control excepto *C. tropicalis* y *Metschnikowia sp.*

#### 5.4.4.2. Tipificación de levaduras *Saccharomyces* en ensayo con fermentación espontánea bajo BPA y CPA

La Tabla 5.8. muestra las distintas especies del género *Saccharomyces* encontradas en los ensayos con fermentación espontánea, así como su distribución en función del fungicida utilizado y de su tipo de aplicación.

El análisis de los resultados indica que, en las muestras control están presentes las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces paradoxus*, ambas pertenecientes al grupo *Saccharomyces sensu stricto*. Asimismo *S. cerevisiae* es la única especie que mantiene su presencia en todos los tratamientos.

De hecho, en las muestras tratadas con trifloxistrobin bajo BPA, en las tratadas con fenhexamida, fluquinconazol y quinoxifen, todas bajo CPA; así como en las de famoxadona bajo ambas condiciones, la única especie identificada es *S. cerevisiae*.

Las muestras tratadas con fenhexamida bajo BPA así como las tratadas con trifloxistrobin bajo CPA, son las que presentan la mayor variedad de especies, identificándose las especies *S. bayanus*, *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, todas pertenecientes al grupo *Saccharomyces sensu stricto*.

En las muestras tratadas con fluquinconazol y quinoxifen bajo BPA, así como en las de kresoxim-metil, tanto en BPA como en CPA, se identifican las mismas especies que en el control.

#### 5.4.4.3. Tipificación de levaduras no *Saccharomyces* en ensayo con adición de LSA.

Los resultados obtenidos en los ensayos con adición de levaduras secas activas realizados durante el segundo año se recogen en la Tabla 5.9.

El análisis detallado de los resultados indica que las muestras control sin LSA presentan una variedad de especies mucho mayor que las muestras inoculadas. Así, en las muestras control sin LSA se identifican las siguientes especies: *Aureobasidium pullulans*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Candida zemplinina*, *Clavispora lusitaniae*, *Galactomyces geotrichum*, *Issatchenkia terricola*, *Kluyveromyces delphensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Penicillium minioluteum*, *Pichia farinosa*, *Saccharomycopsis crataegensis* y *Yarrowia lipolytica*.

En las muestras a las que se añaden levaduras secas activas, tanto control como tratadas con fungicidas, no sólo disminuye el número de especies encontradas sino que se observa, además, una homogeneización de las poblaciones, identificándose en todas las muestras las mismas especies: *A. pullulans*, *C. zemplinina*, *C. lusitaniae*, *I. terricola*, *M. pulcherrima*, y *Y. lipolytica*.

#### 5.4.4.4. Tipificación de levaduras *Saccharomyces* en ensayo con adición de LSA

Las diferentes especies *Saccharomyces sensu stricto* y *Saccharomyces sensu lato* encontradas en las vinificaciones con adición de levaduras secas activas se muestran en la Tabla 5.10.

Así, en la parcela control se identifican tres especies del grupo *Saccharomyces sensu stricto*: *Saccharomyces bayanus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces paradoxus*, y una especie perteneciente al grupo *Saccharomyces sensu lato*: *Saccharomyces servazzii*.

**Tabla 5.8.-** Tipificación de levaduras *Saccharomyces* en ensayo con fermentación espontánea bajo BPA y CPA.

<i>Saccharomyces sensu stricto</i>	Control	FMX		FHX		FOC		K-M		QNX		TFX	
		BPA	CPA										
<i>S. bayanus</i>				+									+
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. paradoxus</i>	+			+		+		+	+	+	+		+

(FMX): famoxadona; (FHX): fenhexamida; (FOC): fluquinconazol; (K-M): kresoxim-metil; (QNX): quinoxifen; (TFX): trifloxistrobín.

Tabla 5.9.- Tipificación de levaduras no *Saccharomyces* en ensayo con adición de LSA.

No <i>Saccharomyces</i>	Control	C+LSA	FMX+LSA	FHX+LSA	FQC+LSA	K-M+LSA	QNX+LSA	TFX+LSA
<i>Aureobasidium pullulans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida parasilopsis</i>	+							
<i>Candida stellatoidea</i>	+							
<i>Candida zemplinina</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clavispora lusitanae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Galactomyces geotrichum</i>	+							
<i>Kluyveromyces delphensis</i>	+							
<i>Issatchenkia terricola</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium minioluteum</i>	+							
<i>Pichia farinosa</i>	+							
<i>Saccharomycopsis crataegensis</i>	+							
<i>Yarrowia lipolytica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+

(FMX): famoxadona; (FHX): fenhexamida; (FQC): fluquinconazol; (K-M): kresoxim-metil; (QNX): quinoxifen; (TFX): trifloxistrobil; (LSA): levaduras secas activas.

**Tabla 5.10.-** Tipificación de levaduras *Saccharomyces* en ensayo con adición de LSA.

<i>Saccharomyces sensu stricto</i>	Control	Control LSA	FMX+LSA	FHX+LSA	FQC+LSA	K-M+LSA	QNX+LSA	TFX+LSA
<i>S. bayanus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. paradoxus</i>	+	+						
<i>Saccharomyces sensu lato</i>	Control	Control LSA	FMX+LSA	FHX+LSA	FQC+LSA	K-M+LSA	QNX+LSA	TFX+LSA
<i>S. servazzii</i>	+							

(FMX): famoxadona; (FHX): fenhexamida; (FQC): fluquinconazol; (K-M): kresoxim-metil; (QNX): quinoxifen; (TFX): trifloxistrobín; (LSA): levaduras secas activas.

En el análisis de las muestras inoculadas con LSA no se identificaron especies pertenecientes al grupo *Saccharomyces sensu lato*. Así, en las muestras control se identifican *S. cerevisiae*, *S. bayanus* y *S. paradoxus* y en las muestras tratadas con cualquiera de los principios activos ensayados, las únicas especies identificadas son *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

El uso de levaduras secas activas reduce el número de cepas *Saccharomyces* indígenas en favor del cultivo starter, aunque todavía existe desarrollo de cepas naturales durante las primeras fases de la fermentación (Querol *et al.*, 1992). Dicha reducción de la diversidad se observa incluso cuando se llevan a cabo fermentaciones espontáneas en bodegas en las que se ha trabajado con fermentaciones inoculadas (Torija *et al.*, 2001).

#### 5.4.4.5. Discusión de los resultados de tipificación de levaduras

Debido a la extensión de los resultados correspondientes a los ensayos de tipificación de la flora levaduriforme, se presenta en este apartado la discusión global de los mismos dividida en dos grandes bloques: flora no *Saccharomyces* y flora *Saccharomyces*.

##### 5.4.4.5.1. Discusión de los resultados de tipificación de la flora levaduriforme no *Saccharomyces*

Cuando se analiza la tipificación de la flora no *Saccharomyces* realizada tanto en fermentaciones espontáneas como en las inoculadas con levaduras secas activas, destaca la ausencia de *Hanseniaspora uvarum*. Dentro de la flora no *Saccharomyces*, *Hanseniaspora uvarum* es una de las especies aceptada como predominante en los primeros estadios de la vinificación (Heard y Fleet, 1986; Holloway *et al.*, 1990; Longo *et al.*, 1991; Fleet y Heard, 1993; Martini, 1993; Constantí *et al.*, 1997 y 1998; Romano *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 1999; Pretorius *et al.*, 1999; Raspor *et al.*, 2002; Sabate *et al.*, 2002; Zohre y Erten, 2002; van Keulen *et al.*, 2003; Clemente-Jiménez *et al.*, 2004; Capece *et al.*, 2005; Combina *et al.*, 2005; Nurgel *et al.*, 2005; Querol y Fleet, 2006; Di Maro *et al.*, 2007; Domizio *et al.*, 2007; Fugelsang y Edwards, 2007; Nisiotou y Nychas, 2007; Nisiotou *et al.*, 2007; Lopes *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Ocón *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010a; Li *et al.*, 2011; Mateo *et al.*, 2011).

Este hecho, sin embargo, no implica su presencia obligatoria en toda vinificación. Así, encontramos estudios de la flora levaduriforme asociada a mostos y vinos en los que no se identificó esta especie (Bascones, 1981; Mateos *et al.*, 1985 a y b; Parish y Carrol, 1985; Mora *et al.*, 1988; Cansado *et al.*, 1989; Mulet *et al.*, 1990; Longo *et al.*, 1991; Romano *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 2000; Cordero-Bueso *et al.*, 2011b).

Como se indicó anteriormente, no sólo la presencia de *H. uvarum* en la vinificación no es obligada sino que ésta varía, dentro de un mismo ensayo, en función de la variedad de uva (Raspor *et al.*, 2006; Chavan *et al.*, 2009; Clavijo *et al.*, 2010), de la localización geográfica del viñedo (Guerzoni y Marchetti, 1987; Pramateftaki *et al.*, 2000), del año de cosecha (Torija *et al.*, 2001; Sabate *et al.*, 2002) o del lote de fermentación (Povhe Jemec *et al.*, 2001; Ocón *et al.*, 2010b).

Destaca también la presencia de dos especies, *Clavispora lusitaniae* y *Metschnikowia pulcherrima*, que aparecen en todas las parcelas y bajo todos tratamientos durante los dos años de vendimia.

*Clavispora lusitaniae*, levadura perteneciente al género *Clavispora* (Rodrigues de Miranda, 1979), aparece en un amplio abanico de sustratos tanto vegetales como animales, así como en residuos industriales. También existen especímenes clínicos, siendo descrito como patógeno oportunista por primera vez por Pappagianis *et al.*, 1979 (Zhang *et al.*, 2010b).

En los estudios realizados por Longo *et al.* (1991) esta levadura es identificada en uvas procedentes de vendimias lluviosas. Estos autores postulan que en estas condiciones, la presencia de *Clavispora lusitaniae* junto con otras especies también oxidativas puede ser indicativo de una mala calidad sanitaria de la uva en la que la proliferación de hongos se ve, además, favorecida por la lluvia.

Estas hipótesis se ven confirmadas por los estudios de Nisiotou *et al.* (2007), que identificaron esta especie en la flora de uva afectada por *Botrytis*.

A pesar de la falta de información sobre la aptitud enológica de *Clavispora lusitaniae* (no es una especie que aparezca con frecuencia en el mosto) los estudios de Mingorance-Cazorla *et al.* (2003) sugieren que esta especie es capaz de generar un buen producto con un grado alcohólico bajo.

*C. lusitaniae* se encuentra presente también en zumo de naranja (Arias *et al.*, 2002; Las Heras-Vázquez *et al.*, 2003), cervecerías lager (van der Aa Kühle y Jespersen, 1998) o panaderías (Arlorio *et al.*, 1999).

Bajo un punto de vista clínico, *Clavispora lusitaniae* parece ser un patógeno humano poco frecuente, fundamentalmente asociado a infecciones cutáneas. Hasta ahora, en la mayoría de los casos clínicos de esta especie poco frecuente, aparece como agente de micosis profunda (Pappagianis *et al.*, 1979; Ahearn y McGlohn, 1984; Hadfield *et al.*, 1987; Sanchez y Cooper, 1987; Blinkhorn *et al.*, 1989; Rinaldi *et al.*, 1991; Yinnon *et al.*, 1992; Nguyen *et al.*, 1996; Yeghen *et al.*, 1996; Guppy *et al.*, 1998; Krcmery *et al.*, 1998 y 1999; Segal y Kusne, 1999; Thomas *et al.*, 1999; Cinar *et al.*, 2002; Viudes *et al.*, 2002; Hawkins y Baddour, 2003; Nancy y Michael, 2007).

El hábitat natural de *Metschnikowia pulcherrima* son las frutas completamente maduras, especialmente las uvas (Mills *et al.*, 2002), identificándose tanto en uva como en mosto (Mora *et al.*, 1988 y 1990; Reed y Nagodawithana, 1991; Dizy y Bisson, 2000 Povhe-Jemec *et al.*, 2001; Torija *et al.*, 2001; Sabaté *et al.*, 2002; van Keulen *et al.*, 2003; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004; Combina *et al.*, 2005 y 2005a; Nurgel *et al.*, 2005; Renouf *et al.*, 2005; Raspor *et al.*, 2006; Di Maro *et al.*, 2007; Domizio *et al.*, 2007; González *et al.*, 2007; Zott *et al.*, 2008; Chavan *et al.*, 2009; Brezna *et al.*, 2010; Clavijo *et al.*, 2010; Francesca *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Ocón *et al.*, 2010a; Rodríguez *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010a; Cordero-Bueso *et al.*, 2011b; Li *et al.*, 2011) e incluso en el suelo del viñedo (Tutulescu y Popa, 2009). De hecho, en aquellos viñedos en donde los suelos presentan cultivos de cobertura, *M. pulcherrima* supone el 50% de la flora levaduriforme en algunas cosechas (Cordero-Bueso *et al.*, 2011a). También se ha aislado de las superficies y equipamiento de las bodegas (Ocón *et al.*, 2010b).

Se trata, además, de una especie perfectamente adaptada a este medio, siendo capaz de sobrevivir a procesos como la congelación de la uva (Chamberlain *et al.*, 1997) o la clarificación del vino (Mora y Mulet, 1991). Su presencia en la uva no se ve afectada por las condiciones climáticas del viñedo (Longo *et al.*, 1991), o por la calidad sanitaria de la uva.

Sirvan de ejemplo de esto último los estudios de Guerzoni y Marchetti (1987), que identifican esta especie como una de las mayoritarias en la flora

levaduriforme de uvas atacadas por podredumbre ácida, o los de Mills *et al.* (2002) donde la población de *M. pulcherrima* encontrada en uvas atacadas por *Botrytis* se comporta igual que la de uvas sanas. Nisiotou y Nychas (2007), por su parte, identificaron *M. pulcherrima* sólo en uvas afectadas por *Botrytis*.

Por otro lado, los estudios desarrollados por Angulo *et al.* (1993) encontraron que los viñedos en los que el tratamiento con fungicidas es más agresivo presentan una mayor población de levaduras oxidativas, destacando la presencia de *M. pulcherrima*. Un porcentaje elevado de especies oxidativas aisladas puede atribuirse a un tratamiento con fungicidas a gran escala (Quecedo *et al.*, 1976; Peynaud, 1984; Guerzoni y Marchetti, 1987; Mangiarotti *et al.*, 1987; Girond *et al.*, 1989); de hecho la presencia o ausencia de *M. pulcherrima* puede estar directamente relacionada con la acción de estos productos.

Esta especie, además, presenta un gran potencial como agente biocontrol frente a patógenos postcosecha (Petersson y Schnürer, 1995; Piano *et al.*, 1997; Guinebretiere *et al.*, 2000; Janisiewicz *et al.*, 2001; Spadaro *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2004; Blevé *et al.*, 2006; Fleet 2006; Leverentz *et al.*, 2006).

*M. pulcherrima* produce pulquerrimina, pigmento rojo que se acumula en el medio de cultivo alrededor de las colonias de esta especie (Kluyver *et al.*, 1953). Recientemente, los estudios de Sipiczki (2006) han revelado que la actividad antibacteriana y antifúngica de *M. pulcherrima* son debidas a que la pulquerrimina inmoviliza el hierro en el medio de cultivo.

Finalmente, y en la línea de los estudios sobre utilización de enzimas “no *Saccharomyces*” para mejorar el aroma de los vinos (Charoenchai *et al.*, 1997; Lambrechts y Pretorius, 2000; Arévalo *et al.*, 2006), González-Pombo *et al.* (2008) han purificado una beta-glucosidasa de *M. pulcherrima* activa sobre los glicósidos del vino y, por tanto, capaz de mejorar el aroma de los mismos.

Otras especies que aparecen también en todas las parcelas y bajo todos los tratamientos son *Debaryomyces hansenii* en los ensayos con fermentación espontánea, y *Aureobasidium pullulans*, *Candida zemplinina*, *Issatchenkia terricola* y *Yarrowia lipolytica* en los ensayos con adición de LSA.

En el caso de *Debaryomyces hansenii*, la literatura sobre la presencia de especies de este género en alimentos ha sido durante muchos años inespecífica y

dispersa. Es, además, un género de difícil seguimiento debido a los numerosos cambios de nombre en sus especies (Praphailong y Fleet, 1999)

No obstante, *Debaryomyces hansenii* aparece identificada en uva, donde los estudios de Raspor *et al.* (2006) y Chavan *et al.* (2009) muestran la elevada especificidad de esta especie en cuanto a la zona de cultivo y variedad de uva en la que crece; de hecho Rosi *et al.* (1994) encontraron que el grado de capacidad glucósido hidrolítica de *Debaryomyces hansenii* era dependiente del viñedo.

Esta levadura también ha sido aislada en mosto (Mora *et al.*, 1988; Raspor *et al.*, 2002; Zott *et al.*, 2008; Brezna *et al.*, 2010), llegando incluso a ser una de las especies predominantes al inicio de la fermentación (Fernández *et al.*, 1999, 2000; Povhe-Jemec *et al.*, 2001). También se han aislado de las superficies y equipamiento de las bodegas (Ocón *et al.*, 2010b; Zhang *et al.*, 2010a).

Por último destacar que, al igual que ocurre en nuestros ensayos, en los estudios llevados por Longo *et al.* (1991) se identificó esta especie en todas las parcelas estudiadas.

Popularmente conocido como levadura negra debido a su producción de melanina (de Hoog, 1993), el hongo deuteromicético *Aureobasidium pullulans* es uno de los saprófitos más extendidos y mejor adaptados, tanto en la filosfera (Blakeman y Fokkema, 1982) como en la carposfera, destacando su presencia en laboratorios clínicos como contaminante (de Hoog *et al.*, 2000).

*A. pullulans* presenta una elevada resistencia a la desecación y a la radiación (Elad *et al.*, 1994; Kohl *et al.*, 1995) y ha sido considerado como un posible agente de control biológico, demostrando su eficacia frente a enfermedades postcosecha causadas por mohos en frutas (Fokkema y Lorbeer, 1974; Ippolito *et al.*, 1997; Lima *et al.*, 1997; Nigro *et al.*, 1997; Schena *et al.*, 1999; Ippolito *et al.*, 2000; Castoria *et al.*, 2001; Schena *et al.*, 2003; Bencheqroun *et al.*, 2007; Mounir *et al.*, 2007; Dimakopoulou *et al.*, 2008; Chi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010) y frente a plagas (Seibold *et al.*, 2004). Sus mecanismos de acción incluyen competición por los nutrientes (Bencheqroun *et al.*, 2007), producción de enzimas que degradan la pared celular (Andrews *et al.*, 1983; Castoria *et al.*, 2001) o inducción de respuesta defensiva (Ippolito *et al.*, 2000).

Debido a su capacidad de colonización de la superficie de la planta, *A. pullulans* muestra un efecto positivo en las enfermedades causadas por mohos en

hojas y tallos (Andrews *et al.*, 1983; Dik *et al.*, 1999). De hecho, ya existen en el mercado productos de biocontrol a base de *A. pullulans* (Chi *et al.*, 2009).

Otra aptitud comercial de *A. pullulans* radica en su capacidad para sintetizar un polisacárido extracelular llamado pululano (Israilides *et al.*, 1998; Simon *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999) y en su excelente producción de amilasas, xilanasas, beta-glucosidasas (Biely *et al.*, 1996; Iembo *et al.*, 2002; Leite *et al.*, 2008), beta-xilosidasas (Domsch y Gams, 1969; Kremnicky y Biely, 1998; Blanco *et al.*, 1999; Iembo *et al.*, 2002) así como enzimas pectolíticas y beta-mananolíticas (Rombouts y Pilnik, 1978; Boccas *et al.*, 1994). Por otra parte, estudios *in vitro* muestran que *A. pullulans* es capaz de segregar compuestos con efecto anitibiótico (McCormack *et al.*, 1994).

*A. pullulans* también es conocido por su elevado polimorfismo (de Hoog y Yurlova, 1994; Yurlova *et al.*, 1995 y 1999; de Hoog *et al.*, 1999a y 1999b), que causa problemas en la identificación de los aislados. Además, esta especie incluye cepas extremadamente versátiles en su ecología (Grube *et al.*, 2011).

En lo que se refiere a su identificación en uva y vinificación, esta especie ha sido aislada en suelo de viñedo y hojas de vid (Sabate *et al.*, 2002), en la superficie de la uva (Guerzoni y Marchetti, 1987; Chamberlain *et al.*, 1997; Ippolito *et al.*, 2000; Sabate *et al.*, 2002; Raspór *et al.*, 2006; Serra *et al.*, 2006; Nisiotou y Nychas, 2007; Baffi *et al.*, 2011; Merín *et al.*, 2011), en mosto (Sabate *et al.*, 2002; Subden *et al.*, 2003; Brezna *et al.*, 2010; Clavijo *et al.*, 2010; Ocón *et al.*, 2010a; Verginer *et al.*, 2010), y en equipamiento de bodega (Sabate *et al.*, 2002; Ocón *et al.*, 2010b).

Este basidiomiceto no supone ningún problema en la industria vinícola, pues se trata de un aerobio obligado inactivo durante la fermentación (Subden *et al.*, 2003). Además, no puede ser recuperado a partir de fermentaciones una vez que la concentración de glucosa ha caído en un 1% (Holloway y Subden, 1991). Incluso la producción de pululano no representa un inconveniente pues no existen evidencias de producción del mismo en vinos de ningún tipo. Esto puede ser debido a que la concentración de la fuente de carbono en la piel de la uva es demasiado baja para fomentar la producción de pululano (Subden *et al.*, 2003).

Por último, cabe mencionar los estudios de Grube *et al.* (2011) que encontraron que especies tolerantes al cobre como *Aureobasidium pullulans* son más abundantes en los viñedos ecológicos, sugiriendo ésto un mayor potencial antifitopatogénico por parte de esta levadura.

*Candida zemplinina* ha sido encontrada generalmente en mostos con un elevado contenido en azúcares o en mostos “botrytizados” (Mills *et al.*, 2002; Sipiczki, 2003; Tofalo *et al.*, 2009). Los estudios de Tofalo *et al.* (2011) encontraron además que *C. zemplinina* era capaz de degradar parcialmente el ácido málico. Magyar y Tóth (2011), por su parte, describieron un extremado carácter fructofílico en sus estudios con *C. zemplinina*; estos resultados están en concordancia con los hallazgos de Soden *et al.* (2000) y Mills *et al.* (2002).

No obstante, Csoma y Sipiczki (2008) en un reciente examen taxonómico molecular de cepas, identificadas como *C. stellata*, en diferentes colecciones de cultivos revelaron que la mayoría de estas cepas pertenecían realmente a la especie *C. zemplinina*. Estos autores proponen, por tanto, que es *C. zemplinina* más que *C. stellata* la especie que se puede encontrar en uva y vinificación, sugiriendo al mismo tiempo que estas dos especies pueden haber sido confundidas en anteriores estudios.

De hecho, en la mayoría de publicaciones recientes sobre la microbiota de los vinos encontramos sólo presencia de *C. zemplinina* no identificándose *C. stellata* (Nisiotou y Nychas, 2007; Nisiotou *et al.*, 2007; Lopandic *et al.*, 2008; Zott *et al.*, 2008; Tofalo *et al.*, 2009; Clavijo *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010a; Comitini *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2011) o identificándose ambas diferenciadas (Magyar *et al.*, 2007; Magyar y Tóth, 2011).

*Issatchenkia terricola*, anteriormente llamada *Pichia terricola* (Deak y Beuchat, 1996), es una levadura relativamente fácil de cultivar en laboratorio, pero de tipificación complicada pues tiene mayor afinidad por el medio de cultivo que compatibilidad por los primers usados en la PCR (Brezna *et al.*, 2010). Llamada ahora *Issatchenkia terricola* ha sido identificada en la superficie de la uva (Chamberlain *et al.*, 1997; Chavan *et al.*, 2009; Francesca *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010a; Baffi *et al.*, 2011), en la superficie de uvas atacadas por *Botrytis* (Francesca *et al.*, 2010), en mosto (Fleet *et al.*, 1984; Mora *et al.*, 1988, 1990 y 1991; Povhe-Jemec *et al.*, 2001; Clemente-Jiménez *et al.*, 2004; Di Maro *et al.*, 2007; Nisiotou *et al.*, 2007; Nisiotou y Nychas, 2007; Ocón *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010a; Tofalo *et al.*, 2011) y en mostos obtenidos de uvas afectadas por *Botrytis* (Nisiotou *et al.*, 2007; Nisiotou y Nychas, 2007).

El uso de beta-glucosidasas en la industria del vino ha despertado un gran interés debido a su capacidad para promover la liberación de compuestos aromáticos a partir de monoterpenos glicosados (Gallifuoco *et al.*, 1998 y 1999). En esta línea, los estudios de González-Pombo *et al.*, 2011 en vinos Muscat muestran que la beta glucosidasa obtenida de *Issatchenkia terricola* produce la liberación monoterpenos y norisoprenoides, aumentando el aroma varietal del vino.

Finalmente cabe mencionar el hecho de que *I. terricola* presenta efecto inhibitorio frente a *Aspergillus carbonarius* (Bleve *et al.*, 2006).

Las cepas de *Yarrowia lipolytica* son únicas en su capacidad para producir un amplio espectro de ácidos orgánicos, incluidos intermediarios del ciclo del ácido tricarbóxico como los ácidos cítrico e isocítrico, y de secreción de los mismos al medio (Kamzolova *et al.*, 2003). Los estudios de Yalcin *et al.* (2009) confirmaron el crecimiento y producción de ácido cítrico de *Y. lipolytica* utilizando mosto como fuente de nutrientes.

Otras especies identificadas en menor proporción son: *Candida tropicalis* y *Rhodotorula glutinis* durante los ensayos con fermentación espontánea, y *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Pichia farinosa*, *Saccharomycopsis crataegensis*, *Galactomyces geotrichum* y el hongo *Penicillium minioluteum* durante los ensayos con adición de LSA, siendo común a los dos *Kluyveromyces delphensis*.

A pesar de la escasa literatura acerca de *Candida tropicalis*, esa levadura presenta un importante potencial biotecnológico e industrial. Así, los estudios realizados por Buzzini y Rossi (1998) demostraron la utilidad de *C. tropicalis* para la producción de riboflavina a partir de mosto concentrado.

En referencia a la aptitud enológica de esta especie, los estudios de Comitini *et al.* (2011) revelaron un elevado poder fermentativo por parte de *C. tropicalis* y *C. zemplinina*, siendo esto una excepción dentro de este género.

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por N'Guessan *et al.* (2010) quienes demostraron que se estimulaba la producción de etanol cuando la fermentación se llevaba a cabo con cultivos de *C. tropicalis* y *S. cerevisiae* en proporción (2:1), rindiendo mayor cantidad de etanol que las fermentaciones con cultivos puros de *S. cerevisiae*.

Finalmente, *Candida tropicalis* ha sido utilizada por sus proteínas “single-cell” (Ravindra, 2000), demostrando ser más ventajosas que las de algas o las de bacterias (Ravindra, 2000; Gao *et al.*, 2007).

La colonización por *Rhodotorula* se asocia normalmente con las frutas tropicales y las manzanas maduras. En el procesado de manzana la población de este género aumenta debido a la flora autóctona de la fábrica. Las prensas tradicionales para la obtención del zumo son una fuente importante de contaminación. En el zumo de pera, *Rhodotorula* es una de las levaduras autóctonas principales.

En lo que a la industria vitivinícola se refiere, esta especie ha sido identificada en el suelo del viñedo (Tutulescu y Popa, 2009), en uva (Parish y Carroll, 1985; Chamberlain *et al.*, 1997; Raspor *et al.*, 2006; Tutulescu y Popa, 2009; Francesca *et al.*, 2010), en mosto (Angulo *et al.*, 1993; Subden *et al.*, 2003; Brezna *et al.*, 2010), así como en superficies y equipamientos de la bodega (Ocón *et al.*, 2010b).

Aunque inicialmente, estudios como los llevados a cabo por Parish y Carroll (1985) considerasen un impacto mínimo de las especies del género *Rhodotorula* en la fermentación debido a su baja frecuencia de aislamiento y a su naturaleza oxidativa, estudios recientes (Raspor *et al.*, 2006; Tutulescu y Popa, 2009) han demostrado que *Rhodotorula glutinis* llega a suponer en algunos viñedos una de las especies predominantes de la flora levaduriforme de la uva.

Considerado un patógeno humano oportunista, *Candida albicans* ha sido identificada en diferentes fuentes naturales, incluido el viñedo (Zhang *et al.*, 2010a), la uva (Mrak y McClung, 1940; Amerine y Kunkee, 1968; Davenport, 1976; Parish y Carroll, 1985) y el mosto (Zhang *et al.*, 2010a). Además, un cambio en la taxonomía incluyó a la especie *C. stellatoidea*, levadura encontrada en flores de vid y en mosto (Amerine y Kunkee, 1968; Kunkee y Amerine, 1970; Davenport, 1974), dentro de la denominación *C. albicans*.

Finalmente, los estudios realizados por Francesca *et al.* (2010) identificaron esta especie en las muestras tomadas de aves cuya presencia es habitual en los viñedos, siendo éstas un posible vector de esta *Candida* a la uva.

*Candida parapsilosis*, por su parte, es una especie con una intensa actividad beta-glucosidasa (McMahon *et al.*, 1999), que ha sido aislada fundamentalmente

del mosto de uva (Zott *et al.*, 2008; Clavijo *et al.*, 2010) aunque también se puede encontrar formando parte de la flora superficial de la uva (Parish y Carroll, 1985).

En lo que respecta a *Pichia farinosa*, existe muy poca literatura acerca de esta levadura de metabolismo principalmente oxidativo encontrada por Longo *et al.* (1991) en mostos de Albariño y Valdeorras.

*Saccharomycopsis crataegensis*, especie capaz de soportar temperaturas de congelación (Chamberlain *et al.*, 1997), ha sido aislada tanto de la flora levaduriforme de la uva, dónde aparece con mayor frecuencia cuando las bayas presentan podredumbre ácida (Guerzoni y Marchetti, 1987), como del mosto (Holloway *et al.*, 1990).

El género *Galactomyces* presenta una actividad bioquímica importante en la industria alimentaria. Además, algunas cepas son débiles fitopatógenos y, ocasionalmente, se les ha asociado con enfermedad pulmonar (Naumova *et al.*, 2001).

Dentro de este género la especie más importante es *G. geotrichum* (E.E. Butler y L.J. Petersen) Redhead y Malloch (de Hoog *et al.*, 1998), la cual ha sido identificada en la superficie de la uva en los estudios de Guerzoni y Marchetti (1987).

La preocupación por los hongos filamentosos en el viñedo se ha relacionado tradicionalmente con el deterioro de la uva por el crecimiento de los mismos. Así, dentro de los hongos, los géneros encontrados con más frecuencia en la uva son: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* y *Penicillium* (Bau *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2005; Bejaoui *et al.*, 2006).

Llama la atención sin embargo que, a pesar de su capacidad para deteriorar la uva, la diversidad de hongos filamentosos en la misma no ha sido investigada en profundidad a nivel de especie (Doaré-Lebrun *et al.*, 2006; La Guerche *et al.*, 2006; Guérin *et al.*, 2007; Laforgue *et al.*, 2009).

El principal hongo responsable de la podredumbre en la uva es *Botrytis cinerea*. No obstante, existen otros hongos saprófitos que pueden causar podredumbre en la uva además de producir micotoxinas. Los dos géneros principales en la producción de micotoxinas en uva son *Aspergillus* y *Penicillium*.

Algunas especies de *Penicillium* producen aromas terrosos y mohosos; de hecho, su presencia en la uva y la aparición de estos aromas ha sido ampliamente demostrada (La Guerche, 2004; Drouillard *et al.*, 2005; Serra *et al.*, 2006; La Guerche *et al.*, 2006 y 2007; Guérin *et al.*, 2007).

Sobresalen en este aspecto los estudios de Diguta *et al.* (2011) dónde *P. minioluteum* aparece como una de las tres especies más abundantes de este género encontradas en la uva.

Junto a *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Cladosporium* y *Penicillium*, los estudios de Mikusova *et al.* (2012) ponen de manifiesto la presencia en uva de *Saccharomycete sp.* Así, la presencia de este género se da principalmente en aquellas vendimias precedidas por temperaturas más bajas y mayor humedad de lo habitual (Mikusova *et al.*, 2012).

Junto con otras levaduras, las especies del género *Kluyveromyces* pueden encontrarse presentes durante la fermentación y crianza del vino e incluso, cuando se modifican los parámetros de fermentación, pueden pasar a dominar parte del proceso afectando negativamente a la calidad del vino (Romano *et al.*, 2003; Renouf *et al.*, 2005; González *et al.*, 2007; Chavan *et al.*, 2009; Francesca *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010).

A pesar de esto, existe muy poca literatura acerca de la presencia de *Kluyveromyces delphensis* en la industria vitivinícola. No obstante, Combina *et al.* (2008) identifican esta especie en mosto de uva concentrado.

#### 5.4.4.5.2. Discusión de los resultados de tipificación de la flora levaduriforme *Saccharomyces*

El análisis de la tipificación del género *Saccharomyces* revela la presencia de *S. cerevisiae* en todas las parcelas y bajo todos tratamientos durante los dos años de vendimia. Asimismo, dentro del grupo *Saccharomyces sensu stricto* se identifican las especies: *S. paradoxus* y *S. bayanus*, esta última presente en todas las muestras de los ensayos con adición de LSA.

Dentro del grupo *Saccharomyces sensu lato*, por su parte, solamente se identifica *S. servazzii* en los ensayos con adición de LSA.

*Saccharomyces cerevisiae* es la levadura que ha sido más estrechamente asociada con la humanidad; esta especie se ha utilizado desde la antigüedad para

la elaboración de la cerveza y el vino así como para la cocción del pan. *S. cerevisiae* es, con mucho, la especie más estudiada y mejor entendida dentro de las levaduras, así como un modelo fundamental para la investigación en la biología de la célula eucariota. De hecho, la posibilidad de poder manipular todos los aspectos de su expresión génica mediante técnicas *in vitro* sitúan a *S. cerevisiae* en un lugar único entre los eucariotas.

De esta forma, aunque existen cepas de *S. cerevisiae* en poblaciones naturales aisladas de diferentes nichos, los análisis de genética poblacional, muestran la existencia de ciertos linajes estrechamente relacionados con el vino y la fermentación (Fay y Benavides, 2005; Legras *et al.*, 2007; Liti *et al.*, 2009; Schacherer *et al.*, 2009). Existe, además, un importante flujo de genes a escala global entre estas poblaciones de *Saccharomyces cerevisiae*. Este flujo puede estar facilitado por la interacción con los seres humanos y el transporte de las vides y demás equipamiento relacionado con el vino (Legras *et al.*, 2007; Liti *et al.*, 2009; Goddard *et al.*, 2010).

En líneas generales, *Saccharomyces cerevisiae* está perfectamente adaptada para colonizar fruta, un rasgo que evolucionó mucho antes que el ser humano aprendiera a aprovecharlo (Wolfe y Shields, 1997; Piskur *et al.*, 2006; Goddard, 2008). De esta forma, *S. cerevisiae* ha sido identificada en todos los ámbitos de la industria vitivinícola, desde la superficie de la uva hasta los equipamientos de bodega (Referencias revisión bibliográfica ensayos de tipificación del género *Saccharomyces*, Tabla 5.27.).

*Saccharomyces bayanus*, especie criotolerante del género *Saccharomyces* relacionada con la fermentación vínica (Fatichenti *et al.*, 1983; Cocolin *et al.*, 2000; Raspor *et al.*, 2002) se caracteriza por su capacidad para fermentar bien a bajas temperaturas (Sipiczki, 2002; Antunovics *et al.*, 2003), por su baja producción de ácido acético (Delfini y Cervetti, 1991; Sipiczki *et al.*, 2001; Vilela-Moura *et al.*, 2008; Csoma *et al.*, 2010), su elevada producción de acetaldehído (Magyar *et al.*, 2007) y por su potencial para liberar componentes de flavor deseables (Di Stefano *et al.*, 1981; Antonelli *et al.*, 1999; Sipiczki, 2002; Gangl *et al.*, 2009; Csoma *et al.*, 2010).

La región vinícola de Tokaj, comprendida entre el noreste de Hungría y el este de Eslovaquia, es uno de los nichos más importantes de esta levadura, dónde

constituye una de las especies principales en la flora levaduriforme fermentativa (Miklos *et al.*, 1994; Sipiczki *et al.*, 2001; Naumov *et al.*, 2002; Antunovics *et al.*, 2003 y 2005). Esto conlleva que *S. bayanus* aparezca frecuentemente y pueda aislarse con facilidad del vino Tokaj (Minárik y Laho, 1962; Minarik, 1965; Naumov *et al.*, 2000 y 2002; Sipiczki *et al.*, 2001; Sipiczki, 2002; Antunovics *et al.*, 2003; Sipiczki, 2003; Magyar *et al.*, 2008).

Las cepas de esta especie, con frecuencia, llegan a dominar el final de la fermentación contribuyendo de forma significativa al sabor único de estos vinos (Sipiczki *et al.*, 2001).

La elaboración del vino Tokaj se caracteriza principalmente por su fermentación a baja temperatura y por la elevada concentración inicial de azúcar en los mostos. Así, al igual que ocurre en los vinos de Tokaj, en aquellas uvas que afectadas por *Botrytis* ven aumentada su concentración de azúcar, también es frecuente la presencia de *S. bayanus*. De hecho los estudios de Sipiczki *et al.* (2001) y Antunovics *et al.* (2003) postulan que el mejor crecimiento a baja temperatura puede ser uno de los factores que hace a *S. bayanus* más eficaz en la colonización durante el otoño de las uvas atacada por *Botrytis*.

Esta característica, además, puede asegurar una ventaja durante la fermentación a baja temperatura ayudando a esta especie a imponerse sobre *S. cerevisiae*.

Aunque la región de Tokaj y los viñedos atacados por *Botrytis* se presentan como los principales hábitats de *S. bayanus*, esta especie también se ha encontrado en la zona vitivinícola de Delau Mare (Rumanía) (Matei *et al.*, 2011), en mostos de Sauvignon blanc (Zhang *et al.*, 2010a), en vinos de uvas Chardonnay, Pinot Gris y Riesling (van Keulen *et al.*, 2003), en vinos de la regiones italianas de Recioto y Amarone (Torriani *et al.*, 1999; Dellaglio *et al.*, 2003; Zapparoli *et al.*, 2003; Tosi *et al.*, 2009) y en vinos alsacianos (Demuyter *et al.*, 2004).

Finalmente, cabe mencionar algunas particularidades taxonómicas y fisiológicas que acompañan a esta especie. Taxonómicamente, los continuos cambios de posición de varias especies dentro del grupo *Saccharomyces sensu stricto*, han provocado que el nombre *Saccharomyces bayanus* haya sufrido varias interpretaciones (Yarrow, 1984; Vaughan-Martini y Martini, 1998; Nguyen *et al.*, 2000; Pulvirenti *et al.*, 2000).

Así, varias cepas de *S. bayanus* aisladas de vino fueron ubicadas como una variedad bajo el nombre *S. bayanus* var. *uvarum* (Naumov, 2000). De esta forma, considerada como nueva especie, esta variedad aparece desligada de *S. bayanus* y además se restablece la antigua especie *S. uvarum* (Pulvirenti *et al.*, 2000).

Por todo ello, la presencia de “verdaderas” cepas de *S. bayanus* en vino aparece ahora cuestionada. Las cepas vínicas de estas especies criotolerantes, principalmente *S. uvarum* han sido estudiadas en profundidad (Castellari *et al.*, 1994; Giudici *et al.*, 1995; Magyar *et al.*, 2008); sin embargo, el uso taxonómicamente inadecuado de los nombres de estas levaduras hace que sea difícil comparar las propiedades de *S. cerevisiae*, *S. uvarum* y *S. bayanus*. Hasta hace muy poco, sólo unos pocos estudios se han publicado sobre las propiedades tecnológicas de las cepas vínicas de *S. bayanus* var. *uvarum* identificadas genéticamente (Tosi *et al.*, 2009; Masneuf-Pomarede *et al.*, 2010).

Fisiológicamente, a pesar de que *S. bayanus/uvarum* está considerada de forma general como una levadura vínica criotolerante (Sipiczki, 2002), encontramos estudios como los de Csoma *et al.* (2010) en los que este rasgo no demuestra ser superior al de *S. cerevisiae*. De hecho, en estudios previos incluso se han encontrado cepas de *S. cerevisiae* que fermentan mejor a bajas temperaturas que las de *S. bayanus/uvarum* aisladas de una misma fermentación espontánea (Antunovics *et al.*, 2005).

No obstante, no es norma general que *S. bayanus/uvarum* fermente mejor a bajas temperaturas que *S. cerevisiae*. Otro hallazgo fisiológicamente interesante es que los aislados de *S. bayanus/uvarum* son mucho más sensibles a los aumentos de glucosa en el medio que *S. cerevisiae* (Strehaiano y Goma, 1983; Csoma *et al.*, 2010). Estos resultados encajan de alguna forma con el hecho de que *S. bayanus/uvarum* aparezcan frecuentemente en los mostos procedentes de uvas pasificadas o atacadas por *Botrytis* (Sipiczki, 2008). Estos aislados, además, se mostraron más sensibles que los de *S. cerevisiae* a la adición exógena de etanol, tolerando la mayoría de ellos menos contenido en cobre en el medio que *S. cerevisiae* (Strehaiano y Goma, 1983; Csoma *et al.*, 2010). Por último, destacar que el intercambio de metabolitos entre *S. bayanus/uvarum* y *S. cerevisiae* parece jugar un papel importante en la fermentación del vino (Cheraiati *et al.*, 2005).

*Saccharomyces paradoxus* presenta una amplia distribución, estando presente en la mayoría de los continentes. Esta especie se asocia normalmente con exudados de árboles de hoja ancha, insectos, suelos sin cultivar y con el corcho más que con frutas o fermentados de éstas (Naumov, 1996 y 1999; Naumov *et al.*, 1993, 1997 y 1998; Johnson *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2010c), pero algunas cepas han demostrado poseer buena aptitud enológica en relación al desarrollo de la fermentación y la producción de compuestos aromáticos (Naumov *et al.*, 2000 y 2002; Sipiczki *et al.*, 2001; Majdak *et al.*, 2002; Redzepovic *et al.*, 2003; Orlic *et al.*, 2007, 2010). Incluso se ha llegado a proponer esta especie como un enfoque alternativo a la fermentación de Chardonnay, al igual que *S. bayanus* en algunos casos (Eglinton *et al.*, 2000)

De hecho, actualmente se sabe que *S. cerevisiae* aparece en poblaciones naturales junto con *S. paradoxus* (Sniegowski *et al.*, 2002; Sampaio y Gonçalves, 2008). De esta forma Sampaio y Gonçalves (2008), en base a sus resultados han propuesto un nuevo modelo de nicho ecológico para *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. paradoxus* y *S. uvarum* en el que la corteza de árbol constituye el reservorio primario. Los ambientes ricos en azúcares relacionados con la maduración de diferentes tipos de flores y frutas, al ser de naturaleza estacional, constituirían el hábitat secundario.

Finalmente estos autores, que utilizan una temperatura de aislamiento de 10°C en lugar de la tradicional de 30°C, sugieren que la presencia de las especies mejor adaptadas a las bajas temperaturas podrían haberse perdido en estudios previos de caracterización de la población de *Saccharomyces* debido a la utilización de temperaturas excesivamente altas durante la incubación. La incapacidad de las cepas termosensibles para crecer a temperaturas elevadas puede verse además agravada por la mayor toxicidad del etanol a esas temperaturas.

En base a lo expuesto anteriormente resulta, sin embargo, curioso que *Saccharomyces paradoxus*, a pesar de su capacidad para fermentar se aísle con poca frecuencia de fruta o de sus fermentados.

*Saccharomyces servozzii*, especie que pertenece al grupo *sensu lato* del género *Saccharomyces* no ha sido estudiada en profundidad. Hasta ahora, esta levadura ha sido aislada en masa de panadería fermentada (Gobbetti *et al.*, 1994; Foschino y Galli, 1997; Gobbetti, 1998; Succi *et al.*, 2003; Foschino *et al.*, 2004; Arendt *et al.*,

2007), y en encurtidos de rábano procedentes de Japón (Takuan-zuke), dónde *S. servazzii* juega un papel crucial en el proceso de fabricación (Kato y Nakase, 1986; Kato *et al.*, 1991; Tominaga *et al.*, 2003). Finalmente las investigaciones de Nam *et al.* (2008) aislaron esta levadura de muestras fecales en poblaciones coreanas. Respecto a un posible uso enotécnico, mencionar el hecho de que algunos estudios *in vitro* han revelado la existencia de cepas mutantes de *S. servazzi* capaces de producir el doble de alcohol isoamílico y de acetato isoamílico que las cepas originales (Quilter *et al.*, 2003; Tominaga *et al.*, 2003).

#### 5.4.5. Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación

La fermentación espontánea del mosto es un proceso complejo caracterizado por la presencia de una gran variedad de géneros y especies de levaduras (Heard y Fleet, 1988), que contribuyen al flavor de los vinos (Lambrechts y Pretorius, 2000; Fleet, 2003; Di Maro *et al.*, 2007). En el mosto y durante las primeras fases de la fermentación dominan las especies de bajo poder fermentativo como *Hanseniaspora*, *Candida* y *Metschnikowia* (Longo *et al.*, 1991). A veces, en estas fases, pueden aparecer también especies de *Pichia*, *Issatchenkia* y *Kluyveromyces*. Estas levaduras, que llegan a alcanzar poblaciones de  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml, comienzan a desaparecer hacia mitad de la fermentación.

Bajo estas condiciones las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, que son más tolerantes al etanol y más competitivas a la hora de crecer en medios con altas concentraciones de azúcar (Querol *et al.*, 1990) pasan a ser dominantes completando el proceso (Fleet y Heard, 1993). La producción de etanol por parte de *Saccharomyces cerevisiae* es el factor de mayor influencia sobre el crecimiento de las especies no *Saccharomyces* durante la fermentación. De forma general, las especies de *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia* e *Issatchenkia* no toleran concentraciones de etanol superiores al 5-7% (Heard y Fleet, 1988). No obstante, el número de especies y su presencia a lo largo de la fermentación depende de factores como el área de producción (Amerine y Kunkee, 1968), las condiciones climáticas (Fleet *et al.*, 1984; Parish y Carroll, 1985), año de vendimia, variedad de uva utilizada, integridad, estado sanitarios de la misma y técnica de vendimia (Cuinier, 1976; Martini *et al.*, 1980; Rosini *et al.*, 1982) y proceso de vinificación (Poulard, 1984), con las consiguientes variaciones en la

calidad del vino tanto entre regiones como de un año a otro (Querol *et al.*, 1990). Esto hace que el resultado de la fermentación espontánea sea difícil de predecir (Pretorius, 2000). En un intento de solucionar este problema muchos productores utilizan cultivos puros de *Saccharomyces cerevisiae*, que inoculan en el mosto tras el prensado. A continuación se detallan los resultados de la evolución de la flora levaduriforme hallada en las diferentes vinificaciones llevadas a cabo. Las muestras de mosto I se tomaron a los 3 días de fermentación, las correspondientes a mosto II a los seis días de fermentación y las de vino a los 10 días, que es la duración total del proceso fermentativo.

#### 5.4.5.1. Evolución de la flora durante la vinificación bajo BPA y CPA

Las Tablas 5.11. – 5.17. muestran la evolución de la flora levaduriforme a lo largo de las vinificaciones ensayadas con fermentación espontánea y adición de fungicidas, tanto en BPA como en condiciones desfavorables.

En la uva la población de levaduras presenta una gran homogeneidad en todas las parcelas. Los géneros *Clavispora*, *Metschnikowia* y *Debaryomyces* son los principales dentro de las levaduras no *Saccharomyces*. De esta forma, las especies *Clavispora lusitaniae*, *Metschnikowia pulcherrima* y *Debaryomyces hansenii* se encuentran en todas las muestras de uva, tanto control como tratadas, independientemente del fungicida ensayado. Asimismo en todas las muestras control y en todas las tratadas con fungicidas bajo BPA, la evolución de la flora a lo largo de la vinificación sigue la secuencia normal de poblaciones. Así, en las primeras fases, el predominio corresponde a las especies no *Saccharomyces* para, posteriormente, ser sustituidas de forma gradual por especies del género *Saccharomyces* de mayor poder fermentativo y mayor tolerancia al etanol.

En las muestras tratadas en condiciones desfavorables la secuencia de poblaciones sigue la misma dinámica. Así, en los distintos mostos, las especies del género *Saccharomyces* van desplazando a las levaduras no *Saccharomyces* hasta dominar la fermentación. Es por ello que, en todas las vinificaciones ensayadas, *Saccharomyces cerevisiae* se identifica como especie única y dominante del proceso fermentativo desde el mosto I en los casos de famoxadona, fenhexamida y quinoxifen en CPA así como trifloxistrobin en BPA, y desde el mosto II en el resto de principios activos.

A continuación se analiza la evolución de la flora de forma pormenorizada, vinificación a vinificación, encontrando los siguientes resultados:

En la vinificación control (Tabla 5.11.) las levaduras no *Saccharomyces* tienen en *C. lusitaniae* a su especie más abundante, constituyendo ésta las tres cuartas partes de la población levaduriforme de la uva. Además de esta *Clavispora*, en la uva también se encuentran *M. pulcherrima* y, en menor medida, *D. hansenii* y *Metschnikowia sp*, ambas con un 5% de población de las cepas aisladas. El análisis de los mostos revela una caída drástica de la población no *Saccharomyces*. Así, en el mosto I, el 80% de la población pertenece al género *Saccharomyces* (50% *S. cerevisiae* y 30% *S. paradoxus*). La flora no *Saccharomyces*, por su parte, queda reducida a la especie *Candida tropicalis*. En el resto de muestras analizadas, mosto II y vino, la única especie encontrada es *S. cerevisiae*.

En las muestras tratadas con famoxadona bajo BPA, la flora encontrada en uva está formada exclusivamente por levaduras no *Saccharomyces*, dónde *C. lusitaniae* es la especie dominante (80% de la población) seguida por *M. pulcherrima* y *D. hansenii*, ambas con un 10% de la población. La desaparición de la población no *Saccharomyces* en los mostos es evidente pues, ya en el mosto I más del 80% de la población está constituida por *S. cerevisiae*. Las levaduras no *Saccharomyces* están representadas por *Kluyveromyces delphensis* como única especie de este grupo remanente en el mosto. En el resto de muestras de mosto II y vino *S. cerevisiae* es la única levadura presente (Tabla 5.12.).

En las muestras de mosto I, mosto II y vino tratadas con famoxadona, fenhexamida y quinoxifen en condiciones desfavorables, la única especie identificada es *Saccharomyces cerevisiae* (Tablas 5.12., 5.13. y 5.16.).

En el caso de fenhexamida aplicada bajo BPA, las levaduras presentes en la uva presentan las mismas especies que en las muestras tratadas con famoxadona. En el mosto I encontramos que casi la mitad de la población, integrada por *Candida tropicalis* (30%) y *Kluyveromyces delphensis* (15%), aún es no *Saccharomyces*. La población restante pertenece al género *Saccharomyces*: *S. paradoxus* (45%) y *S. bayanus* (10%). El resto del proceso está dominado por *S. cerevisiae*, única especie identificada en el mosto II y en el vino (Tabla 5.13.).

Si el tratamiento se lleva a cabo con fluquinconazol (Tabla 5.14.), en aquellas muestras en las que la aplicación se realiza respetando los plazos de seguridad, la

evolución de la flora levaduriforme a lo largo de la vinificación sigue la misma secuencia de poblaciones que la encontrada en las muestras control. Cuando las vinificaciones se hacen con las muestras tratadas en condiciones desfavorables, la población de *S. paradoxus* desaparece del mosto I. Así, en este mosto, *S. cerevisiae* queda como especie mayoritaria y *C. tropicalis*, con un 25% de la población, como única levadura no *Saccharomyces*. En las muestras de mosto II y de vino, por su parte, *S. cerevisiae* es la única especie identificada.

En los tratamientos con kresoxim-metil (Tabla 5.15.) bajo condiciones de aplicación BPA, la uva presenta una flora exclusivamente no *Saccharomyces* formada por: *C. lusitaniae* (63%), *M. pulcherrima* (25%), *D. hansenii* (4%) y *Rhodotorula glutinis* (8%). Esta especie del género *Rhodotorula* solamente se identifica en las uvas tratadas con este principio activo. En el mosto I la población no *Saccharomyces* desaparece. De esta forma, la flora identificada es íntegramente *Saccharomyces*: *S. cerevisiae* (65%) y *S. paradoxus* (35%), especie esta última que desaparece en mosto II y vino para quedar *S. cerevisiae* como especie única y dominante del proceso. Por otra parte, en condiciones adversas, la evolución secuencial de las diferentes especies de levaduras en mosto y vino es igual a la hallada en BPA.

En los tratamientos con quinoxifen bajo BPA (Tabla 5.16.) las muestras de uva presentan la misma población que la encontrada en la parcela control. En el mosto I el género *Saccharomyces* es mayoritario en la flora: *S. cerevisiae* (45%) y *S. paradoxus* (25%). La población no *Saccharomyces* está integrada por *C. tropicalis* (20%) y *Saccharomycete sp* (10%). En el resto de muestras, mosto II y vino, solamente se identifica la especie *S. cerevisiae*.

En las muestras tratadas con trifloxistrobin bajo BPA (Tabla 5.17.) la flora levaduriforme de la uva presenta la misma variedad de especies que la encontrada en el control. Cuando la aplicación se lleva a cabo bajo BPA, tanto en los mostos I y II como en el vino, la única especie identificada es *S. cerevisiae*. Cuando el tratamiento se hace bajo CPA, en el mosto I la población no *Saccharomyces*, reducida al 20%, está formada por únicamente por *C. tropicalis*. La flora *Saccharomyces*, por su parte, la conforman las especies *S. cerevisiae* (45%), *S. paradoxus* (25%) y *S. bayanus* (10%). En el resto de muestras, mosto II y vino, *S. cerevisiae* es la única levadura presente.

**Tabla 5.11.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea en la parcela control (no tratada).

	<b>Uva</b>	<b>Mosto I</b>	<b>Mosto II</b>	<b>Vino</b>
<b>Control</b>	<i>C. lusitaniae</i> (75%) <i>M. pulcherrima</i> (15%) <i>Metschnikowia</i> sp (5%) <i>D. hansenii</i> (5%)	<i>S. cerevisiae</i> (50%) <i>S. paradoxus</i> (30%) <i>C. tropicalis</i> (20%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)

**Tabla 5.12.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de famoxadona.

	<b>Uva</b>	<b>Mosto I</b>	<b>Mosto II</b>	<b>Vino</b>
<b>BPA</b>	<i>C. lusitaniae</i> (80%)	<i>S. cerevisiae</i> (85%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)
	<i>M. pulcherrima</i> (10%)	<i>K. delphensis</i> (15%)		
	<i>D. hansenii</i> (10%)			
<b>CPA</b>	<b>No tipificada</b>	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)

**Tabla 5.13.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de fenhexamida.

	<b>Uva</b>	<b>Mosto I</b>	<b>Mosto II</b>	<b>Vino</b>
<b>BPA</b>	<i>C. lusitaniae</i> (70%)	<i>S. paradoxus</i> (45%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)
	<i>M. pulcherrima</i> (18%)	<i>C. tropicalis</i> (30%)		
	<i>D. hansenii</i> (12%)	<i>K. delphensis</i> (15%)		
		<i>S. bayanus</i> (10%)		
<b>CPA</b>	<b>No tipificada</b>	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)

**Tabla 5.14.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de fluquinconazol.

	Uva	Mosto I	Mosto II	Vino
BPA	<i>C. lusitanae</i> (73%) <i>M. pulcherrima</i> (12%) <i>Metschnikowia</i> sp (5%)	<i>S. cerevisiae</i> (50%) <i>S. paradoxus</i> (30%) <i>C. tropicalis</i> (20%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)
	<i>D. hansenii</i> (10%)			
CPA	No tipificada	<i>S. cerevisiae</i> (75%) <i>C. tropicalis</i> (25%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)

**Tabla 5.15.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de kresoxim-metil.

	Uva	Mosto I	Mosto II	Vino
BPA	<i>C. lusitanae</i> (63%) <i>M. pulcherrima</i> (25%) <i>R. glutinis</i> (8%) <i>D. hansenii</i> (4%)	<i>S. cerevisiae</i> (65%) <i>S. paradoxus</i> (35%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)
CPA	No tipificada	<i>S. cerevisiae</i> (65%) <i>S. paradoxus</i> (35%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)

**Tabla 5.16.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de quinoxifen.

	Uva	Mosto I	Mosto II	Vino
<b>BPA</b>	<i>C. lusitaniae</i> (60%)	<i>S. cerevisiae</i> (45%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)
	<i>M. pulcherrima</i> (27%)	<i>S. paradoxus</i> (25%)		
	<i>Metschnikowia</i> sp (7%)	<i>Saccharomyces</i> sp (10%)		
	<i>D. hansenii</i> (6%)	<i>C. tropicalis</i> (20%)		
<b>CPA</b>	<b>No tipificada</b>	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)

**Tabla 5.17.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con fermentación espontánea bajo condiciones BPA y CPA en la aplicación de trifloxistrobin.

	Uva	Mosto I	Mosto II	Vino
<b>BPA</b>	<i>C. lusitaniae</i> (65%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)
	<i>M. pulcherrima</i> (15%)			
	<i>Metschnikowia</i> sp (6%)			
	<i>D. hansenii</i> (14%)			
<b>CPA</b>	<b>No tipificada</b>	<i>S. cerevisiae</i> (45%) <i>S. paradoxus</i> (25%) <i>C. tropicalis</i> (20%) <i>S. bayanus</i> (10%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)

#### 5.4.5.2. Evolución de la flora durante la vinificación control sin adición de LSA en el segundo año de ensayos

La secuencia de especies de levaduras a lo largo de la vinificación en los ensayos control sin adición de LSA se recoge en la Tabla 5.18.

Los resultados obtenidos muestran que la variedad de especies encontrada en los ensayos con fermentación espontánea durante el segundo año es mucho mayor que en el primero. No obstante, esta diferencia se encuentra solamente en las muestras de uva y mosto I, pues en ambos años de vendimia la única especie identificada en las muestras de mosto II y vino es *S. cerevisiae*.

La flora presente en la uva control del segundo año es mayoritariamente no *Saccharomyces*, manteniendo las mismas especies que el primer año excepto *Metschnikowia sp* y *Debaryomyces hansenii*. Asimismo las especies comunes al primer año no presentan las mismas proporciones; de esta forma, *Metschnikowia pulcherrima* aparece ahora, con más de la mitad de la población, como especie predominante mientras que *Clavispora lusitaniae*, dominante el primer año, alcanza ahora sólo el 10% de las cepas identificadas. Junto a las especies citadas anteriormente, se identifican también *Yarrowia lipolytica* con casi un cuarto de la población, *Candida zemplinina* con un 10% y, en menor medida, *Aureobasidium pullulans* y *S. bayanus* (ambas con un 3%).

En el mosto I, *M. pulcherrima* pierde su predominio bajando hasta un 19% de la población, en contraposición al aumento de *C. lusitaniae*, que casi dobla su población respecto a la presente en uva y a la aparición de *Issatchenkia terricola* (17%). Por otro lado mientras *C. zemplinina* mantiene su 10% de población, *A. pullulans* desaparece. Además de los cambios citados, la población no *Saccharomyces* ve aumentada su variedad de especies con la aparición de: *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea*, *Kluyveromyces delphensis*, *Pichia farinosa*, *Penicillium minioluteum*, *Galactomyces geotrichum* y *Saccharomycopsis crataegensis*, todos con un 3% de la población. Finalmente *Candida tropicalis*, única especie no *Saccharomyces* en el mosto I del primer año, no se identificó durante el segundo. En este mismo mosto I la población de *Saccharomyces*, que solamente supone un 15%, está formada por *S. servazzii* (6%), no identificada durante el primer año, *S. cerevisiae* (6%) y *S. paradoxus* (3%). Estas dos últimas presentan porcentajes mucho menores a los hallados en el primer año.

Tabla 5.18.- Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación control sin adición de LSA.

	Uva	Mosto I	Mosto II	Vino
Control	<i>M. pulcherrima</i> (52%) <i>Y. lipolytica</i> (23%) <i>C. lusitaniae</i> (10%) <i>C. zemplinina</i> (10%) <i>S. bayanus</i> (3%) <i>A. pullulans</i> (3%)	<i>M. pulcherrima</i> (19%) <i>C. lusitaniae</i> (17%) <i>I. terricola</i> (17%) <i>C. zemplinina</i> (10%) <i>S. servazzii</i> (6%) <i>S. cerevisiae</i> (6%) <i>S. paradoxus</i> (3%) <i>C. parasilopsis</i> (3%) <i>K. delphensis</i> (3%) <i>P. farinosa</i> (3%) <i>C. stellatoidea</i> (3%) <i>P. minioluteum</i> (3%) <i>G. geotrichum</i> (3%) <i>S. crataegensis</i> (3%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)	<i>S. cerevisiae</i> (100%)

#### 5.4.5.3. Evolución de la flora durante la vinificación con adición de LSA en muestras control y tratadas bajo CPA

Las Tablas 5.19. – 5.25. muestran la evolución de la flora levaduriforme a lo largo de las vinificaciones ensayadas con adición de levaduras secas activas. En todos los casos la aplicación de los fungicidas se hizo en condiciones adversas (CPA). Las poblaciones de las muestras de uva presentan una gran homogeneidad, identificándose en todas las mismas especies: *Metschnikowia pulcherrima*, *Yarrowia lipolytica*, *Clavispora lusitaniae*, *Candida zemplinina*, *Aureobasidium pullulans* y *Saccharomyces bayanus*. Esta población, además, está en concordancia con la encontrada en la uva procedente de los ensayos sin adición de LSA.

En el mosto I control la población de *M. pulcherrima* disminuye mientras que la de *C. lusitaniae* aumenta; además, se produce la aparición de *Issatchenkia terricola*, que alcanza un 25% de la población. En lo que respecta al género *Saccharomyces*, la población inicial de *S. bayanus* en uva se mantiene en los mismos niveles en este mosto. En el mosto II la población no *Saccharomyces* desaparecen, identificándose únicamente a *S. bayanus*, que supone ya el 70% de la flora, y a *S. cerevisiae*. Finalmente, en las muestras de vino se identificó a *Saccharomyces bayanus* como única levadura.

En el mosto I tratado con famoxadona la flora no *Saccharomyces* está formada por *M. pulcherrima*, que ve reducida su población en un 25%, *C. lusitaniae* e *I. terricola*, ambas con un 27%. Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *S. bayanus* presente en la uva supone ahora el 10% de la población de este mosto. En el resto de muestras, mosto II y vino, *S. bayanus* es la única levadura presente (Tabla 5.20.).

En las muestras tratadas con fenhexamida y quinoxifen (Tablas 5.21. y 5.24.), *M. pulcherrima*, *C. lusitaniae*, *I. terricola* y *C. zemplinina* aparecen como especies predominantes en el mosto I, mientras que *S. bayanus* sólo supone el 3% de la población. En las muestras de mosto II, las levaduras no *Saccharomyces* desaparecen, identificándose exclusivamente a *S. bayanus* y *S. cerevisiae*. Finalmente, en las muestras de vino la única especie identificada es *S. bayanus*.

**Tabla 5.19.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación control con adición de LSA.

	<b>Uva</b>	<b>Mosto I</b>	<b>Mosto II</b>	<b>Vino</b>
<b>Control (LSA)</b>	<i>M. pulcherrima</i> (48%) <i>C. zemplinina</i> (23%) <i>C. lusitaniae</i> (16%) <i>Y. lipolytica</i> (7%) <i>S. bayanus</i> (3%) <i>A. pullulans</i> (3%)	<i>M. pulcherrima</i> (32%) <i>C. lusitaniae</i> (25%) <i>I. terricola</i> (25%) <i>C. zemplinina</i> (15%) <i>S. bayanus</i> (3%)	<i>S. bayanus</i> (70%) <i>S. cerevisiae</i> (30%)	<i>S. bayanus</i> (100%)

**Tabla 5.20.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de famoxadona.

	Uva	Mosto I	Mosto II	Vino
<b>Famoxadona (LSA)</b>	<i>M. pulcherrima</i> (60%)	<i>M. pulcherrima</i> (35%)	<i>S. bayanus</i> (100%)	<i>S. bayanus</i> (100%)
	<i>Y. lipolytica</i> (12%)	<i>C. lusitaniae</i> (27%)		
	<i>C. zemplinina</i> (11%)	<i>I. terricola</i> (27%)		
	<i>C. lusitaniae</i> (8%)	<i>S. bayanus</i> (10%)		
	<i>S. bayanus</i> (3%)			
<i>A. pullulans</i> (6%)				

**Tabla 5.21.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de fenhexamida.

	Uva	Mosto I	Mosto II	Vino
<b>Fenhexamida (LSA)</b>	<i>M. pulcherrima</i> (50%)	<i>M. pulcherrima</i> (32%)	<i>S. bayanus</i> (50%)	<i>S. bayanus</i> (100%)
	<i>Y. lipolytica</i> (23%)	<i>C. lusitaniae</i> (26%)	<i>S. cerevisiae</i> (50%)	
	<i>A. pullulans</i> (13%)	<i>I. terricola</i> (23%)		
	<i>S. bayanus</i> (10%)	<i>C. zemplinina</i> (16%)		
	<i>C. lusitaniae</i> (3%)	<i>S. bayanus</i> (3%)		
<i>C. zemplinina</i> (1%)				

**Tabla 5.22.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de fluquinconazol.

	<b>Uva</b>	<b>Mosto I</b>	<b>Mosto II</b>	<b>Vino</b>
<b>Fluquinconazol (LSA)</b>	<i>M. pulcherrima</i> (58%) <i>Y. lipolytica</i> (20%) <i>C. lusitaniae</i> (8%) <i>C. zemplinina</i> (5%) <i>S. bayanus</i> (5%) <i>A. pullulans</i> (4%)	<i>M. pulcherrima</i> (29%) <i>C. lusitaniae</i> (26%) <i>I. terricola</i> (26%) <i>C. zemplinina</i> (16%) <i>S. bayanus</i> (3%)	<i>S. bayanus</i> (100%)	<i>S. bayanus</i> (100%)

**Tabla 5.23.-** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de kresoxim-metil.

	<b>Uva</b>	<b>Mosto I</b>	<b>Mosto II</b>	<b>Vino</b>
<b>Kresoxim metil (LSA)</b>	<i>M. pulcherrima</i> (62%) <i>C. lusitaniae</i> (21%) <i>C. zemplinina</i> (10%) <i>S. bayanus</i> (3%) <i>A. pullulans</i> (2%) <i>Y. lipolytica</i> (2%)	<i>M. pulcherrima</i> (32%) <i>C. lusitaniae</i> (26%) <i>I. terricola</i> (23%) <i>C. zemplinina</i> (16%) <i>S. bayanus</i> (3%)	<i>S. bayanus</i> (100%)	<i>S. bayanus</i> (100%)

**Tabla 5.24.** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de quinoxifen.

	Uva	Mosto I	Mosto II	Vino
<b>Quinoxifen (LSA)</b>	<i>M. pulcherrima</i> (52%) <i>Y. lipolytica</i> (30%) <i>C. zemplinina</i> (8%) <i>C. lusitanae</i> (4%) <i>S. bayanus</i> (3%) <i>A. pullulans</i> (3%)	<i>M. pulcherrima</i> (32%) <i>C. lusitanae</i> (26%) <i>I. terricola</i> (26%) <i>C. zemplinina</i> (13%) <i>S. bayanus</i> (3%)	<i>S. bayanus</i> (75%) <i>S. cerevisiae</i> (25%)	<i>S. bayanus</i> (100%)

**Tabla 5.25.** Evolución de la flora levaduriforme durante la vinificación con adición de LSA en la aplicación de trifloxistrobin.

	Uva	Mosto I	Mosto II	Vino
<b>Trifloxistrobin (LSA)</b>	<i>M. pulcherrima</i> (51%) <i>Y. lipolytica</i> (13%) <i>C. lusitanae</i> (13%) <i>C. zemplinina</i> (10%) <i>S. bayanus</i> (10%) <i>A. pullulans</i> (3%)	<i>M. pulcherrima</i> (36%) <i>C. lusitanae</i> (32%) <i>I. terricola</i> (29%) <i>S. bayanus</i> (3%)	<i>S. bayanus</i> (50%) <i>S. cerevisiae</i> (50%)	<i>S. bayanus</i> (100%)

La flora identificada en los mostos y vinos procedentes de las muestras tratadas con fluquinconazol y kresoxim-metil (Tablas 5.22. y 5.23.) siguen la misma evolución. Así, en el mosto I se identifican, en orden decreciente de población, las especies: *M. pulcherrima*, *C. lusitaniae*, *I. terricola*, *C. zemplinina* y *S. bayanus*. Finalmente, en las muestras, tanto de mosto II como de vino, la única especie identificada es *S. bayanus*.

En las muestras tratadas con trifloxistrobin la secuenciación de especies encontrada es igual a la del control a excepción de *C. zemplinina*, que desaparece de las muestras de mosto I.

#### 5.4.5.4. Discusión de los resultados de la evolución de la flora durante la vinificación

Una vez analizada la evolución de las poblaciones durante el proceso de vinificación encontramos que ésta, tanto en fermentaciones espontáneas como en aquellas desarrolladas con adición de LSA, se ajusta a la secuencia normal de especies. De esta forma, en la uva y en las primeras fases de la fermentación, el predominio corresponde a las especies no *Saccharomyces* para, posteriormente, ser sustituidas gradualmente por especies del género *Saccharomyces* de mayor poder fermentativo y mayor tolerancia al etanol (Parish y Carroll, 1985; Mora *et al.*, 1988 y 1990; Angulo *et al.*, 1993; Deak y Beuchat, 1996; Constantí *et al.*, 1997 y 1998; Povhe-Jemec *et al.*, 2001; Torija *et al.*, 2001; Mills *et al.*, 2002; Zohre y Erten, 2002; Nissen y Arneborg, 2003; Combina *et al.*, 2005; Nurgel *et al.*, 2005; Povhe-Jemec y Raspor, 2005; Pérez-Nevado *et al.*, 2006; Di Maro *et al.*, 2007; Nisiotou *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2009; Francesca *et al.*, 2010; Parapouli *et al.*, 2010; Hall *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2011).

El dominio de las cepas no *Saccharomyces* en las primeras fases de la fermentación espontánea ha sido demostrada anteriormente por otros investigadores (Heard y Fleet, 1988; Moreno *et al.*, 1991; Fleet y Heard, 1993; Zironi *et al.*, 1993; Querol *et al.*, 1994; Regodón *et al.*, 1997; Toro y Vazquez, 2002; Demyttenaere *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2003; Clemente-Jimenez *et al.*, 2004 y 2005; Abbas, 2006; Nikolaou *et al.*, 2006; Fleet, 2008).

De hecho, especies no *Saccharomyces* pertenecientes a géneros como *Candida* y *Pichia* se han utilizado, seguidos de *Saccharomyces*, como primeros inóculos en

vinificaciones piloto (Zironi *et al.*, 1993; Toro y Vazquez, 2002; Rojas *et al.*, 2003; Clemente-Jimenez *et al.*, 2005).

Asimismo el hecho de que las especies del género *Metschnikowia* predominen en las primeras etapas de la fermentación implica, tal y como ocurre en nuestros resultados, una presencia importante de este género en la superficie de la uva (Rosini *et al.*, 1982; Heard y Fleet, 1988; Schütz y Gafner, 1993; Vaughan-Martini y Martini, 1995; Martini *et al.*, 1996; Ramón, 1997; Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Raspor *et al.*, 2006).

Como se ha mencionado anteriormente, la tolerancia al etanol probablemente contribuye a la desaparición de estas levaduras cuando las concentraciones de etanol alcanzan el 5-6% v/v. Así, estudios como los de Heard y Fleet (1988) y Clemente-Jiménez *et al.* (2004), muestran que la inoculación de varias especies de *Kloeckera*, *Candida*, *Issatchenkia*, *Metschnikowia* y *Pichia* en mosto rinde una concentración máxima de etanol de menos del 6%.

En un estudio exhaustivo, Pina *et al.* (2004) sugirieron varios factores que influyen en la tolerancia al etanol de las levaduras no *Saccharomyces* incluyendo especie, presencia de oxígeno y adición de factores de supervivencia.

No obstante, la tolerancia al etanol puede no ser el único factor responsable de la desaparición de las especies no *Saccharomyces*; Así, Nissen y Arneborg, (2003) indicaron que la muerte temprana de *Kluyveromyces* y *Torulaspora* no podía ser explicada por escasez de nutrientes o por presencia de componentes tóxicos, y parece verse afectada por un mecanismo de contacto "célula a célula" con una elevada población celular de *Saccharomyces*.

En lo que al género *Saccharomyces* se refiere, estudios como los de Mortimer y Polsinelli (1999) revelan su efímera presencia en la uva; no obstante podemos encontrar especies de este género en el mosto, pero a menudo en poblaciones menores de 50 UFC/mL (Fleet y Heard, 1993). Así, la habitual ausencia de aislados de *Saccharomyces* del viñedo podría ser un reflejo de la preferencia de esta levadura por los ambientes con un elevado contenido en azúcar del zumo de uva y de la fermentación. No obstante, la presencia de especies de este género en la uva varía de un viñedo a otro y entre diferentes años de vendimia (Tini *et al.*, 1979; Grando y Colato, 1994; Versavaud *et al.*, 1995; Pramateftaki *et al.*, 2000;

Antunovics *et al.*, 2005; Combina *et al.*, 2005; Schuller *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2006; Gonzalez *et al.*, 2007; Lopandic *et al.*, 2008).

Por otro lado, el limitado número de *S. cerevisiae* en las uvas (Martini, 1993) y la evidencia de que esta levadura no aparece específicamente asociada con el viñedo u otros sustratos naturales llevaron a Martini *et al.* (1996) a concluir que las uvas no son la fuente primaria de *S. cerevisiae*, sino que se asocia estrictamente con la bodega y las plantas de fermentación. De hecho, en el caso de existir células de *S. cerevisiae* en la uva, su contribución a la fermentación espontánea del mosto es extremadamente limitada (Ciani *et al.*, 2004).

No obstante, otros autores aun reconociendo la efímera presencia de células de *S. cerevisiae* en la uva, sostienen que las células residentes en el viñedo juegan un papel importante en la fermentación natural y la presencia o ausencia de *S. cerevisiae* difiere con cada planta y cada racimo. Török *et al.* (1996) mediante métodos de aislamiento muy elaborados, análisis genético clásico y cariotipado electroforético demostraron que el viñedo es la fuente primaria de las levaduras vínicas y que las cepas encontradas en las uvas pueden seguirse a lo largo del proceso fermentativo. La selectividad del medio se amplía mientras se desarrolla el proceso fermentativo, se establecen las condiciones anaeróbicas, por la actividad antimicrobiana del SO<sub>2</sub> añadido, la disminución de nutrientes y los niveles de etanol aumentados.

En la misma línea que otros estudios previos (Fleet y Heard, 1993; Pretorius *et al.*, 1999; Jolly *et al.*, 2006; Fleet, 2008) nuestros resultados muestran que *Saccharomyces cerevisiae* domina en las últimas fases de la fermentación espontánea.

Este hecho concuerda, como ya se mencionó anteriormente, con la evolución normal de la flora en la que las levaduras no *Saccharomyces* desaparecen durante las primeras fases de la fermentación debido a su incapacidad para tolerar el aumento en el contenido de etanol del mosto (Egli *et al.*, 1998; Cocolin *et al.*, 2000; Fleet, 2003; Pérez-Nevado *et al.*, 2006).

Finalmente, en las Tablas (5.26. – 5.27.) se presenta una revisión bibliográfica de las especies de levaduras, tanto no *Saccharomyces* como *Saccharomyces* identificadas en estudios de tipificación llevados a cabo sobre flora levaduriforme vínica.

**Tabla 5.26.-** Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no *Saccharomyces*.

Lev. no <i>Saccharomyces</i>	Referencia(s)
<b><i>Aureobasidium</i></b>	
<i>A. pullulans</i>	(3) (6) (12) (17) (30) (36) (48) (49) (50) (55) (57) (61) (63) (71) (73) (78) (79) (82) (85) (91) (95)
<b><i>Brettanomyces</i></b>	
<i>B. anomalus</i>	(21) (48)
<i>B. bruxellensis</i>	(8) (48) (51) (59) (62) (70) (81)
<b><i>Bulleromyces</i></b>	
<i>B. albus</i>	(82)
<b><i>Candida</i></b>	
<i>C. albicans</i>	(1) (75) (83) (94)
<i>C. apicola</i>	(86) (87)
<i>C. azyma</i>	(60)
<i>C. beechii</i>	(86)
<i>C. boidinii</i>	(97)
<i>C. bombi</i>	(42) (76)
<i>C. bombicola</i>	(86)
<i>C. cantarellii</i>	(72) (83) (86) (94)
<i>C. edax</i>	(1)
<i>C. ethanolica</i>	(19)
<i>C. diversa</i>	(6) (12) (51) (54) (55) (83) (86) (94)
<i>C. glabrata</i>	(8) (54) (55)
<i>C. guilliermondii</i>	(8) (16) (17) (44) (54) (55) (58) (62) (64) (73) (76) (81) (87) (90) (97)
<i>C. incommunis</i>	(46)
<i>C. inconspicua</i>	(76) (83) (94)
<i>C. intermedia</i>	(79)
<i>C. magnoliae</i>	(20)
<i>C. montana</i>	(86)
<i>C. oleophila</i>	(37) (83) (94)

**Tabla 5.26(b).**- Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no *Saccharomyces*.

Lev. no <i>Saccharomyces</i>	Referencia(s)
<b><i>Candida</i> (cont.)</b>	
<i>C. pararugosa</i>	(58) (62)
<i>C. parapsilosis</i>	(17) (58) (73)
<i>C. quercitrusa</i>	(60) (76)
<i>C. railenensis</i>	(71)
<i>C. rugosa</i>	(8)
<i>C. sake</i>	(1)
<i>C. salmanticensis</i>	(83) (94)
<i>C. sorboxylosa</i>	(51) (78)
<i>C. stellata</i>	(5) (6) (7) (8) (9) (11) (12) (13) (14) (15) (16)
	(18) (21) (23) (26) (27) (29) (30) (32) (35) (37) (38) (39) (42) (45) (48) (51)
	(53) (55) (56) (72) (75) (78) (88) (94)
<i>C. stellimalicola</i>	(78)
<i>C. tropicalis</i>	(77) (83) (86)
<i>C. valida</i>	(1) (8) (10) (26) (29) (44) (49) (52) (58) (60)
	(68) (79)
<i>C. vinaria</i>	(68) (79) (86)
<i>C. vini</i>	(8) (19) (42) (52) (68)
<i>C. wickerhamii</i>	(79)
<i>C. zeylanoides</i>	(30) (67)
<i>C. zemplinina</i>	(35) (39) (53) (54) (55) (56) (58) (70) (71) (73)
	(76) (77) (83) (86) (93) (94) (99)
<b><i>Clavispora</i></b>	
<i>C. lusitaniae</i>	(8) (33) (54) (84)
<b><i>Cryptococcus</i></b>	
<i>C. ater</i>	(30)
<i>C. difluens</i>	(8) (17) (36) (49) (53) (58) (79) (92)
<i>C. hungaricus</i>	(49)
<i>C. laurentii</i>	(6) (12) (30) (36) (49) (65) (71) (75) (76) (79) (82)
<i>C. uniguttulatum</i>	(30)

**Tabla 5.26(c).**- Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no *Saccharomyces*.

Lev. no <i>Saccharomyces</i>	Referencia(s)
<b><i>Debaryomyces</i></b>	
<i>D. carsonii</i>	(8)
<i>D. etchellsii</i>	(8)
<i>D. hansenii</i>	(5) (8) (16) (21) (26) (29) (49) (58) (60) (71)
(79) (83) (94)	
<i>D. vanriijiae</i>	(72)
<b><i>Filobasidium</i></b>	
<i>F. capsuligenum</i>	(30)
<b><i>Galactomyces</i></b>	
<i>G. geotrichum</i>	(3) (25)
<b><i>Hanseniaspora</i></b>	
<i>H. guilliermondii</i>	(7) (8) (20) (47) (48) (54) (55) (60) (73) (76)
(88) (96)	
<i>H. occidentalis</i>	(8) (51) (83) (93)
<i>H. osmophila</i>	(1) (48) (52) (90)
<i>H. uvarum</i>	(2) (3) (6) (11) (12) (13) (15) (17) (18) (23)
(24) (26) (27) (28) (29) (30) (33) (36) (37) (38) (40) (45) (46) (47) (48) (49)	
(51) (54) (55) (58) (60) (64) (70) (71) (72) (73) (75) (76) (83) (85) (89) (90)	
(92) (93) (96) (97) (99)	
<i>H. vineae</i>	(60) (73) (90) (93)

**Tabla 5.26(d).**- Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no *Saccharomyces*.

Lev. no <i>Saccharomyces</i>	Referencia(s)
<b><i>Issatchenkia</i></b>	
<i>I. occidentalis</i>	(3) (30) (51) (54) (55) (79) (85) (87) (88)
<i>I. orientalis</i>	(3) (38) (42) (44) (46) (48) (51) (54) (55) (58) (60) (72) (73) (76) (78) (83) (85) (93) (99)
<i>I. terricola</i>	(5) (6) (7) (9) (12) (26) (38) (46) (51) (54) (55) (60) (71) (75) (76) (78) (83) (85) (99)
<b><i>Kloeckera</i></b>	
<i>K. apiculata</i>	(2) (5) (7) (8) (9) (10) (14) (16) (17) (18) (19) (20) (31) (42) (44) (48) (52) (67) (68) (78) (79)
<i>K. japonica</i>	(5) (67) (90)
<b><i>Kluyveromyces</i></b>	
<i>K. marxianus</i>	(8) (10)
<i>K. thermotolerans</i>	(5) (7) (16) (21) (27) (28) (34) (42) (44) (46) (48) (51) (72) (73) (86) (87) (88)
<b><i>Lodderomyces</i></b>	
<i>L. elongisporus</i>	(1) (58)
<b><i>Metschnikowia</i></b>	
<i>M. chrysoperlae</i>	(43) (71) (83)
<i>M. pulcherrima</i>	(3) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (12) (17) (18) (19) (20) (21) (23) (26) (27) (28) (30) (31) (37) (38) (42) (43) (44) (45) (46) (48) (49) (51) (52) (54) (55) (58) (64) (67) (68) (71) (72) (73) (76) (78) (79) (80) (83) (86) (87) (88) (93)
<i>M. reukaufii</i>	(49) (68)
<i>M. zobellii</i>	(33)
<b><i>Naumovozyma</i></b>	
<i>N. castellii</i>	(98)

**Tabla 5.26(e).**- Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no *Saccharomyces*.

Lev. no <i>Saccharomyces</i>	Referencia(s)
<b><i>Pichia</i></b>	
<i>P. anomala</i>	(8) (9) (10) (11) (17) (19) (21) (22) (33) (48) (54) (55) (58) (64) (66) (68) (71) (72) (73) (78) (79) (83) (87) (88) (90)
<i>P. besseyi</i>	(1)
<i>P. canadensis</i>	(8)
<i>P. farinosa</i>	(8)
<i>P. fermentans</i>	(33) (38) (41) (52) (54) (55) (58) (71) (72) (75) (76) (90)
<i>P. fluxuum</i>	(90)
<i>P. galeiformis</i>	(75)
<i>P. jadinii</i>	(8)
<i>P. kluyveri</i>	(6) (12) (28) (29) (30) (37) (49) (51)(64) (71) (72) (78) (83) (90) (93)
<i>P. membranifaciens</i>	(1) (3) (8) (9) (10) (14) (21) (26) (29) (32) (42) (48) (49) (52) (58) (60) (68) (71) (79) (90) (97)
<i>P. silvicola</i>	(8)
<i>P. toletana</i>	(87) (88)
<b><i>Rhodotorula</i></b>	
<i>R. glutinis</i>	(1) (6) (10) (12) (36) (49) (68) (71) (75) (79)
<i>R. minuta</i>	(1) (48)
<i>R. mucilaginoso</i>	(8) (16) (26) (30) (33) (58) (78) (97)
<i>R. nothofagi</i>	(92)

**Tabla 5.26(f).**- Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas no *Saccharomyces*.

Lev. no <i>Saccharomyces</i>	Referencia(s)
<b><i>Saccharomycodes</i></b>	
<i>S. ludwigii</i>	(51) (90)
<b><i>Saccharomyopsis</i></b>	
<i>S. crataegensis</i>	(3) (6) (12) (36)
<i>S. fibuligera</i>	(16)
<i>S. schoenii</i>	(58)
<i>S. vini</i>	(3)
<b><i>Schizosaccharomyces</i></b>	
<i>S. pombe</i>	(48) (72)
<b><i>Sporidiobolus</i></b>	
<i>S. pararoseus</i>	(76) (82) (85)
<b><i>Sporobolomyces</i></b>	
<i>S. roseus</i>	(6) (8) (12) (36) (49) (82)
<b><i>Torulaspora</i></b>	
<i>T. delbrueckii</i>	(4) (16) (17) (19) (20) (23) (27) (29) (32) (34) (37) (48) (51) (58) (72) (73) (75) (78) (79) (83) (86) (87) (88)
<i>T. globosa</i>	(8) (52)
<b><i>Williopsis</i></b>	
<i>W. saturnus</i>	(19)
<b><i>Yarrowia</i></b>	
<i>Y. lipolytica</i>	(69)
<b><i>Zygosaccharomyces</i></b>	
<i>Z. bailii</i>	(10) (19) (27) (48) (51)(52) (54) (55) (70) (73) (74) (75) (76) (78) (79) (83) (90) (93)
<i>Z. bisporus</i>	(19) (90)
<i>Z. fermentati</i>	(14) (48) (76) (90)
<i>Z. florentinus</i>	(8) (16) (90)
<i>Z. rouxii</i>	(5) (42) (53) (90)
<b><i>Zygoascus</i></b>	
<i>Z. hellenicus</i>	(3) (6) (9) (12) (58) (78) (97)

(1) Parish y Carroll, 1985 (2) Heard y Fleet, 1986 (3) Guerzoni y Marchetti, 1987 (4) Cabrera *et al.*, 1988 (5) Mora *et al.*, 1988 (6) Holloway *et al.*, 1990 (7) Mora *et al.*, 1990 (8) Longo *et al.*, 1991 (9) Mora y Mulet, 1991 (10) Angulo *et al.*, 1993 (11) Fleet y Heard, 1993 (12) Chamberlain *et al.*, 1997 (13) Constantí *et al.*, 1997 (14) Romano *et al.*, 1997 (15) Constantí *et al.*, 1998 (16) Fernández *et al.*, 1999 (17) McMahon *et al.*, 1999 (18) Pretorius *et al.*, 1999 (19) Cocolin *et al.*, 2000 (20) Dizy y Bisson, 2000 (21) Fernández *et al.*, 2000 (22) Masih *et al.*, 2000 (23) Pramateftaki *et al.*, 2000 (24) Ciani y Fatichenti, 2001 (25) Naumova *et al.*, 2001 (26) Povhe-Jemec *et al.*, 2001 (27) Torija *et al.*, 2001 (28) Mills *et al.*, 2002 (29) Raspor *et al.*, 2002 (30) Sabate *et al.*, 2002 (31) Zohre y Erten, 2002 (32) Antunovics *et al.*, 2003 (33) Mingorance-Cazorla *et al.*, 2003 (34) Nissen y Arneborg, 2003 (35) Sipiczki, 2003 (36) Subden *et al.*, 2003 (37) van Keulen *et al.*, 2003 (38) Clemente-Jimenez *et al.*, 2004 (39) Sipiczki, 2004 (40) Carrau *et al.*, 2005 (41) Clemente-Jimenez *et al.*, 2005 (42) Combina *et al.*, 2005 (43) Molnár y Prillinger, 2005 (44) Nurgel *et al.*, 2005 (45) Povhe-Jemec y Raspor, 2005 (46) Blevé *et al.*, 2006 (47) Pérez-Nevado *et al.*, 2006 (48) Querol y Fleet, 2006 (49) Raspor *et al.*, 2006 (50) Serra *et al.*, 2006 (51) Di Maro *et al.*, 2007 (52) Domizio *et al.*, 2007 (53) Magyar *et al.*, 2007 (54) Nisiotou *et al.*, 2007 (55) Nisiotou y Nichas, 2007 (56) Csoma y Sipiczki, 2008 (57) Dimakopoulou *et al.*, 2008 (58) Zott *et al.*, 2008 (59) Benito *et al.*, 2009 (60) Chavan *et al.*, 2009 (61) Chi *et al.*, 2009 (62) Jensen *et al.*, 2009 (63) Loncaric *et al.*, 2009 (64) Lopes *et al.*, 2009 (65) Meng y Tian, 2009 (66) Swangkeaw *et al.*, 2009 (67) Türkel y Ener, 2009 (68) Tutulescu y Popa, 2009 (69) Yalcin *et al.*, 2009 (70) Andorrá *et al.*, 2010 (71) Brezna *et al.*, 2010 (72) Ciani *et al.*, 2010 (73) Clavijo *et al.*, 2010 (74) Cortés *et al.*, 2010 (75) Francesca *et al.*, 2010 (76) Li *et al.*, 2010 (77) N'Guessan *et al.*, 2010 (78) Ocón *et al.*, 2010a (79) Ocón *et al.*, 2010b (80) Parapouli *et al.*, 2010 (81) Sáez *et al.*, 2010 (82) Verginer *et al.*, 2010 (83) Zhang *et al.*, 2010a (84) Zhang *et al.*, 2010b (85) Baffi *et al.*, 2011 (86) Comitini *et al.*, 2011 (87) Cordero-Bueso *et al.*, 2011a (88) Cordero-Bueso *et al.*, 2011b (89) Diguta *et al.*, 2011 (90) Domizio *et al.*, 2011 (91) Grube *et al.*, 2011 (92) Hall *et al.*, 2011 (93) Li *et al.*, 2011 (94) Magyar y Tóth, 2011 (95) Merín *et al.*, 2011 (96) Moreira *et al.*, 2011 (97) Saez *et al.*, 2011 (98) Sicard y Legras, 2011 (99) Tofalo *et al.*, 2011

**Tabla 5.27.-** Revisión bibliográfica de las especies halladas en los ensayos de tipificación de levaduras vínicas *Saccharomyces*.

Lev. <i>Saccharomyces</i>	Referencia(s)
<b><i>Saccharomyces</i></b>	
<i>S. bayanus</i>	(1) (2) (4) (5) (7) (13) (18) (19) (28) (31) (35) (36) (47) (49) (53) (54) (58) (63) (64) (71) (72) (73) (81) (91) (92) (95)
<i>S. cariocanus</i>	(73) (95)
<i>S. cerevisiae</i>	(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (48) (49) (50) (51) (52) (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62) (63) (64) (65) (66) (67) (68) (69) (70) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94) (95)
<i>S. exiguus</i>	(43) (92)
<i>S. kluyveri</i>	(9) (22)
<i>S. kudriavzevii</i>	(58) (73) (95)
<i>S. mikatae</i>	(73) (95)
<i>S. paradoxus</i>	(13) (73) (95)
<i>S. pastorianus</i>	(73) (89) (95)

(1) Fatichenti *et al.*, 1983 (2) Strehaiano y Goma, 1983 (3) Parish y Carroll, 1985 (4) Ribéreau-Gayon, 1985 (5) Guerzoni y Marchetti, 1987 (6) Cabrera *et al.*, 1988 (7) Mora *et al.*, 1988 (8) Mora *et al.*, 1990 (9) Longo *et al.*, 1991 (10) Mora y Mulet, 1991 (11) Vezinhet *et al.*, 1992 (12) Angulo *et al.*, 1993 (13) Masneuf *et al.*, 1996 (14) Constantí *et al.*, 1997 (15) Romano *et al.*, 1997 (16) Constantí *et al.*, 1998 (17) McMahon *et al.*, 1999 (18) Pretorius *et al.*, 1999 (19) Cocolin *et al.*, 2000 (20) Dizy y Bisson, 2000 (21) Fernández *et al.*, 2000 (22) Pramateftaki *et al.*, 2000 (23) Ciani y Fatichenti, 2001 (24) Pérez *et al.*, 2001 (25) Povhe-Jemec *et al.*, 2001 (26) Torija *et al.*, 2001 (27) Mills *et al.*, 2002 (28) Raspor *et al.*, 2002 (29) Sabate *et al.*, 2002 (30) Zohre y Erten, 2002 (31) Antunovics *et al.*, 2003 (32) Mingorance-Cazorla *et al.*, 2003 (33) Nissen y Arneborg, 2003 (34) Nissen *et al.*, 2003 (35) Sipiczki, 2003 (36) van Keulen *et al.*, 2003 (37) Ciani *et al.*, 2004 (38) Clemente-Jimenez *et al.*, 2004 (39) Howell *et al.*, 2004 (40) Carrau *et al.*, 2005 (41) Clemente-Jimenez *et al.*, 2005 (42) Combina *et al.*, 2005 (43) Nurgel *et al.*, 2005 (44) Povhe-Jemec y Raspor, 2005 (45) Pérez-Nevado *et al.*, 2006 (46) Di Maro *et al.*, 2007 (47) Domizio *et al.*, 2007 (48) Lopes *et al.*, 2007 (49) Magyar *et al.*, 2007 (50) Nisiotou *et al.*, 2007 (51) Swiegers y Pretorius, 2007 (52) Zott *et al.*, 2008 (53) Barbosa *et al.*, 2009 (54) Benito *et al.*, 2009 (55) Callejon *et al.*, 2009 (56) Chavan *et al.*, 2009 (57) Chaves-López *et al.*, 2009 (58) Gangl *et al.*, 2009 (59) Jensen *et al.*, 2009 (60) Mauriello *et al.*, 2009 (61) Meca *et al.*, 2010 (62) Rodríguez *et al.*, 2009 (63) Son *et al.*, 2009 (64) Tosi *et al.*,

2009 **(65)** Tutulescu y Popa, 2009 **(66)** Albergaria *et al.*, 2010 **(67)** Andorrà *et al.*, 2010 **(68)** Carrau *et al.*, 2010 **(69)** Ciani *et al.*, 2010 **(70)** Clavijo *et al.*, 2010 **(71)** Cortés *et al.*, 2010 **(72)** Csoma *et al.*, 2010 **(73)** de Melo *et al.*, 2010 **(74)** Francesca *et al.*, 2010 **(75)** Goddard *et al.*, 2010 **(76)** N'Guessan *et al.*, 2010 **(77)** Ocón *et al.*, 2010a **(78)** Parapouli *et al.*, 2010 **(79)** Sáez *et al.*, 2010 **(80)** Sumbly *et al.*, 2010 **(81)** Zhang *et al.*, 2010a **(82)** Baffi *et al.*, 2011 **(83)** Blanco *et al.*, 2011 **(84)** Ciani y Comitini, 2011 **(85)** Comitini *et al.*, 2011 **(86)** Cordero-Bueso *et al.*, 2011a **(87)** Cordero-Bueso *et al.*, 2011b **(88)** Domizio *et al.*, 2011 **(89)** Hall *et al.*, 2011 **(90)** Li *et al.*, 2011 **(91)** Magyar y Tóth, 2011 **(92)** Matei *et al.*, 2011 **(93)** Moreira *et al.*, 2011 **(94)** Sáez *et al.*, 2011 **(95)** Sicard y Legras, 2011



**ESTUDIO 3.- INFLUENCIA SOBRE LA CALIDAD  
ORGANOLÉPTICA**



## 6. ESTUDIO 3. INFLUENCIA SOBRE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA

### 6.1. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Los residuos de plaguicidas en la uva pueden provocar efectos indeseables que alteran la calidad del vino. Dichos efectos pueden ser directos, a consecuencia de su naturaleza química, introduciendo en el mosto y vino malos sabores y olores, o indirectos alterando el perfil aromático, la fracción ácida e incluso el color de los vinos (Aubert *et al.*, 1997; San Nicolás *et al.*, 2002).

El contenido fenólico del vino está formado por un grupo complejo de compuestos procedentes de la materia colorante de la uva, siendo responsables del color, la astringencia y la estructura de los vinos. Los factores que influyen sobre el mayor o menor contenido fenólico de los vinos son: factores climáticos y edáficos (composición del suelo, fertilidad y disponibilidad de agua en el suelo, temperatura, precipitaciones), factores genéticos, factores de cultivo (poda, abonado, irrigación, condiciones de insolación, presencia de residuos de pesticidas, etc.) (Fernández-López *et al.*, 1992; Oliva *et al.*, 1999c; Fernández *et al.*, 2001a; Tregogat *et al.*, 2002; Gil y Yuste, 2004; Oliva *et al.*, 2005) y factores enológicos (tiempo y temperatura de vinificación, presencia de SO<sub>2</sub>, pH, fenómenos de copigmentación, microoxigenación, etc) (Gao *et al.*, 1997; Gómez-Plaza *et al.*, 2000).

De entre los factores citados anteriormente, el menos estudiado es el efecto que los residuos de pesticidas presentes en la uva y/o el vino pueden tener sobre la composición fenólica. Además hay que tener en cuenta que, actualmente, el control de plagas y enfermedades en la vid se basa en la aplicación de diversos plaguicidas a lo largo de todo el ciclo vegetativo de la vid.

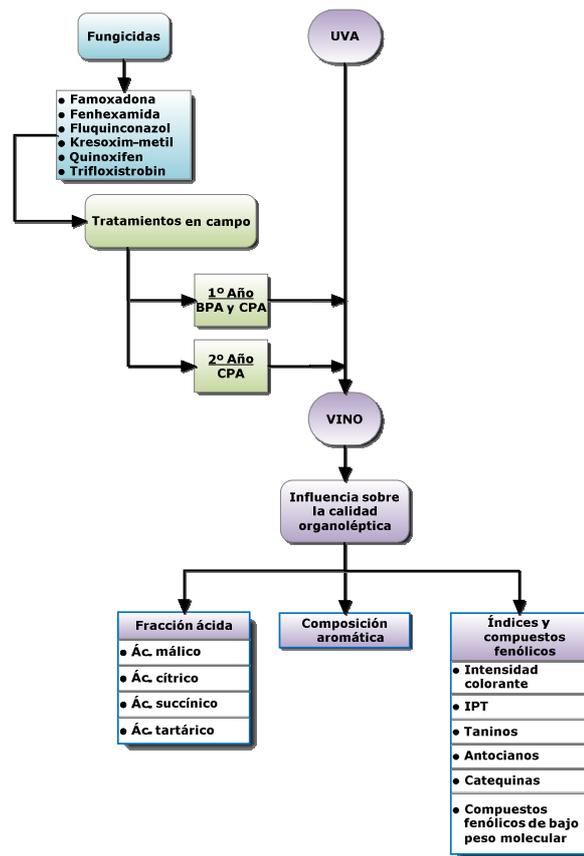
Con el fin de cuantificar el efecto que los fungicidas empleados pueden tener sobre la calidad organoléptica del vino, se realizó sobre éste un estudio analítico de la fracción ácida y de diversos índices y niveles de compuestos fenólicos (intensidad colorante, índice de polifenoles totales (IPT), taninos, antocianos totales, catequinas y compuestos fenólicos de bajo peso molecular

durante el primer año; así como compuestos fenólicos de bajo peso molecular y antocianos totales el segundo año), que nos permitirá cuantificar el potencial fenólico del mismo.

Por último se llevó a cabo un estudio de la fracción aromática del vino, tanto de componentes mayoritarios como minoritarios. Los vinos obtenidos se analizaron mediante extracción con material adsorbente y cromatografía de gases-espectrometría de masas (SBSE-GC-MS).

Los compuestos volátiles identificados en el vino fueron agrupados, siendo asociado cada grupo de compuestos a una serie de descriptores sensoriales (graso, floral, frutal, herbáceo, disolvente, aroma a rosa y vinoso).

El planteamiento de estudio se representa esquematizado en la Figura 6.1.



**Figura 6.1.-** Planteamiento del estudio de la influencia de los fungicidas sobre la calidad organoléptica de los vinos.

## 6.2. ESTÁNDARES Y PRODUCTOS QUÍMICOS

En el estudio de la influencia de los fungicidas sobre el contenido en compuestos fenólicos del vino, los reactivos utilizados fueron: ácido fórmico con pureza 98%, de Merck (Darmstadt, Alemania); etanol absoluto, de Panreac (Barcelona, España); ácido clorhídrico puro, de Merck (Darmstadt, Alemania); agua milli Q procedente de un sistema Millipore de Purificación Pack QPAK-2 (Billerica, USA); metanol de calidad cromatografía líquida, de Merck (Darmstadt, Alemania); bisulfito sódico puro, de Merck (Darmstadt, Alemania); metil celulosa pura, de Sigma-Aldrich (Madrid, España); sulfato de amonio puro, de Sigma-Aldrich (Madrid, España); ácido tánico, de Sigma-Aldrich (Madrid, España); reactivo de Folin Ciocalteu, de Merck (Darmstadt, Alemania); carbonato sódico, de Sigma-Aldrich (Madrid, España); vainillina pura, de Merck (Darmstadt, Alemania). El patrón utilizado para la cuantificación de los derivados del ácido hidroxicinámico fue ácido clorogénico, de Sigma-Aldrich (Madrid, España); para los flavonoles se utilizó rutina, de Merck (Darmstadt, Alemania); para los estilbenos se utilizó trans-resveratrol, de Sigma-Aldrich (Madrid, España). Todos los patrones utilizados tenían una pureza superior al 99%.

En el estudio de la composición aromática se utilizaron como estándares: benzaldehído; dietil-succinato; acetato de etilo; butanoato de etilo; 9-etil-dodecanoato; hexanoato de etilo; nonanoato de etilo; octanoato de etilo;  $\gamma$ -hexalactona; 1-hexanol; ácido hexanoico; acetato de hexilo; 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico); acetato de 3-metil-1-butanol (acetato isoamílico); nerolidol; ácido octanoico; 2-feniletanol y acetato de 2-feniletanol, todos ellos proporcionados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). También se utilizó como estándar  $\beta$ -damascenona obtenida de Firmenich (Barcelona, España). Los estándares tienen todos una pureza superior al 95%.

Los disolventes empleados fueron: etanol de calidad reactivo analítico, de Merck (Darmstadt, Alemania) y agua milli-Q procedente de un sistema Millipore de Purificación Pack QPAK-2 (Billerica, USA). Las muestras de vino sintético, para calibrar el método analítico, se obtuvieron a partir de una solución hidroalcohólica al 12% (v/v) a la que se añadieron 5 g/L de ácido tartárico, de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El pH se ajustó a 3,6 mediante hidróxido sódico 1M, de Panreac (Barcelona, España).

En el estudio de la influencia de los fungicidas sobre la fracción ácida de los vinos, los reactivos utilizados fueron: ácido fórmico con pureza del 98%, de Merck (Darmstadt, Alemania); ácido sulfúrico con pureza del 96%, de Panreac (Barcelona, España). Los estándares de los ácidos: ácido málico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido tartárico, con una pureza superior al 99% en todos los casos, fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Madrid, España).

La filtración de las muestras se llevó a cabo mediante filtros de membrana de nylon de 0,45 micras de tamaño de poro, de Millipore (Billerica, USA).

### 6.3. METODOLOGÍA ANALÍTICA

#### 6.3.1. Determinación de compuestos fenólicos

##### 6.3.1.1. Intensidad del color

La intensidad del color se estudió siguiendo la metodología del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 1993). De esta forma, la intensidad viene dada por la suma de las absorbancias en cubetas de 1 cm de trayecto óptico para las radiaciones de longitudes de onda iguales a 420, 520 y 620 nm. El trayecto óptico de la cubeta de medida debe elegirse de forma que la absorbancia (A) esté comprendida entre 0,3 y 0,7.

Las medidas espectrofotométricas se efectuarán utilizando como líquido de referencia agua destilada en una cubeta del mismo trayecto óptico, para regular el cero de la escala de absorbancias a las longitudes de onda 420, 520 y 620 nm.

La intensidad, por tanto, vendrá dada por la ecuación:

$$I = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

Como paso previo a la toma de las medidas se tendrá en cuenta que:

- Si el vino está turbio, debe clarificarse por centrifugación o por filtración a través de membrana.
- En los vinos jóvenes o espumosos debe eliminarse la mayor cantidad posible de dióxido de carbono mediante agitación a vacío.

Las muestras de vino se centrifugan a 4500 rpm durante 10 minutos en una centrifuga Sepatech (Heareus).

Sobre el líquido sobrenadante se procede a la lectura de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm con cubetas de 1 cm en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz Hitachi, modelo U-2000, con un intervalo espectral de 190-900 nm.

El análisis se realiza por triplicado, dándose la media como valor real.

#### 6.3.1.2. Índice de polifenoles totales (IPT)

El índice de polifenoles totales también llamado índice de materias tanoides, es el parámetro que nos permite determinar el contenido total de sustancias polifenólicas existentes en un vino. El método se basa en la medida de la absorbancia de una muestra a una longitud de onda de 280 nm, la cual corresponde al máximo de absorción para los compuestos que contienen anillos bencénicos (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1980).

Se toma 1 mL de la muestra (previamente centrifugada durante 5 minutos a 2500 rpm), se coloca en un matraz aforado de 100 mL y se enrasa con agua destilada. Pasados 20 minutos se lee la absorbancia de la muestra en una cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor a 280 nm en un espectrofotómetro UV-visible de doble haz Hitachi, modelo U-2000.

El valor del índice de polifenoles totales se obtiene multiplicando por 100 el valor de la absorbancia obtenida en el espectrofotómetro.

#### 6.3.1.3. Antocianos totales

El método de análisis de los antocianos por decoloración con bisulfito está basado en la propiedad que tienen las moléculas de los compuestos antociánicos de formar con el ión bisulfito las llamadas combinaciones bisulfíticas. En estas combinaciones las moléculas formadas pierden la aromaticidad y pasan a una forma incolora, es decir, pasan de la forma iónica coloreada a una forma no iónica no coloreada (Ribéreau-Gayon, 1982).

En un tubo de ensayo de 30 mL se añaden 1 mL de vino a analizar (previamente centrifugada la muestra durante 5 minutos a 2500 rpm) y 20 mL de una disolución de ácido clorhídrico en etanol al 0,1%, agitando energicamente el tubo de ensayo.

De la disolución anterior se recogen 20 mL, que se transferirán a dos tubos de ensayo (10 mL a cada tubo). A uno de los tubos de ensayo se le añaden 4 mL

de agua destilada y al otro 4 mL de una disolución de bisulfito sódico al 15%. Se agita y se espera durante 20 minutos.

Posteriormente se mide la absorbancia en una cubeta de 1 cm de espesor a 520 nm de longitud de onda mediante espectrofotómetro UV-visible de doble haz Hitachi, modelo U-2000. El ajuste del cero se hace con agua destilada.

La diferencia de absorbancia obtenida se lleva a la siguiente recta de calibrado, expresando el resultado en mg/L de antocianos.

$$y = 864,30x + 1,12 \quad r = 0,9996$$

#### 6.3.1.4. Taninos

La determinación espectrofotométrica de los taninos en el vino se lleva a cabo siguiendo la metodología de Montedoro y Fantozzi (1974), que implica la precipitación previa de todos los compuestos fenólicos no tánicos con metil celulosa y posterior eliminación por filtración mediante papel de filtro.

En un matraz aforado de 10 mL se añaden 2 mL de la muestra de vino a valorar, añadiendo 1 mL de una disolución de metil celulosa al 0,4%. Se agita y se añaden 2 mL de una disolución saturada de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , se enrasa y se mantiene 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se filtra la disolución.

Con el filtrado se realiza el ensayo de Folin (medir la absorbancia a 700 nm) en cubetas de 1 cm.

Para ello 1 mL de vino diluido 1/5 se introduce en un matraz aforado de 100 mL, se le añaden 5 mL del reactivo Folin Ciocalteau y 10 mL de disolución de carbonato sódico al 20%. Finalmente se afora hasta 100 mL con agua destilada.

Se deja en reposo durante 30 minutos y pasado ese tiempo se mide la densidad óptica a 700 nm.

La recta de calibrado se construyó tomando 1 mL de los patrones preparados entre 10 - 1000 ppm de ácido tánico, dando como resultado la siguiente recta:

$$y = 287,80x + 13,16 \quad r = 0,992$$

dónde  $y$  es la concentración de ácido tánico medida de ppm y  $x$  es la absorbancia medida en cubetas de 1 cm a 700 nm.

#### 6.3.1.5. Catequinas

Los flavonoides que contengan una mitad de floroglucina reactiva pueden reaccionar con la vainillina u otros aldehídos similares, dando un compuesto coloreado que se puede determinar cuantitativamente por colorimetría.

Los flavonoides y flavonas no reaccionan. Los principales reactantes son los flavon-3-oles y los flavon-3,4-dioles. Los taninos condensados también reaccionan, pero en un menor grado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1980).

En tres matraces aforados de 10 mL se disponen respectivamente:

- A: 0,3 mL de extracto analítico, 2mL de reactivo vainillina (solución de vainillina al 1% en HCl al 70% (v/v)) y se enrasa a 10 mL con HCl al 70% (v/v).
- B: la misma cantidad de extracto analítico y se enrasa a 10 mL con HCl al 70% (v/v).
- C: 2 mL de reactivo vainillina (solución de vainillina al 1% en HCl al 70% (v/v)) y se enrasa a 10 mL con HCl al 70% (v/v).

Transcurridos 25 minutos se leen las absorbancias de los matraces A y B a 500 nm, utilizando el matraz C para ajustar a cero el espectrofotómetro (espectrofotómetro UV-visible de doble haz Hitachi, modelo U-2000).

Con los datos de absorbancia se obtiene la siguiente curva patrón:

$$y = 2229,9x \quad r = 0,999$$

dónde y es la cantidad de D-catequinas medida en mg/L y x es la absorbancia a 500 nm.

#### 6.3.1.6. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular

El análisis de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular se ha realizado mediante la inyección directa de 20 µL de muestra en un equipo HPLC (Merck-Hitachi) equipado con una bomba L-7100, un detector DAD y empleando una columna de fase reversa Lichrochart 100 RP-18 (25 x 0,4 cm, con un tamaño de partícula de 5 µm), y utilizando como fase móvil ácido fórmico al 5% (v/v) en agua milli Q (solvente A) y metanol (solvente B).

Los diferentes compuestos se han caracterizado por comparación cromatográfica con patrones comerciales y por su espectro visible registrado con el detector de fotodiodos.

Los derivados del ácido hidroxicinámico se cuantifican a 320 nm como ácido clorogénico, los flavonoles a 360 nm como rutina y los estilbenos a 320 nm como trans-resveratrol.

### **6.3.2. Determinación de compuestos aromáticos mediante SBSE-GC-MS**

#### *6.3.2.1. Preparación y Extracción*

Se analizaron muestras de 10 mL de vino a las que previamente se añadieron 100  $\mu$ L de una solución de  $\gamma$ -hexalactona en etanol absoluto (1  $\mu$ L/mL) como estándar interno. Los diferentes compuestos se extrajeron introduciendo en las muestras de vino una barra adsorbente Twister recubierta de polidimetilsiloxano (0,5 mm de grosor de film, 10 mm de longitud), de Gerstel GmbH (Mülheim y der Ruhr, Alemania). Las muestras se agitaron a 700 rpm y temperatura ambiente durante 60 minutos. Una vez concluido el paso de agitación, cada barra adsorbente se enjuagó con agua destilada y se secó mediante un tejido de celulosa para, posteriormente, ser transferida a un tubo de desorción térmica para el análisis mediante CG-MS.

#### *6.3.2.2. Análisis*

En el tubo de desorción térmica los compuestos volátiles fueron extraídos de la barra de adsorción en las siguientes condiciones: temperatura de horno, 310°C; tiempo de desorción, 4 minutos; temperatura de la trampa fría, -30°C y flujo de entrada de helio, 45 mL / min. Finalizada la extracción, los diferentes compuestos fueron transferidos a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 acoplado a un detector de masas Hewlett-Packard LC 3D (Palo Alto, EE.UU.), con una columna capilar de sílice fundida (50 m de longitud de fase estacionaria BP21, 0,22 mm de d.i. y 0,25  $\mu$ m de grosos de film), de SGE (Ringwood, Australia).

El programa cromatográfico se fijó a 40°C (mantenidos durante 2 minutos), aumentando hasta 230°C a un ritmo de 12°C/min y mantenimiento de esta temperatura durante 20 minutos. La energía de ionización del MS fue de 70 eV, con un rango de masas de 35 a 500 m/z y una temperatura de detector de 150°C. La identificación se llevó a cabo utilizando la biblioteca NIST y la cuantificación se realizó utilizando las curvas de calibración de los estándares en vino sintético (Tabla 6.1. y 6.2.).

#### 6.3.2.3. Validación Analítica

En la evaluación de la linealidad, las curvas de calibrado se establecieron con cinco soluciones estándar en vino sintético (Tabla 6.1. y 6.2.). Cada nivel de concentración se analizó por duplicado con dos barras de adsorción diferentes.

Los límites de detección y cuantificación fueron calculados con los datos generados en los estudios de linealidad.

El límite de detección se definió como  $(a + 3Sa/b)$  y el límite de cuantificación como  $(a + 10Sa/b)$ , siendo "a" la ordenada en el origen, "Sa" la varianza de la ordenada en el origen y "b" la pendiente.

También, se determinó la precisión del detector (repetibilidad y reproducibilidad). Para ello, se pincharon 5 muestras de patrón el mismo día (repetibilidad) y 5 muestras en diferentes días (reproducibilidad).

Los valores se muestran en las Tablas 6.1. y 6.2. como %RSD.

**Tabla 6.1.-** Datos de los estándares y linealidad de su cuantificación.

Estándares	Tr (min)	m/z	RL (µg/L)	R <sup>2</sup>	LD (mg/L)	LC (mg/L)	Rep (%RSD)	Repd (%RSD)	UO (mg/L)
Etil acetato	4,7	43	100-4000	0,90	0,31	0,43	11,69	18,52	12,27
Etil butanoato	6,47	88	1-50	0,93	0,01	0,02	3,92	6,79	0,02
Acetato isoamílico	7,63	43	100-2000	0,97	1,34	1,79	7,84	13,59	0,03
Alcohol isoamílico	8,9	55	50-400	0,90	0,30	0,41	10,50	17,56	100
Etil hexanoato	9,1	88	0,05-500	0,97	0,07*	0,16*	9,52	17,52	0,014*
Hexil acetato	9,75	43	1-100	0,99	0*	0,01*	2,75	3,47	2
1-hexanol	10,84	56	10-400	0,98	0,12	0,20	7,08	12,26	1,10
Etil octanoato	11,94	88	1000-5000	0,94	2,01	3,94	5,83	7,50	0,58
Etil nonanoato	13,16	88	1-10	0,94	2,03*	4,11*	5,83	7	0,85*

Tr (tiempo de retención); m/z a la cual se integran los compuestos; RL (rango lineal); R<sup>2</sup> (coeficiente de determinación); LD (límite de detección); LC (límite de cuantificación); Rep (Repetibilidad); Repd (Reproducibilidad); UO (umbral olfatorio); \*unidades expresadas en µg/L

Tabla 6.2.- Datos de los estándares y linealidad de su cuantificación.

Estándares	Tr (min)	m/z	RL (µg/L)	R <sup>2</sup>	LD (mg/L)	LC (mg/L)	Rep (%RSD)	Repd (%RSD)	UO (mg/L)
Benzaldehido	13,41	105	10-100	0,97	0,04	0,05	1	2	3
Etil-9-dodecanoato	14,83	101	10-100	0,94	0,08*	0,15*	1,26	2,18	2*
Diethyl succinato	14,97	88	0,05-0,5	0,97	0,09	0,17	1,26	2,18	200
2-feniletanol acetato	16,53	104	50-500	0,93	0,34	0,39	2,08	3,59	1,80
Damascenona	16,57	69	1-50	0,97	0,01*	0,01*	2,43	4,58	0,05*
2-feniletanol	17,5	91	10-1000	0,97	0,30	0,97	7,58	13,10	10
Ácido hexanoico	18,59	60	10-400	0,92	0,22	0,29	1,08	1,87	0,42
Ácido octanoico	19,5	60	10-500	0,95	0,28	0,38	4,16	7,20	0,51
Nerolidol	21,89	69	0,05-500	0,99	0,01*	0,02*	2,34	4,05	0,015*

Tr (tiempo de retención); m/z a la cual se integran los compuestos; RL (rango lineal); R<sup>2</sup> (coeficiente de determinación); LD (límite de detección); LC (límite de cuantificación); Rep (Repetibilidad); Repd (Reproducibilidad); UO (umbral olfatorio); \*unidades expresadas en µg/L

### **6.3.3. Determinación de ácidos orgánicos**

#### *6.3.3.1. Preparación y Extracción*

La preparación de la muestra se realizó adicionando 0,2 mL de ácido fórmico de 21,76 g/L de concentración (patrón interno) a 5 mL de vino. Tras una agitación suave se filtra la muestra a través de filtros de membrana de nylon de 0,45 micras de tamaño de poro. El filtrado obtenido es inyectado directamente en un cromatógrafo líquido modelo 1100 de Agilent Technologies (Waldronn, Alemania) con detector de diode array (DAD).

#### *6.3.3.2. Análisis*

La separación y cuantificación de los ácidos se realizó inyectando 20  $\mu$ L del filtrado, utilizando una columna Waters modelo Ion-300 de exclusión iónica y relleno polimérico de 300 mm de longitud y 7,8 mm de diámetro interno, junto a una precolumna Waters modelo GC-801. El análisis se llevó a cabo a una temperatura constante de 25°C, utilizando como fase móvil ácido sulfúrico 0,01 N a un flujo de 0,34 mL / min, fijando la longitud de onda en 210 nm.

### **6.3.4. Análisis estadístico**

Los datos fueron sometidos a tratamiento estadístico, aplicando en primer lugar una prueba de homogeneidad de varianzas (test de Levene) indicativa del tipo de análisis a utilizar (paramétrico o no paramétrico). El análisis no paramétrico se llevó a cabo mediante el test de Mann-Whitney-Wilcoxon. Para el resto se realizó un análisis paramétrico de la varianza (ANOVA de un factor) mediante la aplicación del test de la diferencia menor significativa (DMS). El tratamiento se ha realizado utilizando la aplicación informática SPSS 15.0 para Windows.

## 6.4. RESULTADOS

### 6.4.1. Influencia de los fungicidas sobre el contenido en compuestos fenólicos

Las Tablas 6.3. y 6.4. muestran los resultados del estudio estadístico llevado a cabo con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas en intensidad colorante (IC), índice de polifenoles totales (IPT), contenido en antocianos totales, contenido en taninos y contenido en catequinas, entre el vino control y los vinos procedentes de los tratamientos con fungicidas (tanto en BPA como en CPA), ya que el primer año de ensayos se realizaron dos tipos de tratamientos: uno en condiciones críticas y otro en condiciones de Buenas Prácticas Agrícolas.

El análisis de los resultados muestra que los vinos procedentes de uvas tratadas con famoxadona, fenhexamida, fluquinconazol y kresoxim-metil bajo BPA presentan diferencias significativas en el índice de polifenoles totales con respecto al vino control.

También se observa que los tratamientos BPA con fenhexamida, fluquinconazol y kresoxim-metil influyen significativamente sobre el contenido en antocianos de los vinos respecto al control. Por otro lado, kresoxim-metil aplicado bajo BPA afecta significativamente al contenido en taninos respecto al control, mientras que este mismo kresoxim-metil es el único fungicida que no afecta significativamente al contenido en catequinas. No obstante, ninguno de los fungicidas estudiados afecta significativamente a la intensidad colorante.

**Tabla 6.3.-** Concentración media (n=3) en compuestos fenólicos de los vinos procedentes de uvas tratadas bajo BPA.

	Control	Famox <sup>a</sup>	Fenhex <sup>b</sup>	Fluquin <sup>c</sup>	Kresox <sup>d</sup>	Quinox <sup>e</sup>	Triflox <sup>f</sup>	D.S. <sup>g</sup>
IC <sup>h</sup>	8,29±0,33	8,77±0,23	8,35±0,05	8,24±0,11	8,19±0,05	8,06±0,23	7,96±0,19	
IPT <sup>i</sup>	41,5±3,7	57,8±1,7	50,6±3,5	56,3±0,8	50,3±3,2	40,8±0,2	42,7±1,2	a,b,c,d
A(mg/L) <sup>j</sup>	413,5±40,1	475,6±60,9	531,8±0,4	514,9±0,9	556,3±13,0	383,3±22,9	436,8±6,5	b,c,d
T(mg/L) <sup>k</sup>	381,7±15,4	368,2±7,3	437,2±10,7	427,1±10,0	503,3±40,8	371,7±68,1	449,2±117,6	d
C(mg/L) <sup>l</sup>	665,6±43,5	848,5±56,9	762,6±22,3	842,9±13,4	658,9±14,5	506,2±6,7	443,8±167,2	a,b,c,e,f

<sup>a</sup> Famoxadona; <sup>b</sup> Fenhexamida; <sup>c</sup> Fluquinconazol <sup>d</sup> Kresoxim-metil; <sup>e</sup> Quinoxifen; <sup>f</sup> Trifloxistrobin; <sup>g</sup> diferencias significativas (p≤ 0,05); <sup>h</sup> intensidad colorante; <sup>i</sup> índice de polifenoles totales; <sup>j</sup> antocianos; <sup>k</sup> taninos; <sup>l</sup> catequinas.

**Tabla 6.4.-** Concentración media (n=3) en compuestos fenólicos de los vinos procedentes de uvas tratadas bajo CPA.

	Control	Famox <sup>a</sup>	Fenhex <sup>b</sup>	Fluquin <sup>c</sup>	Kresox <sup>d</sup>	Quinox <sup>e</sup>	Triflox <sup>f</sup>	D.S. <sup>g</sup>
IC <sup>h</sup>	8,29±0,33	9,11±0,62	8,05±0,14	8,28±0,09	8,17±0,15	8,02±0,03	7,96±0,11	
IPT <sup>i</sup>	41,5±3,7	57,6±0,2	52,1±2,5	53,4±4,1	48,8±1,6	45,3±0,2	40,7±0,2	a,b,c,d,e
A(mg/L) <sup>j</sup>	413,5±40,1	614,6±11,6	583,5±3,0	552,1±4,3	553,8±18,1	438,1±3,4	444,1±29,4	a,b,c,d
T(mg/L) <sup>k</sup>	381,7±15,4	547,3±24,7	435,1±10,0	468,5±84,8	461,2±30,7	423,8±22,7	307,5±1,3	a,c
C(mg/L) <sup>l</sup>	665,6±43,5	932,1±20,1	850,7±14,5	771,5±11,1	762,6±37,9	625,5±43,5	604,3±22,3	a,b,c,d

<sup>a</sup> Famoxadona; <sup>b</sup> Fenhexamida; <sup>c</sup> Fluquinconazol <sup>d</sup> Kresoxim-metil; <sup>e</sup> Quinoxifen; <sup>f</sup> Trifloxistrobin; <sup>g</sup> diferencias significativas (p≤ 0,05); <sup>h</sup> intensidad colorante; <sup>i</sup> índice de polifenoles totales; <sup>j</sup> antocianos; <sup>k</sup> taninos; <sup>l</sup> catequinas.

En base a estos resultados se puede afirmar que el perfil fenólico de los vinos procedentes de uvas tratadas bajo BPA muestra diferencias significativas respecto al vino control cuando la vinificación se lleva a cabo con levaduras autóctonas.

Cuando se vinifican las uvas que han recibido el tratamiento con fungicidas en condiciones adversas, se observa que los vinos con residuos de famoxadona, fenhexamida, fluquinconazol, kresoxim-metil y quinoxifen muestran diferencias significativas en el índice de polifenoles totales con respecto al vino control.

También se observan diferencias significativas en el contenido en antocianos y catequinas cuando los tratamientos desfavorables se llevan a cabo con famoxadona, fenhexamida, fluquinconazol y kresoxim-metil.

Asimismo, los tratamientos CPA con famoxadona y fluquinconazol afectan significativamente al contenido en taninos de los vinos con respecto al control.

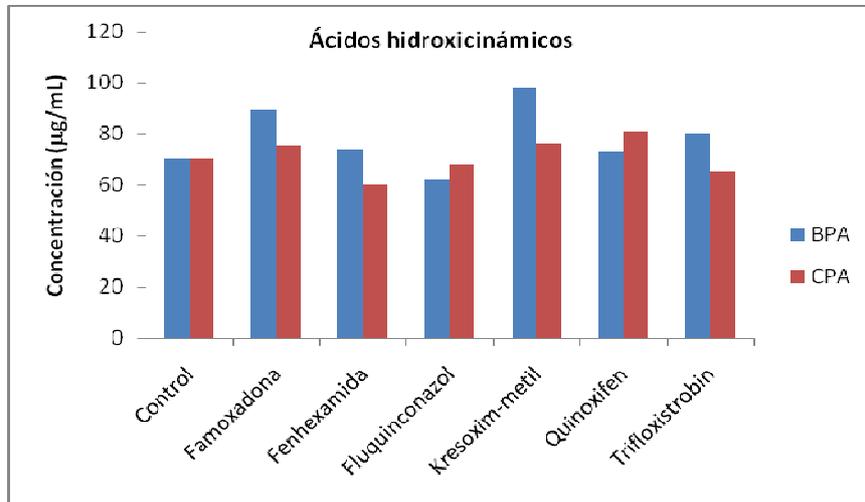
Al igual que ocurría en BPA, la aplicación de los fungicidas en condiciones desfavorables no afecta significativamente a la intensidad colorante de los vinos.

Estos resultados muestran que no existe correlación entre la cantidad de fungicida presente en la uva o el vino y los valores de los índices y compuestos estudiados.

De igual forma, tampoco se encuentra correlación alguna entre el aumento de residuos de fungicidas en la uva o el vino y el contenido en compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

Esta ausencia de correlaciones se da tanto en los tratamientos bajo BPA como en los tratamientos en condiciones adversas.

Las figuras 6.2. - 6.4. muestran el contenido en compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los vinos estudiados.



**Figura 6.2.-** Contenido en derivados del ácido hidroxicinámico ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrado en los vinos ensayados.

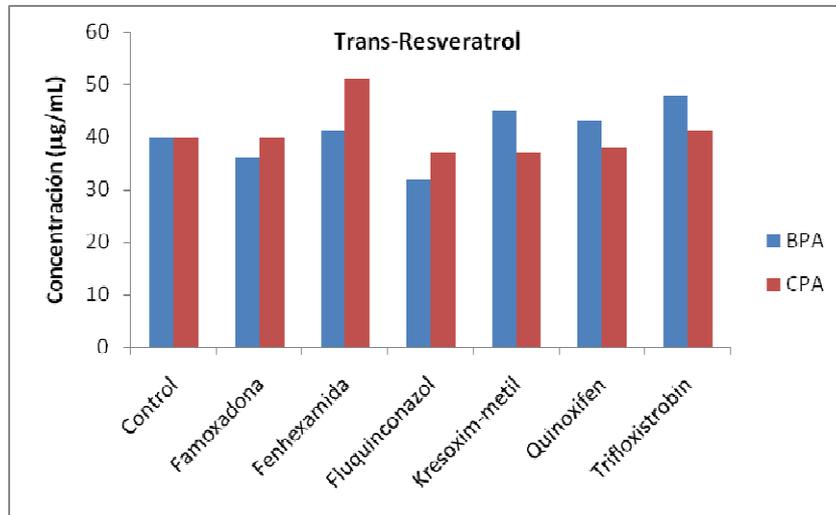
En condiciones BPA todos los tratamientos aumentan el contenido en ácidos hidroxicinámicos del vino con respecto al control, excepto para fluquinconazol.

De esta forma, el tratamiento con kresoxim-metil es el que provoca el mayor aumento, seguido de los de famoxadona y trifloxistrobin.

En condiciones CPA, los vinos tratados con famoxadona, kresoxim-metil y quinoxifen presentan mayor contenido en derivados del ácido hidroxicinámico que los encontrados en el vino control, mientras que para el resto de tratamientos este contenido es menor al del vino control.

El análisis conjunto de ambos tratamientos muestra que en aquellos vinos procedentes de uvas tratadas con famoxadona, kresoxim-metil y quinoxifen, tanto en BPA como en CPA, su contenido en ácidos hidroxicinámicos es mayor que en el vino control, mientras que en aquellos vinos procedentes de uvas tratadas con fluquinconazol, tanto en BPA como en CPA, el efecto es el contrario.

Si comparamos ambos tratamientos encontramos que, para la mayoría de principios activos los vinos BPA muestran mayor contenido en derivados del ácido hidroxicinámico que los vinos CPA, excepto en los casos de fluquinconazol y quinoxifen, en los que ocurre al contrario.



**Figura 6.3.-** Contenido en trans-resveratrol ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrado en los vinos ensayados.

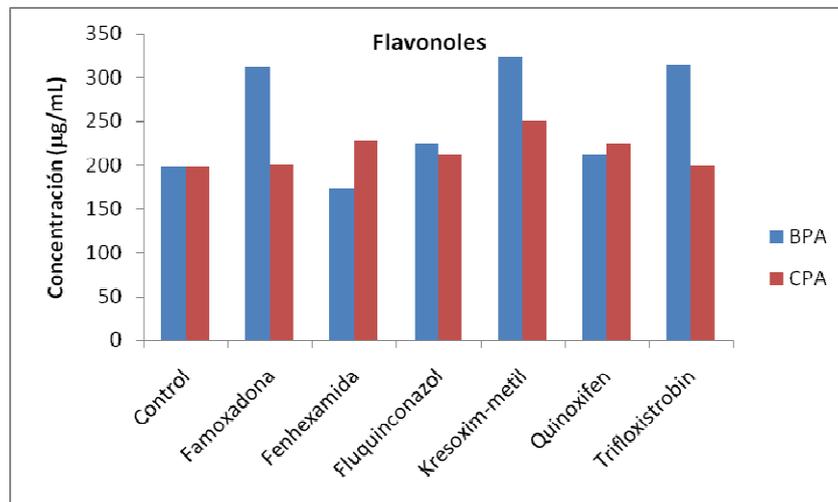
En condiciones BPA todos los tratamientos aumentan el contenido en trans-resveratrol del vino con respecto al control, excepto los tratados con famoxadona y fluquinconazol.

El mayor aumento se consigue con la aplicación de trifloxistrobin, seguida de las de kresoxim-metil y quinoxifen.

En condiciones CPA todos los vinos tratados presentan menor contenido en trans-resveratrol respecto al vino control, excepto en el caso de aquellos tratados con famoxadona, fenhexamida y trifloxistrobin, cuyos contenidos en trans-resveratrol son ligeramente superiores al del vino control.

Cuando se comparan ambos tratamientos se observa que únicamente en los casos de famoxadona, fenhexamida y fluquinconazol, los vinos procedentes de tratamientos CPA presentan mayor contenido en trans-resveratrol que sus homólogos BPA.

Cabe destacar, además, que los vinos procedentes de uvas tratadas con fenhexamida bajo condiciones CPA son los que muestran el mayor contenido en trans-resveratrol de todos los vinos analizados.



**Figura 6.4.-** Contenido en flavonoles ( $\mu\text{g/mL}$ ) encontrado en los vinos ensayados.

En condiciones BPA los vinos procedentes de uvas tratadas con fenhexamida presentan niveles de flavonoles por debajo de los hallados en el vino control.

Asimismo los vinos tratados con famoxadona, kresoxim-metil y trifloxistrobin son los que presentan los mayores niveles de flavonoles de la totalidad de vinos ensayados, tanto de los vinos BPA como de los CPA.

En condiciones CPA todos los vinos tratados muestran mayores niveles de flavonoles respecto a los encontrados en el vino control, excepto en el caso de los tratados con famoxadona y trifloxistrobin, cuyo contenido en flavonoles es igual al del vino control.

Cuando se comparan ambos tratamientos se observa que, únicamente en los vinos procedentes de uvas tratadas con fenhexamida y quinoxifen bajo CPA, los niveles de flavonoles son mayores que los de sus homólogos BPA.

En el segundo año de los ensayos con los mismos fungicidas se decidió estudiar solamente las condiciones críticas, ya que se había visto el comportamiento diferente en los dos tipos de tratamientos estudiados. Además, este año se vinificaron las uvas con levaduras secas activas (LSA) dado que uno de los factores enológicos más importantes es la elección de la cepa de levadura a

utilizar en la vinificación ya que, por su capacidad de adsorber compuestos fenólicos (Vasserot *et al.*, 1997; Morata *et al.*, 2003; Bautista-Ortín *et al.*, 2007; Caridi, 2007; Caridi *et al.*, 2007), puede afectar, entre otras características, al color del vino (Cuinier, 1988).

Dicha capacidad adsorptiva dota a las manoproteínas de la pared de las levaduras de varias funciones enológicas (Caridi, 2006) entre las que destacan la adsorción de ocratoxina A, retirándola del mosto o del vino, y la interacción tanto con los pigmentos de la uva como con otros compuestos fenólicos.

Además las levaduras pueden liberar estas manoproteínas que tienen la capacidad de formar enlaces con antocianos y taninos (Escot *et al.*, 2001), disminuyendo su reactividad y protegiéndolos frente a la precipitación.

Esta interacción entre los compuestos fenólicos de la uva y las manoproteínas producidas por las levaduras depende de la mayor o menor producción de éstas y del mosto (Escot *et al.*, 2001). De hecho la variedad de uva, debido a su composición fenólica, modula la actividad adsorptiva de las levaduras (Sidari *et al.*, 2007).

Los distintos estudios realizados sobre el efecto que la selección de la cepa de levadura puede tener en el vino (Castino, 1982; Chatonnet *et al.*, 1992; Vasserot *et al.*, 1997; Escot *et al.*, 2001; Riou *et al.*, 2002; Morata *et al.*, 2003; Mazauric y Salmon, 2005 y 2006; Medina *et al.*, 2005; Sacchi *et al.*, 2005; Stockley y Høj, 2005; Hayasaka *et al.*, 2007; Monagas *et al.*, 2007; Palomero *et al.*, 2007; Sartini *et al.*, 2007; Sidari *et al.*, 2007; Nikfardjam y Pickering, 2008; Sharma *et al.*, 2009; Squadrito *et al.*, 2010; Fernández *et al.*, 2011; Palomero *et al.*, 2011) han demostrado que las levaduras del vino influyen tanto en la concentración como en la composición fenólica del mismo, generalmente disminuyendo el contenido en compuestos fenólicos, sobre todo mediante adsorción en la pared celular.

En lo que respecta a los antocianos, diferentes estudios han demostrado que su adsorción aumenta con el grado de esterificación y metoxilación de los mismos, sugiriendo la posibilidad de interacciones hidrofóbicas envueltas en el mecanismo de adsorción (Boivin *et al.*, 1998 ; Morata *et al.*, 2003).

Además, algunas levaduras pueden presentar actividad beta-glucosidasa (Manzanares *et al.*, 2000; Hernández *et al.*, 2003; Todaro *et al.*, 2008; Vernocchi *et*

*al.*, 2011) o hidroxicinamato decarboxilasa (Benito *et al.*, 2009 y 2011) promoviendo la degradación de los antocianos.

Por otro lado, durante la fermentación, las levaduras pueden contribuir a estabilizar el color de los vinos como resultado de su participación en la generación, tanto de compuestos formados por la reacción entre ácido pirúvico, acetaldehído y antocianos, como de piranoantocianos (Morata *et al.*, 2005 y 2007; Benito *et al.*, 2011; Mangani *et al.*, 2011). De hecho, se ha encontrado una fuerte correlación entre la cantidad de metabolitos producidos por las diferentes cepas de levaduras y la cantidad de estos compuestos contenidos en el vino (Morata *et al.*, 2003).

Por todo lo anteriormente expuesto y dado que en el segundo año de estudio las vinificaciones se llevaron a cabo con la participación de Levaduras Secas Activas (LSA), se analizaron nuevamente los contenidos en antocianos totales y compuestos fenólicos de bajo peso molecular de los vinos obtenidos, ya que estos dos parámetros son los que más pueden verse afectados por la adición de las LSA.

En la Tabla 6.5. se muestran los resultados del análisis estadístico al que se han sometido cada uno de los compuestos fenólicos analizados en los vinos obtenidos en cada ensayo.

De los datos expuestos se desprende que el único vino obtenido en presencia de fungicida que no presenta diferencias significativas con el control en ninguno de los compuestos estudiados es el ensayo con adición de quinoxifen. Por el contrario, el vino obtenido de uvas tratadas con famoxadona produce diferencias significativas para todos los parámetros estudiados.

El contenido en antocianos (suma de antocianinas) disminuye en los ensayos donde se producen diferencias significativas con respecto al control (famoxadona, trifloxistrobin y fenhexamida). Las disminuciones observadas para estos compuestos, que contribuyen de manera preponderante en el color de los vinos tintos, pueden producir una nítida disminución en la intensidad colorante de estos vinos.

Tabla 6.5.- Contenido (n = 3) en compuestos fenólicos (X±DS mg/L) en vinos.

Fungicida	Antocianos	Ác. Hidroxicinámicos	Trans-resveratrol	Flavonoles
Control	762,7±9,8	108,7±3,7	34,3±0,7	308,4±5,4
Famoxadona <sup>(1)</sup>	654,1±35,4**	89,3±4,6***	18,7±2,4***	214,7±3,8***
Fenhexamida <sup>(2)</sup>	664,3±94,0**	102,9±6,1	31,2±0,9**	314,9±37,7
Fluquinconazol <sup>(3)</sup>	711,2±14,3	102,1±0,4*	30,8±2,3**	208,3±50,6
Kresoxim-metil <sup>(4)</sup>	759,0±29,9	73,5±0,1***	23,3±0,4***	232,8±4,6**
Quinoxifen <sup>(5)</sup>	774,4±9,3	114,1±9,5	34,9±0,4	276,1±29,2
Trifloxistrobin <sup>(6)</sup>	508,5±42,7***	92,0±0,7***	25,6±0,6***	280,6±2,9
G.S.	(1),(2),(6)	(1),(3),(4),(6)	(1),(2),(3),(4),(6)	(1),(4)

G.S. Grado de significación: \*p ≤ 0,05 \*\*p ≤ 0,01 \*\*\*p ≤ 0,001

También se producen descensos en los niveles de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles en los vinos que muestran diferencias significativas con respecto al control. Estos descensos pueden ser importantes, en el caso de los flavonoles, ya que actúan como copigmentos y pueden afectar a la estabilidad del color del vino al producir una menor copigmentación.

Partiendo de la base de la importancia nutricional y farmacológica del trans-resveratrol como antioxidante, la disminución observada en todos los ensayos con presencia de fungicida, excepto en el caso de quinoxifen, implica una pérdida de su capacidad antioxidante y, por tanto, de sus propiedades beneficiosas para la salud cardiovascular de los consumidores responsables.

Finalmente, y como conclusión se puede afirmar que la presencia de algunos de los fungicidas estudiados provoca una disminución de los niveles de estos compuestos en los vinos, que pueden producir una pérdida de copigmentación, una menor estabilidad del color de los vinos y un descenso de su capacidad antioxidante. A pesar de ello, los contenidos determinados se encuentran en el rango de valores normales en vinos tintos de *Monastrell* y, por tanto, no debemos desaconsejar de forma taxativa el uso de estos fungicidas.

#### **6.4.2. Influencia de los fungicidas sobre los compuestos aromáticos**

En las Tablas 6.6. y 6.7. se muestra la composición en volátiles de los vinos analizados, tanto en condiciones de BPA como en condiciones adversas.

Estos compuestos son importantes en todos los tipos de vino y, especialmente, en los de *Monastrell* (Salinas *et al.*, 1996 y 1998; Lorenzo *et al.*, 2008 a y b). Debido a que poseen características químicas y descriptores similares, algunos de estos compuestos se han agrupado de la siguiente forma: etil-ésteres (butanoato de etilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, nonanoato de etilo, decanoato de etilo, etil-9-dodecanoato y dietil succinato); acetatos en los que el éster deriva del ácido acético (acetato de isoamilo, acetato de hexilo y acetato de 2-feniletanol); grupo de los ácidos (ácidos hexanoico y octanoico) y terpenoides (damascenona y nerolidol). Los restantes compuestos se muestran individualmente incluido el acetato de etilo, ya que por su carácter de éster etílico y acetato podría estar en cualquiera de los dos primeros grupos.

**Tabla 6.6.-** Concentración media (n=4) de los volátiles del vino (mg/L) en ensayos bajo BPA.

Volátiles	Control	Famox	Fenhex	Fluquin	Kresox	Quinox	Triflox
Etil acetato	80,53±7,43	33,23±0,36	12,23±0,83	99,17±40,71	69,64±4,43	95,99±4,02	97,52±5,49
Etil ésteres	2,86±0,63	3,62±0,10	2,28±0,34	2,72±0,14	4,39±0,27	5,38±0,89	6,44±0,63
Acetatos	1,40±0,03	2,44±0,13	1,31±0,11	1,03±0,13	2,44±0,12	2,59±0,36	3,79±0,19
1-Hexanol	3,45±0,46	3,19±0,14	3,05±0,50	3,68±0,28	3,38±0,27	4,16±0,47	4,04±0,18
2-Feniletanol	56,89±1,56	81,12±3,29	50,22±1,42	44,26±5,53	66,92±7,34	85,95±7,59	75,01±0,73
3-Metil-1-butanol	113,60±56,20	143,87±1,58	74,97±6,67	106,37±10,27	163,68±10,86	209,68±55,73	214,46±21,85
Terpenoides	0,16±0,01	0,31±0,01	0,25±0,02	0,24±0,02	0,26±0,01	0,19±0,02	0,18±0,02
Ácidos	5,48±0,61	3,38±0,25	1,73±0,28	2,58±0,23	3,71±0,30	3,55±0,43	2,57±1,41
Benzaldehido	0,028±0,002	0,052±0,005	0,038±0,003	0,048±0,007	0,045±0,007	0,046±0,005	0,041±0,008
Total	268,40±49,43	271,23±4,57	146,10±7,40	260,09±42,76	314,47±19,37	437,56±67,58	404,06±25,97

**Tabla 6.7.-** Concentración media (n=4) de los volátiles del vino (mg/L) en ensayos bajo CPA.

Volátiles	Control	Famox	Fenhex	Fluquin	Kresox	Quinox	Triflox
Etil acetato	80,53±7,43	7,46±3,52	79,67±18,67	11,48±4,68	25,57±11,23	33,25±6,06	62,04±25,98
Etil ésteres	2,86±0,63	1,93±0,38	2,38±2,39	2,38±2,39	3,72±0,44	3,42±0,60	3,19±0,29
Acetatos	1,40±0,03	1,82±0,05	2,05±0,55	2,00±0,32	2,71±0,20	2,62±1,78	2,01±0,19
1-Hexanol	3,45±0,46	2,35±0,06	2,26±1,02	3,50±0,33	3,66±0,10	3,19±0,15	3,11±0,56
2-Feniletanol	56,89±1,56	84,06±3,37	46,43±7,71	57,79±10,74	79,19±3,72	63,72±2,31	70,99±4,11
3-Metil-1-butanol	113,60±56,20	62,39±2,57	135,01±57,04	77,59±17,24	114,00±20,89	106,39±9,73	80,29±30,64
Terpenoides	0,16±0,01	0,34±0,01	0,24±0,02	0,19±0,03	0,22±0,01	0,21±0,01	0,39±0,06
Ácidos	5,48±0,61	6,18±1,16	3,89±0,93	2,19±0,19	3,43±0,32	3,37±0,20	3,12±0,73
Benzaldehido	0,028±0,002	0,041±0,003	0,057±0,016	0,034±0,008	0,050±0,005	0,045±0,005	0,045±0,011
Total	268,40±49,43	166,70±3,34	271,99±51,01	157,97±11,16	232,55±20,62	216,23±16,61	223,93±33,70

Las Tablas 6.8. y 6.9. muestran los resultados del análisis ANOVA cuando se compara el contenido en volátiles de los vinos tratados bajo BPA y CPA con respecto al vino control respectivamente.

La Tabla 6.10., por su parte, muestra los resultados del análisis ANOVA cuando se compara el contenido en volátiles de los vinos entre los dos tratamientos llevados a cabo para cada fungicida.

**Tabla 6.8.-** ANOVA de los volátiles en los vinos tratados bajo BPA respecto al control.

Volátiles	Famox	Fenhex	Fluquin	Kresox	Quinox	Triflox
Etil acetato	***	***				
Etil ésteres				**	***	***
Acetatos	***		*	***	***	***
1-Hexanol					*	
2-Feniletanol	***		**	*	***	***
3-Metil-1-butanol				*	***	***
Terpenoides	***	***	***	***		
Ácidos	***	***	***	***	***	***
Benzaldehido	**		*	*	*	
Total		***			***	***

\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$

**Tabla 6.9.-** ANOVA de los volátiles en los vinos tratados bajo CPA respecto al control.

Volátiles	Famox	Fenhex	Fluquin	Kresox	Quinox	Triflox
Etil acetato	***		***	***	***	*
Etil ésteres						
Acetatos	*	***	***	***	***	***
1-Hexanol	***	***				
2-Feniletanol	***	**		***		***
3-Metil-1-butanol	*					
Terpenoides	***	***		**	**	***
Ácidos		**	***	***	***	***
Benzaldehido		***		**	*	*
Total	***		***		*	

\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$

**Tabla 6.10.-** ANOVA de los volátiles entre ambos tratamientos (BPA y CPA).

Volátiles	Famox	Fenhex	Fluquin	Kresox	Quinox	Triflox
Etil acetato	*	***	***	***	***	**
Etil ésteres	**				***	***
Acetatos	***	***	***			***
1-Hexanol	**	*			**	**
2-Feniletanol			***	**	***	
3-Metil-1-butanol	***	**		*	***	***
Terpenoides			*	**		***
Ácidos	***	***				
Benzaldehido		*				
Total	***	***	***	***	***	***

\*\*\*:  $p \leq 0,001$ ; \*:  $p \leq 0,05$ ; \*\*:  $p \leq 0,01$

La mayoría de los compuestos volátiles analizados proceden de la fermentación alcohólica, excepto el 1-hexanol y el grupo de los terpenoides. Estos últimos proceden directamente de la uva, aunque su contenido puede verse incrementado por la actividad glicosidasa de las levaduras sobre sus estructuras no volátiles durante la fermentación alcohólica (Lambrechts y Pretorius, 2000).

Por otro lado el 1-hexanol se relaciona principalmente con la actividad lipoxigenasa de la uva o con la aireación del mosto, lo cual produce compuestos  $C_6$  insaturados que pueden ser transformados en 1-hexanol por las levaduras durante la fermentación (Cordonnier, 1989).

El acetato de etilo es el éster más abundante en todos los vinos y presenta un efecto positivo sobre la calidad sensorial global de los mismos, siempre y cuando se alcancen las concentraciones adecuadas. Concentraciones cercanas a los 80 mg/L contribuyen a los aromas vinosos (Piggott *et al.*, 1984), pero concentraciones más altas suponen un efecto negativo en el aroma del vino, dando a éste un carácter ácido/avinagrado, que es incluso más influyente que el procedente del ácido acético.

En base a lo expuesto anteriormente, el contenido en acetato de etilo encontrado en el vino control ( $80,53 \pm 7,43$  mg/L) se acerca al defecto ácido/avinagrado. Asimismo, en condiciones BPA, los vinos procedentes de uvas tratadas con fluquinconazol, quinoxifen y trifloxistrobin muestran mayor contenido en acetato de etilo que el vino control.

Por otro lado, en los tratamientos con famoxadona, fenhexamida y kresoxim-metil bajo BPA los vinos obtenidos contienen menos acetato de etilo que el vino control (Tabla 6.6.).

Cuando la aplicación de los fungicidas se lleva a cabo en condiciones adversas, los vinos obtenidos presentan menor contenido en acetato de etilo que el vino control (Tabla 6.7.).

El análisis ANOVA muestra que el contenido en acetato de etilo de los vinos procedentes de uvas tratadas con famoxadona y fenhexamida bajo BPA disminuye significativamente respecto al del vino control (Tablas 6.6. y 6.8.).

Por otro lado, cuando los fungicidas se aplican en condiciones adversas, los vinos resultantes muestran también un descenso significativo en su contenido en acetato de etilo, a excepción de los tratados con fenhexamida (Tablas 6.7. y 6.9.).

Finalmente, los vinos elaborados bajo CPA presentan un mayor contenido en acetato de etilo que los obtenidos de uvas BPA (Tablas 6.6., 6.7. y 6.10.).

El resto de compuestos del grupo de los ésteres de etilo, que se forman durante la fermentación alcohólica, contribuyen al típico aroma afrutado de los vinos jóvenes, sin distinción de la vinífera usada para la vinificación (Salinas *et al.*, 1996 y 1998; Ferreira *et al.*, 2002; Francioli *et al.*, 2003; Lorenzo *et al.*, 2008 a y b).

Dentro de este grupo, el compuesto más abundante es el butanoato de etilo (1,4-4,8 mg/L) seguido por octanoato de etilo (0,4-0,8 mg/L) y hexanoato de etilo (0,20-0,35 mg/L) respectivamente. El resto de ésteres no sobrepasan los 0,05 mg/L.

Cuando los fungicidas se aplican siguiendo BPA, el contenido en ésteres de etilo de los vinos resultantes de los tratamientos con fenhexamida y fluquinconazol está por debajo de los del vino control, aunque muy cercanos a los de éste.

Sin embargo, en los procedentes de los tratamientos con famoxadona, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin, la concentración en ésteres de etilo es mayor que en el vino control (Tabla 6.6.).

Cuando la aplicación de los fungicidas se lleva a cabo en condiciones adversas, los vinos obtenidos de las uvas tratadas con famoxadona, fenhexamida y fluquinconazol muestran menor contenido en ésteres de etilo que el vino control. Los tratamientos con kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin, por su

parte, rinden vinos con mayor concentración en ésteres de etilo que el vino control (Tabla 6.7.).

El análisis ANOVA del contenido en ésteres de etilo de los vinos estudiados revela un incremento significativo de estos compuestos en los vinos tratados con kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin bajo BPA con respecto al vino control (Tablas 6.6. y 6.8.).

Por otro lado, ninguno de los vinos procedentes de tratamientos adversos muestra variaciones significativas en el contenido en ésteres de etilo con respecto al vino control (Tablas 6.7. y 6.9.).

Finalmente, cuando se comparan los dos tratamientos (BPA y CPA) se puede observar que la aplicación de famoxadona, quinoxifen y trifloxistrobin bajo CPA reducen significativamente el contenido en ésteres de etilo de los vinos (Tablas 6.6., 6.7. y 6.10.).

El grupo de los acetatos también contribuye al aroma del vino con notas afrutadas, principalmente debidas a las elevadas concentraciones de acetato isoamílico (descrito como aroma a plátano) (Etiévant y Maarse, 1991), y cuyo contenido oscila entre 1 y 2,5 mg/L. El segundo compuestos más abundante de este grupo es el acetato de 2-fenil-etanol (0,2-0,7 mg/L) seguido del acetato de hexilo (0,05-0,30 mg/L).

Al igual que ocurre con el grupo de los ésteres de etilo, cuando la aplicación de los fungicidas se realiza siguiendo BPA, los vinos procedentes de los tratamientos con fenhexamida y fluquinconazol contienen menos acetatos que el vino control. Sin embargo, en los procedentes de los tratamientos con famoxadona, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin, la concentración de acetatos es mayor que en el vino control (Tabla 6.6.).

Cuando los tratamientos con fungicidas se realizan en condiciones adversas, los vinos obtenidos presentan mayor concentración de acetatos que el vino control (Tabla 6.7.).

El análisis ANOVA muestra que los vinos tratados con famoxadona, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin bajo BPA tienen un contenido en acetatos significativamente mayor al encontrado en el vino control, mientras que en el tratado con fluquinconazol, el contenido en acetatos es menor que en el vino control (Tablas 6.6. y 6.8.).

En todos los casos, la aplicación de los fungicidas estudiados en condiciones CPA incrementa significativamente el contenido en acetato de los vinos en relación con el vino control (Tablas 6.7. y 6.9.).

Finalmente, cuando se comparan ambos tratamientos (BPA y CPA), se observa que famoxadona y trifloxistrobin, empleados bajo BPA, aumentan el contenido en acetatos mientras que en los restantes fungicidas el contenido en acetatos aumenta cuando se emplean bajo CPA (Tablas 6.6., 6.7. y 6.10.).

El 1-hexanol es el principal responsable de los olores herbáceos desagradables en el vino (Etiévant y Maarse, 1991). Cuando los fungicidas se aplican bajo condiciones BPA, los vinos procedentes de los tratamientos con famoxadona, fenhexamida, fluquinconazol y kresoxim-metil presentan niveles de 1-hexanol similares a los del vino control (Tabla 6.6.).

Por otra parte, los vinos obtenidos de las uvas tratadas con quinoxifen y trifloxistrobin, muestran concentraciones de 1-hexanol mayores que las del vino control (Tabla 6.6.).

Cuando la aplicación de los fungicidas se realiza en condiciones adversas los vinos obtenidos presentan niveles de 1-hexanol similares a los del vino control, excepto para famoxadona y fenhexamida dónde estas concentraciones son menores que las del vino control (Tabla 6.7.).

Entre los fungicidas aplicados bajo condiciones BPA, el análisis ANOVA muestra que quinoxifen produce un ligero aumento del contenido en 1-hexanol (Tablas 6.6. y 6.8.). Asimismo, se observa un descenso significativo del contenido en 1-hexanol en aquellos vinos en los que los tratamientos con famoxadona y fenhexamida se realizan en condiciones adversas (Tablas 6.7. y 6.9.).

Por último, la comparación de ambos tratamientos pone de manifiesto que los vinos obtenidos bajo BPA poseen concentraciones mayores de 1-hexanol que los procedentes de tratamientos CPA, excepto en el caso de kresoxim-metil (Tablas 6.6., 6.7. y 6.10.).

El único alcohol de fusel descrito sensorialmente como agradable (aroma a rosa) es el 2-feniletanol (Versini *et al.*, 1994). La mayoría de los fungicidas, tanto en BPA como en CPA, provocan un incremento de este alcohol con respecto al vino control a excepción de fluquinconazol en BPA y fenhexamida en ambos casos (BPA y CPA) (Tablas 6.6. y 6.7.).

Cuando se comparan ambos tratamientos se observa que, la aplicación de quinoxifen bajo BPA rinde vinos con un contenido en 2-feniletanol significativamente mayor al de sus homólogos CPA, mientras que para fluquinconazol y kresoxim-metil el efecto es el contrario (Tablas 6.6., 6.7. y 6.10.).

El alcohol de fusel más abundante en los vinos analizados es el 3-metil-1-butanol, el cual se describe aromáticamente como “disolvente”. A pesar de que en concentraciones moderadas contribuye a la complejidad aromática del vino, niveles altos del mismo van en detrimento de la calidad aromática del vino (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1976; Etiévant y Maarse, 1991).

Cuando la aplicación de los fungicidas se lleva a cabo bajo BPA, los vinos procedentes de las uvas tratadas con fenhexamida y fluquinconazol presentan menor contenido en este alcohol que el vino control. Por otro lado, los vinos procedentes de los tratamientos con famoxadona, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin muestran concentraciones de 3-metil-1-butanol mayores que las del vino control (Tabla 6.6.).

Cuando los tratamientos con fungicidas se realizan bajo CPA, solamente los vinos procedentes de los tratamientos con fenhexamida y kresoxim-metil presentan valores de 3-metil-1-butanol superiores al vino control. Para el resto de tratamientos las concentraciones de 3-metil-1-butanol en el vino son menores a las del vino control (Tabla 6.7.).

El análisis ANOVA muestra que cuando los tratamientos con quinoxifen y trifloxistrobin se realizan bajo BPA, se produce un incremento en el contenido en 3-metil-1-butanol de los vinos con respecto al vino control. Sin embargo, cuando estos mismos principios activos se aplican en condiciones adversas este incremento no se da (Tablas 6.6. – 6.9.).

Cuando ambos tratamientos (BPA y CPA) se comparan se observa un efecto significativo de todos los fungicidas ensayados sobre este alcohol, excepto en el caso de fluquinconazol. Bajo condiciones adversas, famoxadona, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin producen un descenso en este compuesto. El efecto opuesto se observa para fenhexamida (Tablas 6.6., 6.7. y 6.10.).

Del grupo de los terpenoides solamente se han cuantificado damascenona y nerodiol, obteniéndose valores entre 0,05-0,09 mg/L y 0,06-0,30 mg/L respectivamente. Los terpenoides han sido ampliamente estudiados por su papel

en la diferenciación sensorial de los vinos en base a la variedad de uva usada en su elaboración.

Estos compuestos poseen un agradable aroma floral con un umbral de percepción muy bajo; esto hace que puedan ser percibidos incluso a concentraciones bajas (Etiévant y Maarse, 1991; Ferreira *et al.*, 1995; Guth, 1997; López *et al.*, 2003).

Tanto en condiciones BPA como bajo CPA, todos los fungicidas ensayados producen un incremento en este grupo de compuestos con respecto al vino control (Tablas 6.6. y 6.7.).

No obstante, este incremento no es significativo en los tratamientos con quinoxifen y trifloxistrobin bajo BPA (Tablas 6.6. y 6.8.), ni en el tratamiento con fluquinconazol bajo CPA (Tablas 6.7. y 6.9.).

Cuando se comparan ambos tratamientos se observa que el contenido en terpenoides no se modifica significativamente en los casos de famoxadona, fenhexamida y quinoxifen. Sin embargo, en los casos de kresoxim-metil y fluquinconazol su aplicación bajo BPA produce vinos con mayor contenido en terpenoides, encontrándose el efecto contrario cuando es trifloxistrobin el principio activo aplicado bajo BPA (Tablas 6.6., 6.7. y 6.10.).

Los ácidos hexanoico y octanoico presentan valores que van de 0,5-3 mg/L a 2-4 mg/L respectivamente. Estos compuestos se asocian con la calidad de los vinos, aportándoles la nota aromática "grasa". De esta forma, su proximidad al umbral olfatorio juega un importante papel en la complejidad del aroma (Shinohara, 1985).

Cuando la aplicación de los fungicidas se hace siguiendo criterios BPA, los vinos obtenidos presentan menor contenido en ácidos que el vino control (Tabla 6.6.).

De la misma forma cuando los fungicidas se aplican en condiciones adversas, los vinos obtenidos presentan menor contenido en ácidos que el vino control, a excepción de los obtenidos de uvas tratadas con famoxadona que muestran mayor concentración de ácidos que el vino control (Tabla 6.7.).

El análisis ANOVA muestra que todos los fungicidas ensayados, tanto en BPA como en CPA, disminuyen significativamente el contenido en estos ácidos

con respecto al vino control a excepción de los tratados con famoxadona bajo CPA (Tablas 6.6. –6.9.).

Cuando se comparan ambos tratamientos, solamente en los tratamientos con famoxadona y fenhexamida bajo CPA, la disminución del contenido en ácidos del vino es significativamente mayor que cuando se aplican siguiendo buenas prácticas agrícolas (Tablas 6.6., 6.7. y 6.10.).

El benzaldehído, compuesto descrito aromáticamente como almendras amargas (Etiévant y Maarse, 1991), presenta valores en el vino no detectables por el paladar humano.

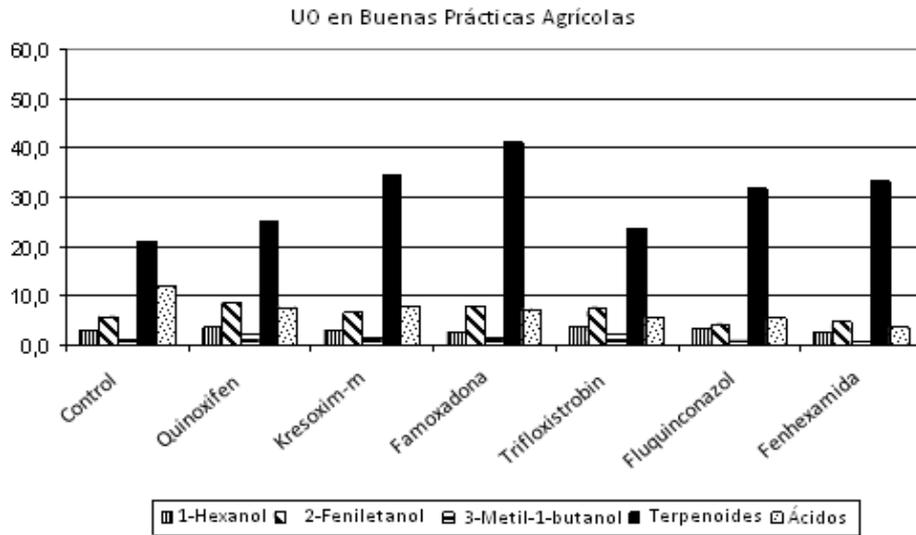
Todos los fungicidas ensayados tanto en BPA como CPA incrementan el contenido en este aldehído con respecto al vino control, aunque fenhexamida y trifloxistrobin bajo BPA, así como famoxadona y fluquinconazol bajo CPA no lo hacen de forma significativa (Tablas 6.6.-6.9.).

Si comparamos ambos tratamientos, solamente cuando fenhexamida se aplican en condiciones CPA, el aumento en el contenido en benzaldehído es significativamente mayor que el obtenido bajo BPA (Tablas 6.6., 6.7. y 6.10.).

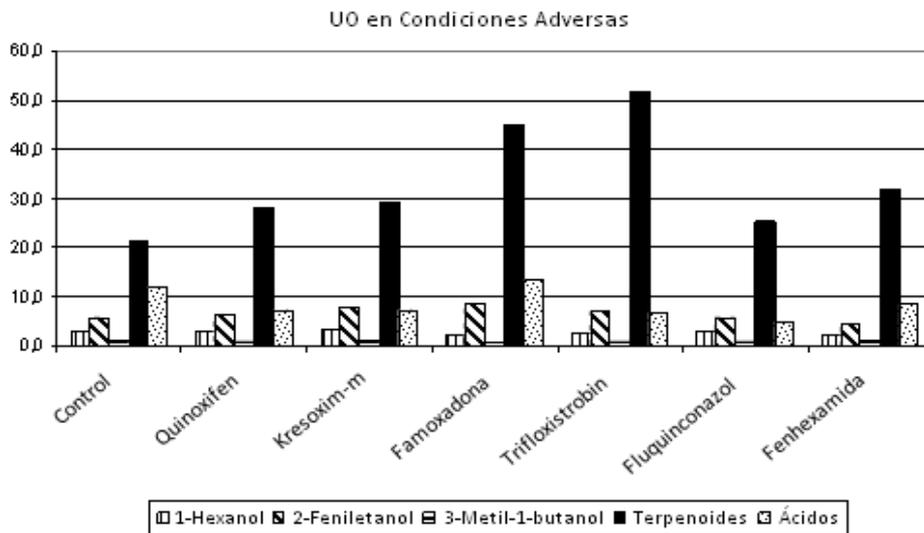
Además de los resultados descritos anteriormente, otro parámetro que nos da información adicional acerca de los cambios sensoriales que se produce en el vino como consecuencia de los tratamientos con fungicidas es el Umbral Olfatorio (UO).

El UO se define como la relación ente la concentración de cada componente en el vino y su respectivo umbral de percepción olfatorio. En base a esto, solamente aquellos compuestos con un valor de  $UO > 1$  se consideran aromas activos (Falqué *et al.*, 2001). Para este estudio, se han utilizado los valores de los distintos umbrales olfatorios encontrados en las siguientes fuentes bibliográficas: Etiévant y Maarse, 1991; Guth, 1997; Culleré *et al.*, 2004 y Peinado *et al.*, 2004.

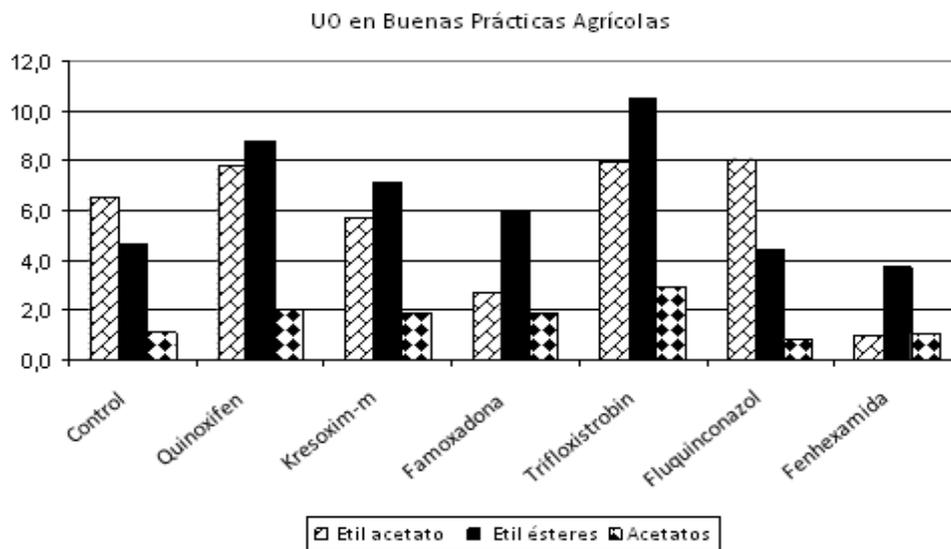
En las Figuras 6.5. y 6.6. se muestran aquellos compuestos que tienen un valor de UO mayor de 1, mientras que en las Figuras 6.7. y 6.8. representa el valor de UO medio para cada compuesto y para cada grupo de compuestos.



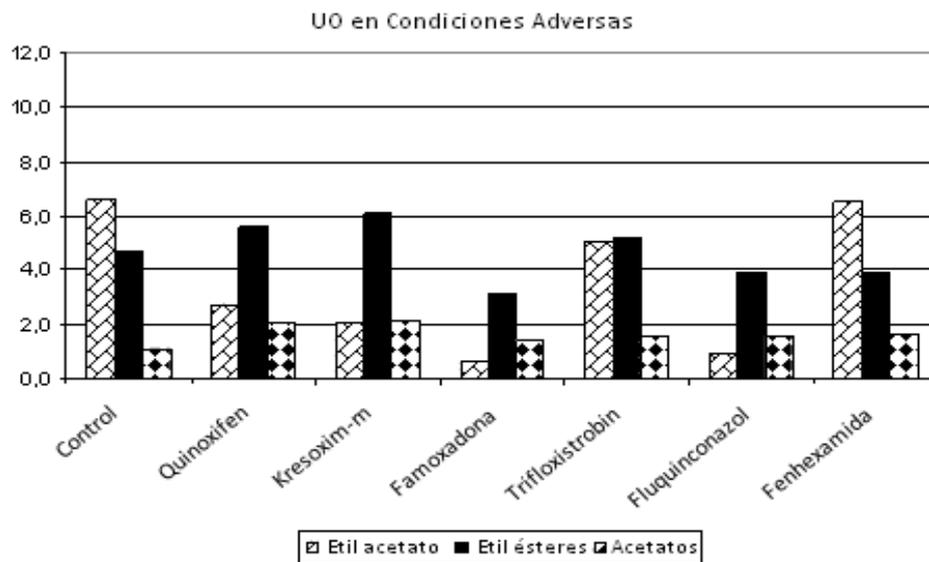
**Figura 6.5.-** Valores de UO de 1-hexanol, 2-feniletanol, 3-metil-1-butanol, terpenoides y ácidos en los vinos tratados bajo BPA.



**Figura 6.6.-** Valores de UO de 1-hexanol, 2-feniletanol, 3-metil-1-butanol, terpenoides y ácidos en los vinos tratados bajo CPA.



**Figura 6.7.-** Valores medios de UO para acetato de etilo, ésteres de etilo y acetatos en los vinos tratados bajo BPA.



**Figura 6.8.-** Valores medios de UO para acetato de etilo, ésteres de etilo y acetatos en los vinos tratados bajo CPA.

El benzaldehído es el único compuesto que no aparece en estas figuras dado que posee un UO menor de 1.

Basándonos en la literatura (Gómez-Mínguez *et al.*, 2007), los descriptores de aroma se asignaron teniendo en cuenta los valores de UO para cada compuesto y grupo de compuestos. De esta forma, los ésteres de etilo y los acetatos se describen como “frutales”, los terpenoides como “florales”, el 1-hexanol como “herbáceo”, el 2-fenil-etanol como “aroma a rosa”, el 3-metil-1-butanol como “disolvente” y el grupo de los ácidos como “graso”.

Por último, y debido a los elevados niveles encontrados en los vinos, el acetato de etilo ha sido descrito como “aroma vinoso”.

Todos los descriptores de aroma fueron normalizados en términos de UO asignando un valor de 10 a los niveles más altos encontrados en el vino para cada uno de los compuestos volátiles estudiados. Como resultado de esta normalización se obtienen los diagramas correspondientes a la Figura 6.9.

En los diagramas se muestra el perfil sensorial de los vinos obtenidos para cada uno de los tratamientos (tanto en BPA como en CPA) junto con el perfil correspondiente al vino control.

Famoxadona cuando se aplica bajo BPA presenta un diagrama irregular. En ambos tratamientos, se observa un incremento en las notas “florales” y un descenso en el “aroma a rosa”. Por otro lado, el descriptor “graso” es menor en BPA mientras que el “aroma vinoso” es menor en CPA.

Por todo ello puede considerarse que famoxadona presenta efecto a todos los niveles: fermentativo, glicosídico y de oxidación de los lípidos.

La fenhexamida no altera las notas “vinosas”, pero sí afecta ligeramente a las “florales”. Bajo ambos tratamientos, el carácter “floral” se incrementa mientras que las notas “aroma a rosa”, “herbáceo”, “graso” y “disolvente” disminuyen. Merece especial atención el descenso que la aplicación de fenhexamida en BPA produce sobre los descriptores “graso” y “disolvente”. Fenhexamida claramente mejora la composición aromática del vino cuando se aplica bajo BPA.

Finalmente, los tratamientos con fenhexamida no parecen afectar a la bioformación de ésteres, ni interferir en el proceso de oxidación de los lípidos.

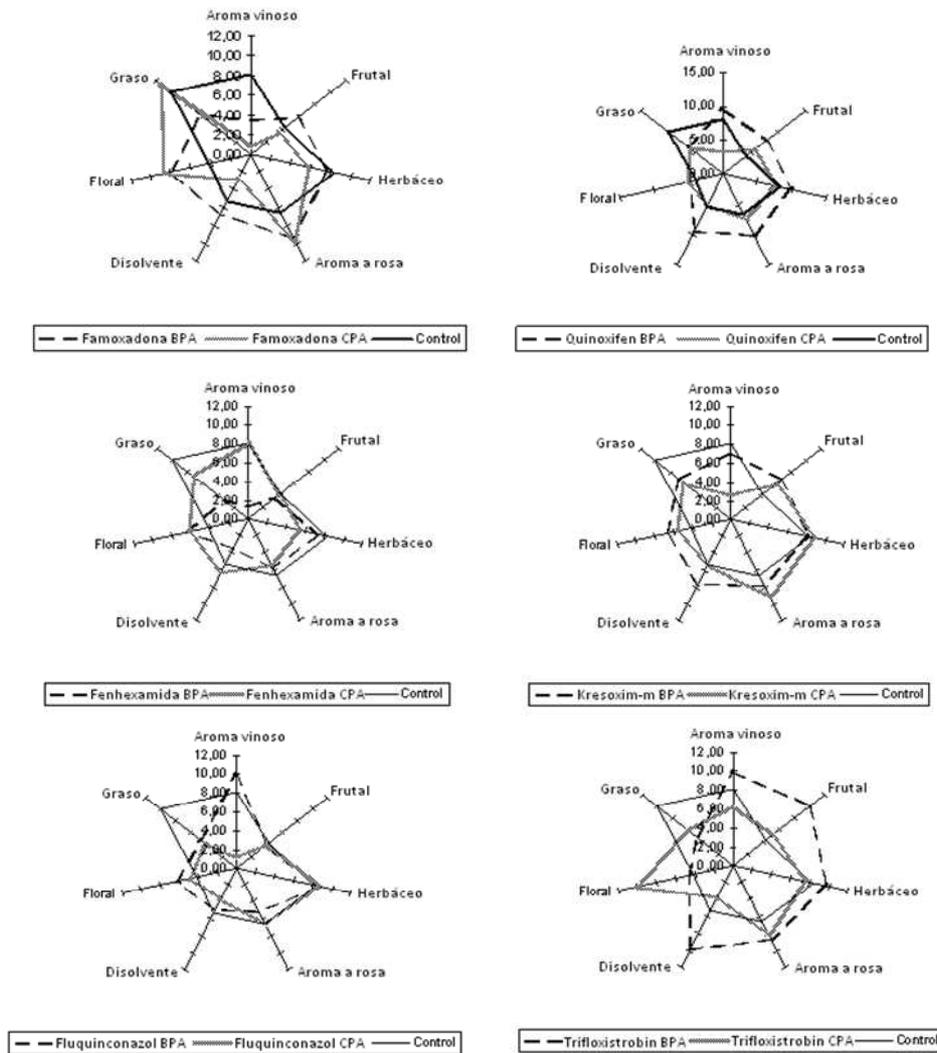


Figura 6.9.- Diagrama de los perfiles aromáticos de los vinos estudiados (BPA y CPA) frente al del vino control.

La aplicación de fluquinconazol en ambas condiciones no afecta al carácter “floral” de los vinos, pero reduce de forma importante las notas “grasas”. La aplicación en BPA produce un incremento en las notas “florales” y “vinosas” y reduce el “aroma a rosa”.

Por otro lado, la aplicación en condiciones adversas reduce de manera significativa el carácter “vinoso” mientras que lo hace ligeramente sobre el “disolvente”.

Finalmente, fluquinconazol parece afectar gravemente la formación de ésteres, mientras que no presenta efecto sobre la oxidación lipídica.

El principio activo kresoxim-metil incrementa la contribuciones sensoriales “frutal”, “floral” y “aroma a rosa” en ambos tratamientos. Por otro lado disminuye las correspondientes a “graso” y “vinoso”, siendo esta disminución menos acusada en los vinos CPA. Finalmente los vinos BPA tienen mayor contribución del descriptor “disolvente”.

Por todo ello puede considerarse que kresoxim-metil presenta efecto a todos los niveles: fermentativo, glicosídico y de oxidación de los lípidos.

Quinoxifen no afecta al aroma “floral” de los vinos bajo ninguna de las aplicaciones llevadas a cabo (BPA y CPA). Usado bajo BPA disminuye el carácter “graso” pero aumenta todos los demás descriptores, en especial el “disolvente”. Por otra parte, cuando este principio activo es usado bajo CPA disminuye los caracteres “graso” y “vinoso”.

Estos efectos sobre el aroma del vino pueden deberse al efecto que quinoxifen tiene sobre la fermentación alcohólica y sobre la actividad de las lipoxigenasas aunque no parece afectar a la actividad glicosidásica.

Trifloxistrobin es el fungicida que más diferencias sensoriales produce respecto al vino control tanto en BPA como en CPA. En el primer caso todos los descriptores están potenciados a excepción del carácter “graso”, mientras que en condiciones adversas el vino es más floral” y menos “graso” y “vinoso”. Al igual que ocurre con famoxadona y kresoxim-metil, este fungicida tiene efecto sobre la fermentación alcohólica, la actividad glicosidásica y la oxidación de los lípidos.

#### **6.4.3. Influencia de los fungicidas en el contenido de ácidos orgánicos**

En las Tablas 6.11. y 6.12. se exponen los contenidos de los ácidos orgánicos estudiados para los vinos obtenidos de uvas tratadas bajo ensayos BPA y CPA respectivamente.

Como se observa en la Tabla 6.11., se producen diferencias significativas frente al vino control (sin tratamiento con fungicidas) para los vinos obtenidos con uvas tratadas con kresoxim-metil y famoxadona, produciendo un aumento de la concentración de ácido málico. Por otra parte, también existen diferencias significativas para el vino obtenido en el ensayo con fenhexamida, en donde se produce una disminución del ácido succínico.

Según los valores expuesto en la Tabla 6.12. se observa que se producen diferencias significativas entre los vinos procedentes de las uvas tratadas con quinoxifen y fluquinconazol frente al vino control para el ácido cítrico, produciéndose un aumento de éste. También, para el ácido succínico se encuentran diferencias significativas en los vinos correspondientes a los ensayos de fluquinconazol y fenhexamida, en ambos casos se produce una disminución en su contenido. Finalmente, se observa una disminución del ácido tartárico que produce una diferencia significativa frente al vino control para el ensayo con quinoxifen.

Por último en la Tabla 6.13. se exponen las diferencias significativas encontradas al comparar los vinos obtenidos de uvas tratadas bajo BPA y CPA con cada uno de los fungicidas estudiados. Se observa que cuando se compara el mismo fungicida en cada tratamiento los resultados indican que la mayor o menor concentración inicial de las uvas no influye en la fracción ácida de los vinos obtenidos, excepto para fluquinconazol y famoxadona. En el primero de ellos se producen diferencias significativas para los ácidos cítrico, succínico y tartárico, y solamente para málico en el segundo caso.

Cuando se tratan estadísticamente los datos de los vinos con todos los fungicidas, se observa que fluquinconazol tratado bajo CPA muestra diferencias significativas con el resto de los vinos que contienen los demás fungicidas. Esto mismo ocurre pero con menor incidencia para los cinco fungicidas restantes. Por lo tanto, la naturaleza del fungicida parece influir en la concentración final de los ácidos. En general, los valores finales de los ácidos estudiados se encuentran en la mayoría de los casos en niveles típicos de los vinos de calidad de la D.O. Jumilla, por lo que podemos pensar que los tratamientos con los fungicidas estudiados, aunque muestren diferencias significativas, no afectan a la calidad final de los vinos.

Tabla 6.11.- Contenido en ácidos orgánicos ( $X \pm DS$  g/L) para los vinos obtenidos en los ensayos con BPA.

Ácidos	Control	Famox <sup>(1)</sup>	Fenhex <sup>(2)</sup>	Fluquin <sup>(3)</sup>	Kresox <sup>(4)</sup>	Quinox <sup>(5)</sup>	Triflox <sup>(6)</sup>	G.S.
Málico	0,05±0,01	0,28±0,29*	0,06±0,01	0,02±0,02	0,22±0,18*	0,07±0,03	0,10±0,03	(1),(4)
Cítrico	0,11±0,05	0,15±0,21	0,42±0,23	0,42±0,35	0,58±0,71	0,63±0,69	0,67±0,37	
Succínico	0,91±0,08	0,73±0,04	0,46±0,04**	0,72±0,20	0,85±0,12	1,04±0,22	0,95±0,04	(2)
Tartárico	5,68±0,25	5,81±0,47	5,95±0,11	6,02±0,08	5,33±0,76	5,52±0,04	5,36±0,30	

G.S. Grado de significación: \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$

Tabla 6.12.- Contenido en ácidos orgánicos ( $X \pm DS$  g/L) para los vinos obtenidos en los ensayos con CPA.

Ácidos	Control	Famox <sup>(1)</sup>	Fenhex <sup>(2)</sup>	Fluquin <sup>(3)</sup>	Kresox <sup>(4)</sup>	Quinox <sup>(5)</sup>	Triflox <sup>(6)</sup>	G.S.
Málico	0,05±0,01	0,06±0,00	0,05±0,03	0,05±0,01	0,08±0,02	0,11±0,01	0,05±0,01	
Cítrico	0,11±0,05	0,06±0,07	0,27±0,17	1,64±0,35**	0,58±0,51	1,34±0,66*	0,30±0,30	(3),(5)
Succínico	0,91±0,08	0,77±0,13	0,47±0,13**	0,22±0,21***	0,79±0,16	0,95±0,06	0,91±0,08	(2),(2)
Tartárico	5,68±0,25	5,25±0,19	6,00±0,29	5,07±0,57	5,43±0,50	4,76±0,61*	5,63±0,24	(5)

G.S. Grado de significación: \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$

Tabla 6.13.- Diferencias significativas entre tratamientos con los fungicidas estudiados bajo BPA y CPA.

Ensayo	CPA					
	Famox	Fenhex	Fluquin	Kresox	Quinox	Triflox
BPA						
Famox	M*	M* S*	M* C** S**		C* T*	M*
Fenhex	S*		C*	S*	C* S** T*	S**
Fluquin			C* S** T*		C* T**	
Kresox		S*	C* S***			
Quinox		S***	C* S***			
Triflox		S**	C* S***			

C: Cítrico; M: Máfico; S: Succínico; T: Tartárico; \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$



## **RESUMEN Y CONCLUSIONES**



## 7. RESUMEN Y CONCLUSIONES

### 7.1. ESTUDIO 1.- DISIPACIÓN DE LOS FUNGICIDAS

a) La determinación de los seis fungicidas estudiados se realizó por: HPLC-DAD para famoxadona; CL-MS/MS para fenhexamida; CG-ECD para fluquinconazol; y por último CG-MS/MS para kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin. La extracción de sus residuos se llevó a cabo mediante una microextracción on-line con acetona y una mezcla de acetato de etilo/hexano, en el caso de fluquinconazol y famoxadona; y con el método QuEChERS para el resto. A partir de los resultados obtenidos de su validación, se puede concluir que la metodología desarrollada, es suficientemente precisa, sensible y exacta para el propósito perseguido. Cumple los requisitos establecidos en la guía SANCO (linealidad, precisión y exactitud) para los rangos seleccionados: 0,05-0,2 mg/kg para fluquinconazol y trifloxistrobin, y 0,01-0,2 mg/kg para el resto de fungicidas ensayados. Presenta rangos de trabajo suficientemente amplios para abarcar los niveles de residuos encontrados; y por tanto, se puede considerar suficientemente eficaz y robusta para alcanzar el objetivo propuesto con los seis principios activos estudiados.

b) En la experiencia realizada bajo condiciones de BPA, los residuos de los seis fungicidas ensayados no superaron durante el proceso de vinificación, en ningún caso, los LMRs establecidos para uva, por la Comisión Europea. Para los ensayos de kresoxim-metil y trifloxistrobin los contenidos en uva de los mismos eran inferiores al límite de cuantificación. Solamente, para los ensayos con famoxadona y fenhexamida quedan residuos cuantificables en el vino.

c) En las aplicaciones fitosanitarias críticas (CPA), únicamente fluquinconazol superó los LMRs en uva.

d) Tanto en las experiencias llevadas a cabo bajo BPA como en las desarrolladas bajo condiciones críticas, los fungicidas ensayados muestran una acumulación mayoritaria en los orujos. Asimismo, un punto importante en la disipación de estos principios activos es el proceso fermentativo. Destacando aquí

el caso de fenhexamida debido a que, bajo ambas modalidades de aplicación, la cantidad de fungicida eliminada durante la fermentación supera a la arrastrada por los orujos.

e) A partir de los resultados obtenidos en la disipación de los fungicidas, y en función del proceso enotécnico, se observa que la mayor eliminación se produce unida a los subproductos sólidos obtenidos durante la vinificación, siguiendo el presente orden de concentración: orujo > lías > heces. Cabe mencionar aquí una sola excepción; en la vinificación de las uvas tratadas con fenhexamida bajo CPA, las heces arrastran más fungicida que los orujos.

f) Mediante el trasiego la concentración de fungicida encontrado en las lías supone menos de la mitad del que queda en los vinos trasegados, excepto para famoxadona donde se reparte en torno al 50%, y quinoxifen donde más del 80% del fungicida remanente se elimina unido a las lías.

g) En lo que respecta a clarificación y filtración, el contenido en fungicidas apenas sufre alteración durante estos procesos enotécnicos.

h) En general, todos los fungicidas estudiados tienen una dinámica de eliminación muy similar, excepto fenhexamida. También, de los datos obtenidos se demuestra que los distintos procesos enotécnicos tienen una gran influencia en la eliminación de los mismos.

## 7.2. ESTUDIO 2.- EFECTO SOBRE LAS LEVADURAS

a) La aplicación, a concentraciones equivalentes a sus dosis BPA, de famoxadona, fluquinconazol, quinoxifen y trifloxistrobin produce un efecto negativo sobre el crecimiento en medio líquido de las levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* más representativas, aunque no implica la inhibición total del crecimiento.

b) Los ensayos *in vitro* en medio sólido, no muestran inhibición del crecimiento en casi la totalidad de los casos, sólo para kresoxim-metil y a una concentración muy superior a la encontrada en campo se produce efecto inhibitorio sobre *Hanseniaspora uvarum*, lo que indica la posibilidad de un mecanismo de adaptación de estas levaduras a los distintos principios activos estudiados.

c) Ningún fungicida en condiciones de campo (BPA o CPA) inhibe la fermentación ni producen retrasos en la misma, ya que los recuentos encontrados en las muestras tratadas no son, en ningún caso, inferiores a los encontrados en el control (sin tratamiento fitosanitario).

d) En uva, la tipificación de la flora no *Saccharomyces* muestra variaciones en las especies identificadas en función del año de vendimia. Destaca la ausencia de *Hanseniaspora uvarum*, identificada por otros autores, y la presencia de dos especies, *Clavispora lusitaniae* y *Metschnikowia pulcherrima*, que aparecen en todas las parcelas y bajo todos tratamientos.

e) En uva, la tipificación de la flora *Saccharomyces* revela la ausencia de especies de este género en todas las muestras correspondientes al primer año de vendimia, así como la presencia de *S. bayanus* en todas las parcelas y bajo todos tratamientos durante el segundo año de vendimia en porcentajes parecidos.

f) A lo largo de las vinificaciones, tanto espontáneas como inoculadas con LSA, la tipificación de la flora no *Saccharomyces* muestra un descenso en la presencia y variabilidad de estas especies frente a las del género *Saccharomyces*, hasta desaparecer totalmente en las muestras de mosto II y vino.

g) Durante las vinificaciones con fermentación espontánea, la tipificación de la flora *Saccharomyces* revela la presencia de *S. cerevisiae* en todos los ensayos. Asimismo, dentro del grupo *Saccharomyces sensu stricto*, se identifican dos especies: *S. paradoxus*, que aparece en todas las parcelas tratadas excepto en el caso de famoxadona y *S. bayanus*, esta última presente en las muestras tratadas con fenhexamida bajo BPA y trifloxistrobin bajo CPA respectivamente. Dentro del grupo *Saccharomyces sensu lato*, por su parte, solamente se identifica *S. servazzii* en las muestras control sin adición de LSA correspondientes al segundo año de ensayos.

h) Durante las vinificaciones inoculadas con LSA, la tipificación de la flora *Saccharomyces* revela la presencia de *S. bayanus* en todos los ensayos, así como la convivencia de *S. bayanus* y *S. cerevisiae* en el control y en las muestras tratadas con fenhexamida, quinoxifen y trifloxistrobin. *S. paradoxus*, por su parte, sólo se identificó en las muestras control.

i) La evolución de las poblaciones encontrada durante el proceso de vinificación, tanto en fermentaciones espontáneas como en aquellas desarrolladas con adición de LSA, se ajusta a la secuencia normal de especies. De esta forma, en la uva y en las primeras fases de la fermentación, el predominio corresponde a las especies no *Saccharomyces*, que serán gradualmente sustituidas por especies del género *Saccharomyces* de mayor poder fermentativo y mayor tolerancia al etanol. *Saccharomyces cerevisiae* fue la especie dominante en las últimas etapas de la vinificación en todas las muestras y bajo todos los tratamientos ensayados durante el primer año, mientras que en el segundo año las últimas fases de la fermentación estuvieron dominadas por *S. bayanus* o por poblaciones conjuntas de *S. bayanus* y *S. cerevisiae*, aunque el porcentaje poblacional de *S. bayanus* siempre fue mayor. No se observa, por tanto, una influencia determinante de los tratamientos sobre la flora levaduriforme.

### 7.3. ESTUDIO 3.- INFLUENCIA SOBRE LA CALIDAD ORGANOLÉPTICA

a) El perfil fenólico de los vinos procedentes de uvas tratadas, tanto bajo BPA como en condiciones adversas, muestra diferencias significativas respecto al vino control cuando la vinificación se lleva a cabo con levaduras autóctonas. No obstante, ninguno de los tratamientos afecta significativamente a la intensidad colorante de los vinos. Los resultados muestran que no existe correlación entre la cantidad de fungicida presente en la uva o el vino y los valores de los índices y compuestos estudiados. De igual forma, tampoco existe esta correlación para el contenido en compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

b) Los ensayos llevados a cabo con adición de LSA y tratamiento fitosanitario bajo CPA, muestran que famoxadona, fenhexamida y trifloxistrobin provocan una disminución en los antocianos totales, lo cual puede producir una pérdida de intensidad colorante. Asimismo, la presencia de famoxadona y kresoxim-metil induce una pérdida de copigmentación derivada de su influencia sobre el contenido en flavonoles. Finalmente, todos los fungicidas ensayados a excepción de quinoxifen disminuyen el contenido en trans-resveratrol de los vinos; hecho este que supone un descenso en su capacidad antioxidante. A pesar de ello, los resultados obtenidos se encuentran en el rango de valores normales en

vinos tintos de *Monastrell* y, por tanto, no debemos desaconsejar de forma taxativa el uso de estos fungicidas.

c) Todos los fungicidas empleados en este estudio afectan al contenido aromático de los vinos, que repercute a nivel sensorial tanto si se usan bajo BPA como CPA. Este hecho puede ser debido más que al efecto sobre la actividad fermentativa de las levaduras, a la acción sobre su actividad glicosidásica, ya que ésta puede influir sobre la transformación de los terpenoides desde formas no olorosas a odorantes y a la actividad oxidativa sobre los lípidos. Obviamente el aroma final del vino es el resultado de un equilibrio entre sus distintos componentes aromáticos; así, si suponemos que el mejor aroma es aquel que, respecto al control, disminuye moderadamente el carácter vinoso, graso, disolvente y herbáceo, y aumenta el frutal, floral y aroma a rosa, podríamos afirmar que los tratamientos con fluquinconazol y fenhexamida son los que proporcionan las mejores características.

d) En lo que se refiere a la fracción ácida de los vinos, los valores finales de los ácidos se encuentran en la mayoría de los casos en niveles típicos de los vinos de calidad de la D.O. Jumilla, por lo que podemos pensar que los tratamientos con estos fungicidas, aunque muestren diferencias significativas, no afectan a la calidad final de los vinos.

e) Aunque existen diferencias significativas desde el punto de vista analítico, tanto para compuestos fenólicos y aromáticos como para los ácidos orgánicos; los valores absolutos de cada compuesto o índice se encuentran dentro de los niveles típicos de vinos de calidad de la D.O. Jumilla.



## **BIBLIOGRAFÍA**



## 8. BIBLIOGRAFÍA

Abbas CA. Production of antioxidants, aromas, colours, flavours and vitamins by yeasts. En: Querol A, Fleet G, editores. Yeasts in food and beverages Berlin: Springer; 2006. p. 285-334.

Abreu SD, Caboni P, Pirisi FM, Cabras P, Alves A, Garau VL. Residues of the fungicide famoxadone in grapes and its fate during wine production. Food Addit Contam 2006; 23 (3): 289-294.

Ahearn DG, McGlohn MS. *In vitro* susceptibilities of sucrose-negative *Candida tropicalis*, *Candida lusitanae* and *Candida norvegensis* to amphotericin-B, 5-fluorocytosine, miconazole and ketoconazole. J Clin Microbiol 1984; 19 (3): 412-416.

Albergaria H, Francisco D, Gori K, Arneborg N, Girio F. *Saccharomyces cerevisiae* CCMI 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. Appl Microbiol Biotechnol 2010; 86 (3): 965-972.

Alonso JE, Cardell E, Salvadores C. Investigación de levaduras vínicas en la D.O. Ycoden-Daute-Isora. Caracterización de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* mediante análisis de restricción del ADN mitocondrial. XVI Jornadas de Viticultura y Enología de Tierra de Barros. Almendralejo (Badajoz). 1994: 321-328.

Alonso-Allende A. Análisis de residuos de pesticidas en vinos. Quim e Ind 1981; 27 (2): 103-105.

Amerine MA, Wagner RM. The wine and its environment. En: University of California Press, editor. The book of California Wine Berkeley. California: University of California Press; 1984. p. 86-120.

Amerine MA, Cruess S. Análisis de vinos y mostos. Zaragoza: Acribia; 1960.

Amerine MA, Kunkee RE. Microbiology of winemaking. Ann Rev Microbiol 1968; 22: 323-358.

Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *J AOAC Int* 2003; 86 (2): 412-431.

Anastassiades M, Tasdelen B, Scherbaum E, Stajnbaher D. Recent developments in QuEChERS methodology for pesticide multiresidue analysis. En: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW, editores. *Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*. 1ª ed. Germany: Wiley-VCH; 2007. p. 439-458.

Anderson RJ, Clapperton JF, Craab D, Hudson RJ. Dimetil sulphide as feature of larger flavour. *J Inst Brew* 1975; (81): 208-213.

Andorrà I, Berradre M, Rozès N, Mas A, Guillamón JM, Esteve-Zarzoso B. Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *Eur Food Res Technol* 2010; 231 (2): 215-224.

Andorrà I, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM, Mas A. Determination of viable wine yeast using DNA binding dyes and quantitative PCR. *Int J Food Microbiol* 2010a; 144 (2): 257-262.

Andrews JH, Berbee FM, Nordheim EV. Microbial antagonism to the imperfect stage of the apple scab pathogen, *Ventura inaequalis*. *Phytopathol* 1983; 73 (2): 228-234.

Angioni A, Garau VL, Aguilera A, Melis M, Minelli EV, Tuberoso C. GC-ITMS determination and degradation of captan during winemaking. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (23): 6761-6766.

Angulo L, Lema Costas C, López Rubio JE. Influence of viticultural and enological practices on the development of yeast populations during winemaking. *Am J Enol Vitic* 1993; 44 (4): 405-408.

Antón MA. Utilización del análisis del ciclo de vida en la evaluación del impacto ambiental del cultivo bajo invernadero mediterráneo. Barcelona: Universidad Politécnica de Cataluña; 2004.

Antonelli A, Castellari L, Zambonelli C, Carnacini A. Yeast influence on volatile composition of wines. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (3): 1139-1144.

Antonious GF. Residues and half-lives of pyrethrins on field-grown pepper and tomato. *J Environ Sci Health B* 2004; 39 (4): 491-503.

Antonious GF, Snyder JC. Residues and half-lives of acephate, methamidophos, and pirimiphos-methyl in leaves and fruit of greenhouse-grown tomatoes. *B Environ Contam Tox* 1994; 52 (1): 141-148.

Antunovics Z, Csoma H, Sipiczki M. Molecular and genetic analysis of the yeast flora of botrytized Tokaj wines. *Bull OIV* 2003; 76 (867-868): 381-397.

Antunovics Z, Irinyi L, Sipiczki M. Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *J Appl Microbiol* 2005; 98 (4): 971-979.

Arendt EK, Ryan Liam AM, Dal Bello F. Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiol* 2007; 24 (2): 165-174.

Arévalo M, Úbeda J, Gundllapallib S, Cordero R, Briones A. Characterization of an exocellular  $\beta$ -glucosidase from *Debaryomyces pseudopolymorphus*. *Enzyme Microb Technol* 2006; 39 (2): 229-234.

Arias CR, Burns JK, Friedrich LM, Goodrich RM, Parish ME. Yeast species associated with orange juice: Evaluation of different identification methods. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68 (4): 1955-1961.

Arlorio M, Coisson JD, Martelli A. Identification of *Saccharomyces cerevisiae* in bakery products by PCR amplification of the ITS region of ribosomal DNA. *Eur Food Res Technol* 1999; 209 (3-4): 185-191.

Arroyo V. Agentes de fermentación y crianza de los mostos y vinos de Montilla y los Moriles. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1962.

Aubert C, Baumes R, Günata Z, Lepoutre JP, Cooper JF, Bayonove C. Effects of sterol biosynthesis inhibiting fungicides on the aroma of grape. *Sci Des Aliments* 1998; 18: 41-58.

Aubert C, Baumes R, Günata Z, Lepoutre JP, Cooper JF, Bayonove C. Effects of flusilazole, a sterol biosynthesis inhibitor fungicide, on the free and bound aroma fraction of Muscat of Alexandria wines. *J Int Sci Vigne Vin* 1997; 31 (2): 57-64.

Baffi MA, Bezerra C, Arévalo-Villena M, Briones-Pérez AI, Gomes E, Da Silva R. Isolation and molecular identification of wine yeasts from a Brazilian vineyard. *Ann Microbiol* 2011; 61 (1): 75-78.

Baranyi J, Roberts TA. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol* 1994; 23 (3-4): 277-294.

Barbosa C, Falco V, Mendes-Faia A, Mendes-Ferreira A. Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *J Bios Bioeng* 2009; 108 (2): 99-104.

Barcenilla JM. Influencia de las levaduras sobre polifenoles, polialcoholes, y azúcares en los procesos de fermentación y conservación de vinos blancos. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1990.

Barnett JA. The taxonomy of the genus *Saccharomyces meyen ex reess*: A short review for non-taxonomists. *Yeast* 1992; 8 (1): 1-23.

Barnett JA. Selection of test for identifying yeast. *Nature New Biology*. 1971; 232: 221-223.

Barnett JA, Payne RW, Yarrow D. *Yeasts: characteristics and identification*. Cambridge: Cambridge University Press.; 1990.

Barns SM, Lane DJ, Sogin ML, Bibeau C, Weisburg WG. Evolutionary relationships among pathogenic *Candida* species and relatives. *J Bacteriol* 1991; 173 (7): 2250-2255.

Barre P, Blondin B, Dequin S, Feuillat M, Sablayrolles JM, Salmon JM. La levadura de fermentación alcohólica. En: Claude Flanzy, editor. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. 1ª ed. Madrid: AMV-Mundi-Prensa; 2000. p. 274-322.

Bascones MD. Agentes de fermentación de los mostos de la Denominación de Origen Jumilla. Estudio del efecto Killer sobre los agentes fermentativos aislados. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1981.

Bau M, Bragulat MR, Abarca ML, Minguez S, Cabanes FJ. Ochratoxigenic species from Spanish wine grapes. *Int J Food Microbiol* 2005; 98 (2): 125-130.

Bautista-Ortín AB, Romero-Cascales I, Fernández-Fernández JL, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. Influence of the yeast strain on *Monastrell* wine colour. *Inn Food Sci Emerg Technol* 2007; 8 (3): 322-328.

Beech FW, Davenport RR, Goswell RW, Burnett JK. part B. Identification methods for microbiologist. London: Academic Press.; 1968. p. 151-175.

Bejaoui H, Mathieu F, Taillandier P, Lebrihi A. Black aspergilli and ochratoxin A production in French vineyards *Int J Food Microbiol* 2006; 111: S46-S52.

Bencheqroun SK, Baji M, Massart S, Labhilili M, El Jaafari S, Jijakli MH. *In vitro* and *in situ* study of postharvest apple blue mold biocontrol by *Aureobasidium pullulans*: Evidence for the involvement of competition for nutrients. *Post Biol Technol* 2007; 46 (2): 128-135.

Benito S, Morata A, Palomero F, González MC, Suárez-Lepe JA. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in red wines produced following different fermentation strategies. *Food Chem* 2011; 124 (1):15-23.

Benito S, Palomero F, Morata A, Uthurry C, Suárez-Lepe JA. Minimization of ethylphenol precursors in red wines via the formation of pyranoanthocyanins by selected yeasts. *Int J Food Microbiol* 2009; 132 (2-3): 145-152.

Berbee ML, Taylor JW. Ascomycete relationships: dating the origin of asexual lineages with 18S ribosomal-RNA gene sequence data. En: Reynolds D.R. & Taylor J.W., editores. *The Fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics* Wallingford: CAB International; 1993. p. 67-78.

Bertrand A. Influence de la maturation de la vendage sur la teneur en substances volatiles des vins. *Conn Vigne Vin* 1980; (3): 203-205.

Bessey EA. *Morphology and Taxonomy of Fungi*. Philadelphia: Blakiston Co; 1950.

Beulke S, Brown CD. Evaluation of methods to derive pesticide degradation parameters for regulatory modelling. *Biol Fertil Soils* 2001; 33 (6): 558-564.

Biely P, Heinrichova K, Kruzikova M. Induction and inducers of the pectolytic system in *Aureobasidium pullulans*. *Current Microbiol* 1996; 33 (1): 6-10.

Blakeman JP, Fokkema NJ. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathol* 1982; 20: 167-192.

Blanco P, Orriols I, Losada A. Survival of commercial yeasts in the winery environment and their prevalence during spontaneous fermentations. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011; 38 (1): 235-239.

Blanco P, Ramilo A, Cerdeira M, Orriols I. Genetic diversity of wine *Saccharomyces cerevisiae* strains in an experimental winery from Galicia (NW Spain). *Antonie van Leeuwenhoek* 2006; 89 (3-4): 351-357.

Blanco P, Sieiro C, Villa TG. Production of pectic enzymes in yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 175 (1):1-9.

Bleve G, Grieco F, Cozzi G, Logrieco A, Visconti A. Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *Int J Food Microbiol* 2006; 108 (2): 204-209.

Blinkhorn RJ, Adelstein D, Spagnuolo PJ. Emergence of a new opportunistic pathogen, *Candida lusitanae*. *J Clin Microbiol* 1989; 27 (2): 236-240.

Boccas F, Roussos S, Gutierrez M, Serrano L, Viniegra GG. Production of pectinase from coffee pulp in solid-state fermentation system: selection of wild fungal isolate of high potency by a simple 3-step screening technique. *J Food Sci Technol* 1994; 31 (1): 22-26.

Boivin S, Feuillat M, Alexandre H, Charpentier C. Effect of must turbidity on cell wall porosity and macromolecule excretion of *Saccharomyces cerevisiae* cultivated on grape juice. *Am J Enol Vitic* 1998; 49 (3): 325-332.

Bollinger DW, Tsunoda A, Ledoux DR, Ellersieck MR, Veum TL. A Comparison of the Test Tube and the Dialysis Tubing in Vitro Methods for Estimating the Bioavailability of Phosphorus in Feed Ingredients for Swine. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (9): 3287-3294.

Boulton RB, Singleton VL, Bisson LF, Kunkel RE. *Teoría y práctica de la elaboración del vino*. Zaragoza.: Acribia S.A.; 2002.

Brefeld O. Fortsetzung der Schimmelpilze, Heft 4. En: Arthur Felix, editor. *Botanische Untersuchungen über Hefenpilze: Die Brandpilze*. Leipzig: Arthur Felix; 1881. p. 1-191.

Brezna B, Zenisova K, Chovanova K, Chebenova V, Krakova L, Kuchta T, *et al.* Evaluation of fungal and yeast diversity in Slovakian wine-related microbial communities. *Antonie van Leeuwenhoek* 2010; 98 (4): 519-529.

Brouwer DH, deHaan M, Leenheers LH, deVreede SAF, VanHemmen JJ. Half-lives of pesticides on greenhouse crops. *B Environ Contam Tox* 1997; 58 (6): 976-984.

Buzzini P, Rossi J. Semi-continuous and continuous riboflavin production by calcium-alginate-immobilized *Candida tropicalis* in concentrated rectified grape must. *World J Microbiol Biotechnol* 1998; 14 (3): 377-381.

CARM Estadísticas Agrícolas: Producciones. In: Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Consejería de Agricultura y Agua, editor. Estadística Agraria Regional Murcia: Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. Consejería de Agricultura y Agua; 2011.

CARM Orden de 3 de Diciembre de 2003, de la Consejería de Agricultura, Agua y Medio Ambiente, por la que se aprueba el Código de Buenas Prácticas Agrarias de la Región de Murcia. Murcia: CARM Boletín Oficial de la Región de Murcia. Edición 286; 2003.

Cabras P, Angioni A. Pesticide residues in grapes, wine and their processing products. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (4): 967-973.

Cabras P, Angioni A, Garau VL, Melis M, Pirisi FM, Cabitza F, *et al.* Pesticide residues in raisin processing. *J Agric Food Chem* 1998a; 46 (6): 2309-2311.

Cabras P, Angioni A, Garau VL, Melis M, Pirisi FM, Farris GA, *et al.* Persistence and metabolism of folpet in grapes and wine. *J Agric Food Chem* 1997a; 45 (2): 476-479.

Cabras P, Angioni A, Garau VL, Melis M, Pirisi FM, Minelli E, *et al.* Fate of some new fungicides (Cyprodinil, Fludioxonil, Pyrimethanil, and Tebuconazole) from vine to wine. *J Agric Food Chem* 1997; 45 (7): 2708-2710.

Cabras P, Angioni A, Garau VL, Pirisi FM, Brandolini V. Gas chromatographic determination of azoxystrobin, fluazinam, kresoxim-methyl, mepanipirim, and tetraconazole in grapes, must, and wine. *J Assoc Off Anal Chem International* 1998; 81 (6): 1185-1189.

Cabras P, Angioni A, Garau VL, Pirisi FM, Cabitza F, Pala M, *et al.* Fenhexamid residues in grapes and wine. *Food Addit Contam* 2001; 18 (7): 625-629.

Cabras P, Angioni A, Garau VL, Pirisi FM, Cabitza F, Pala M, *et al.* Fate of Quinoxifen residues in grapes, wine, and their processing products. *J Agric Food Chem* 2000; 48 (12): 6128-6131.

Cabras P, Angioni A, Garau VL, Pirisi FM, Espinoza J, Mendoza A, *et al.* Fate of Azoxystrobin, Fluazinam, Kresoxim-methyl, Mepanipyrim and Tetraconazole from vine to wine. *J Agric Food Chem* 1998a; 46 (8): 3249-3251.

Cabras P, Angioni A, Garau VL, Pirisi FM, Farris GA, Madau G, *et al.* Pesticides in fermentative processes of wine. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (9): 3854-3857.

Cabras P, Garau VL, Melis M, Pirisi FM, Cubeddu M, Cabitza F. Residui di dimetoaro e clorpirifos nell'uva e nel vino. *Atti Giornate Fitopatol* 1994; 1: 27-32.

Cabras P, Meloni M, Melis M, Farris GA, Budroni M, Satta T. Interactions between lactic bacteria and fungicides during lactic fermentation. *J Wine Res* 1994a; 5 (1): 53-59.

Cabras P, Meloni M, Pirisi FM. Pesticide fate from vine to wine. *Rev Environ Contam Toxicol* 1987; 99: 83-117.

Cabras P, Meloni M, Pirisi FM, Lalli MG. Riduzione di alcuni fungicidi durante il processo di vinificazione. *L'Enotecnico* 1986; 22: 1219-1226.

Cabras P, Farris GA, Fiori MG, Pusino A. Interaction between fenhexamid and yeasts during the alcoholic fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (17): 5012-5015.

Cabrera MJ, Moreno J, Ortega JM, Medina M. Formation of ethanol, higher alcohols, esters and terpenes by five yeast strains in must from Pedro Ximénez grapes in various degrees of ripeness. *Am J Enol Vitic* 1988; 39 (4): 283-287.

Cadez N, Zupan J, Raspor P. The effect of fungicides on yeast communities associated with grape berries. *FEMS Yeast Res* 2010; 10 (5): 619-630.

Cain RF. Evolution of the fungi. *Mycologia* 1972; 64 (1):1-14.

Caldentey P. Formación de compuestos sulfurados volátiles durante la fermentación alcohólica. *Vitivinicultura* 1992 (40): 11-12.

Calhelha RC, Andrade JV, Ferreira IC, Estevinho LM. Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process. *Food Microbiol* 2006; 23 (4): 393-398.

Callejon RM, Clavijo A, Ortigueira P, Troncoso AM, Paneque P, Morales ML. Volatile and sensory profile of organic red wines produced by different selected autochthonous and commercial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Anal Chim Acta* 2009; 660 (1-2): 68-75.

Cansado J, Longo E, Agrelo D, Villa TG. Levaduras asociadas a procesos de fermentación espontánea en vinos de Ribeiro. Análisis del homo/heterotalismo y sistema Killer de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiologia Sem* 1989; 5: 79-88.

Capece A, Fiore C, Maraz A, Romano P. Molecular and technological approaches to evaluate strain biodiversity in *Hanseniaspora uvarum* of wine origin. *J Appl Microbiol* 2005; 98 (1): 136-144.

Caridi A. New perspectives in safety and quality enhancement of wine through selection of yeasts based on the parietal adsorption activity. *Int J Food Microbiol* 2007; 120 (1-2): 167-172.

Caridi A. Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek* 2006; 89 (3-4): 417-422.

Caridi A, Sidari R, Solieri L, Cufari A, Giudici P. Wine colour adsorption phenotype: an inheritable quantitative trait loci of yeasts. *J Appl Microbiol* 2007; 103 (3): 735-742.

Carrau F, Medina K, Fariña L, Boido E, Dellacassa E. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* inoculum size on wine fermentation aroma compounds and its relation with assimilable nitrogen content. *Int J Food Microbiol* 2010; 143 (1-2): 81-85.

Carrau FM, Medina K, Boido E, Farina L, Gaggero C, Dellacassa E, *et al.* De novo synthesis of monoterpenes by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 243 (1): 107-115.

Carrero JM. Lucha Integrada Contra las Plagas Agrícolas y Forestales. 1ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 1996.

Carrero JM, Planes S. Plagas del campo. 1ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 1989.

Carvalho F, Roseiro JC, Girio FM. Interactive effects of sodium chloride and heat shock on trehalose accumulation and glycerol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* 1999; 16 (6): 543-550.

Castellari L, Ferruzzi M, Magrini A, Giudici P, Passarelli P, Zambonelli C. Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis* 1994; 33 (1): 49-52.

Castelli T, Íñigo B. Los agentes de la fermentación vínica en la región Manchega y zonas limítrofes. *Ann Fac Agr. Universita di Perugia* 1957; 3.

Castino M. Lieviti e polifenoli. *Riv Vitic Enol* 1982; 34: 333-348.

Castoria R, De Curtis F, Lima G, Caputo L, Pacifico S, De Cicco V. *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. *Post Biol Technol* 2001; 22 (1): 7-17.

Cavaza A, Grando MS, Zini C. Rilevazione della flora microbica di mosti e vini. *Vigne-Vini* 1992; 11 (9): 17-20.

Cedron MT. Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen. La Rioja: Universidad de La Rioja; 2004.

Celik S, Kunc S, Asan T. Degradation of some pesticides in the field and effect of processing. *Analyst* 1995; 120 (6): 1739-1743.

Chamberlain G, Husnik J, Subden RE. Freeze—desiccation survival in wild yeasts in the bloom of icewine grapes. *Food Res Int* 1997; 30 (6): 435-439.

Charoenchai C, Fleet G, Henschke P, Todd B. Screening of non-*Saccharomyces* wine yeasts for the presence of extracellular hydrolytic enzymes. *Aust J Grape Wine Res* 1997; 3 (1): 2-8.

Chatonnet P, Dubourdieu D, Boidron JN. Incidence des conditions de fermentation et d'élevage des vins blancs secs en barriques sur leur composition en substances cédées par le bois de chêne. *Sci Aliments* 1992; 12: 665-685.

Chavan P, Mane S, Kulkarni G, Shaikh S, Ghormade V, Nerkar DP, *et al.* Isolation and characterization of natural yeast flora of different varieties of grapes used for wine making in India. *Food Microbiol* 2009; 26 (8): 801-808.

Chaves-Lopez C, Serio A, Osorio-Cadavid E, Paparella A, Suzzi G. Volatile compounds produced in wine by Colombian wild *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Ann Microbiol* 2009; 59 (4): 733-740.

Cheraiti N, Guezenec S, Salmon JM. Redox interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in mixed culture under enological conditions. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71 (1): 255-260.

Chi Z, Wang F, Chi Z, Yue L, Liu G, Zhang T. Bioproducts from *Aureobasidium pullulans*, a biotechnologically important yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; 82 (5): 793-804.

Chirivella C, Méndez JV, Haba M, Herrero A. Ecología vitícola varietal: aptitudes enológicas. 1ª ed. Valencia: Consellería d'Agricultura, Pesca i Alimentació; 1995.

Ciani M, Beco L, Comitini F. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. *Int J Food Microbiol* 2006; 108 (2): 239-245.

Ciani M, Comitini F. Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking *Ann Microbiol* 2011; 61 (1): 25-32.

Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P. Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research* 2010; 10 (2): 123-133.

Ciani M, Fatichenti F. Killer Toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a Biopreservative Agent To Control Apiculate Wine Yeasts. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (7): 3058-3063.

Ciani M, Maccarelli F. Oenological properties of non-*Saccharomyces* yeasts associated with wine-making. *World J Microbiol Biotechnol* 1998; 14 (2): 199-203.

Ciani M, Mannazzu I, Marinangeli P, Clementi F, Martini A. Contribution of winery-resident *Saccharomyces cerevisiae* strains to spontaneous grape must fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 2004; 85 (2): 159-164.

Cinar S, Koc AN, Taskapan H, Dogukan A, Tokgoz B, Utas C. Case report. *Candida lusitanae* peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Mycoses* 2002; 45 (3-4): 120-122.

Clavijo A, Calderón IL, Paneque P. Diversity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in three red grape varieties cultured in the *Serranía de Ronda* (Spain) vine-growing region. *Int J Food Microbiol* 2010; 143 (3): 241-245.

Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ, Rodríguez-Vico F. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int J Food Microbiol* 2005; 98 (3): 301-308.

Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Cazorla L, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ, Rodríguez-Vico F. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. *Food Microbiol* 2004 4; 21 (2): 149-155.

Cocolin L, Bisson LF, Mills DA. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 189 (1): 81-87.

Combina M, Daguerre C, Massera A, Mercado L, Sturm ME, Ganga A, *et al.* Yeast identification in grape juice concentrates from Argentina *Let App Microbiol* 2008; 46 (2): 192-197.

Combina M, Elía A, Mercado L, Catania C, Ganga A, Martinez C. Dynamics of indigenous yeast populations during spontaneous fermentation of wines from Mendoza, Argentina. *Int J Food Microbiol* 2005; 99 (3): 237-243.

Combina M, Mercado L, Borgo P, Elia A, Jofre V, Ganga A, *et al.* Yeasts associated to Malbec grape berries from Mendoza, Argentina. *Int J Food Microbiol* 2005a; 98 (5): 1055-1061.

Comitini F, Gobbi M, Domizio P, Romani C, Lencioni L, Mannazzu I, *et al.* Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* 2011; 28 (5): 873-882.

Constantí M, Poblet M, Guillamon JM, Mas A. Seguimiento de poblaciones de microorganismos mediante técnicas de Biología Molecular. Grupos de Investigación Enológica. Jornadas Científicas 96. Ciudad Real. España. 1996.

Constantí M, Poblet M, Arola L, Mas A, Guillamón JM. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *Am J Enol Vitic* 1997; 48 (3): 339-344.

Constantí M, Reguant C, Poblet M, Zamora F, Mas A, Guillamón JM. Molecular analysis of yeast population dynamics: Effect of sulphur dioxide and inoculum on must fermentation. *Int J Food Microbiol* 1998; 41 (3): 169-175.

Cordero-Bueso G, Arroyo T, Serrano A, Tello J, Aporta I, Vélez MD, *et al.* Influence of the farming system and vine variety on yeast communities associated with grape berries. *Int J Food Microbiol* 2011b; 145 (1): 132-139.

Cordero-Bueso G, Arroyo T, Serrano A, Valero E. Influence of different floor management strategies of the vineyard on the natural yeast population associated with grape berries. *Int J Food Microbiol* 2011a; 148 (1): 23-29.

Cordonnier R. Mécanismes et facteurs de formation des composés à saveurs herbacées. *Rev Fran Oenol* 1989; 53:25-27.

Cordonnier R, Bayonove C. Composants varietales et prefermentaires de l'arôme des vins. *Rev Fran Oenol* 1979; 74 (16): 79-90.

Cortés S, Salgado JM, Rivas B, Torrado AM, Domínguez JM. Fermentation kinetics and chemical characterisation of *vino tostado*, a traditional sweet wine from Galicia (NW Spain). *J Sci Food Agric* 2010; 90 (1): 121-131.

Coscollá R. Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. 1ª ed. Madrid: Mundi-Prensa; 1993.

Coscollá R. Polillas del racimo (*Lobesia botrana* Den. y Schiff.). En: Coedición MAPA-Mundi-Prensa, editores. Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada. 3ª ed. Madrid: MAPA-Mundi-Prensa; 1992. p. 29-44.

Costa A, Barata A, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiol* 2008; 25 (2): 422-427.

Csoma H, Sipiczki M. Taxonomic reclassification of *Candida stellata* strains reveals frequent occurrence of *Candida zemplinina* in wine fermentation. *FEMS Yeast Research* 2008; 8 (2): 328-336.

Csoma H, Zakany N, Capece A, Romano P, Sipiczki M. Biological diversity of *Saccharomyces* yeasts of spontaneously fermenting wines in four wine regions: Comparative genotypic and phenotypic analysis. *Int J Food Microbiol* 2010; 140 (2-3): 239-248.

Cuinier C. Influence des levures sur les composés phénoliques du vin. Bull OIV 1988; 61: 596-601.

Cuinier P. La microflore des sols du vignoble. Rev Fran Oenol 1976; 102: 42-49.

Culleré L, Escudero A, Cacho J, Ferreira V. Gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of six premium quality Spanish aged red wines. J Agric Food Chem 2004; 52 (6): 1653-1660.

Cus F, Raspor P. The effect of pyrimethanil on the growth of wine yeasts. Let App Microbiol 2008; 47 (1): 54-59.

Davenport RR. Distribution of yeasts and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. En: Dickinson CH, Preece TF, editores. Microbiology of Aerial Plant Surfaces New York: Academic Press; 1976. p. 325-359.

Davenport RR. Microecology of yeasts and yeast-like organisms associated with an English vineyard. Vitis 1974; 13: 123-130.

De Cormis L. Produits homologués: quelles garanties pour l'elaborateur de vins et les consommateurs? Rev Fran Oenol 1991; 31 (129): 19-23.

de Hoog GS. Evolution of black yeasts: possible adaptation to the human host. Antonie van Leeuwenhoek 1993; 63 (2): 105-109.

de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas of clinical fungi vol. 2. 2<sup>o</sup> ed.: Centraalbureau voor Schimmelcultures and University Rovira i Virgili; 2000.

de Hoog GS, Poonwan N, van den Ende AHGG. Taxonomy of *Exophiala spinifera* and its relationship to *E-jeanselmi*. Stud Mycol 1999a; (43): 133-142.

de Hoog GS, Smith MT, Guého E. *Galactomyces* Readhead & Malloch. En: Kurtzman CP, Fell JW, editores. The Yeasts, a Taxonomic Study. 4<sup>o</sup> ed. Amsterdam: Elsevier; 1998. p. 209-213.

de Hoog GS, Yurlova NA. Conidiogenesis, nutritional physiology and taxonomy of *Aureobasidium* and *Hormonema*. Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 1994; 65 (1): 41-54.

de Hoog GS, Zalar P, Urzi C, de Leo F, Yurlova NA, Sterflinger K. Relationships of dothideaceous black yeasts and meristematic fungi based on 5.8S and ITS2 rDNA sequence comparison. Stud Mycol 1999b; (43): 31-37.

De la Hera, ML. Influencia del riego sobre la calidad de la uva y el vino *Monastrell*. Murcia: Universidad de Murcia; 2002.

De Melo Abreu S, Caboni P, Pirisi FM, Cabras P, Alves A, Garau VL. Residues of the fungicide famoxadone in grapes and its fate during wine production. *Food Addit Contam* 2006; 23 (3): 289-294.

de Melo GV, Ramos CL, Galvao C, Dias ES, Schwan RF. Use of specific PCR primers to identify three important industrial species of *Saccharomyces* genus: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus*. *Let App Microbiol* 2010; 51 (2): 131-137.

Deak T, Beuchat LR. Handbook of Food Spoilage Yeasts. 1<sup>a</sup> ed. New York: CRC Press; 1996.

Delfini C, Cervetti F. Metabolic and technological factors affecting acetic acid production by yeasts during alcoholic fermentation. *Wein-Wiss* 1991; 46: 142-150.

Delfini C, Gaia P, Schellino R, Strano M, Pagliara A, Ambrò S. Fermentability of grape must after inhibition with dimethyl dicarbonate (DMDC). *J Agric Food Chem* 2002; 50 (20): 5605-5611.

Delgado C. El nuevo libro del vino. Madrid: Alianza Editorial S.A.; 1998.

Dellaglio F, Zapparoli G, Malacrino P, Suzzi G, Torriani S. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* succession during spontaneous fermentations of Recioto and Amarone wines. *Ann Microbiol* 2003; 53 (4): 411-425.

Demuyter C, Lollier M, Legras JL, Le Jeune C. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J Appl Microbiol* 2004; 97 (6): 1140-1148.

Demyttenaere JCR, Dagher C, Sandra P, Kallithraka S, Verhé R, De Kimpe N. Flavour analysis of Greek white wine by solid-phase microextraction–capillary gas chromatography–mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2003; 985 (1-2): 233-246.

DG SANCO. SANCO 7525/VI/95 - rev.8: Guidelines on comparability, extrapolation, group tolerances and data requirements for setting MRLs. Appendix D. Bruselas: European Commission; 2008.

DG SANCO. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed Document No. SANCO/10684/2009. Bruselas: European Commission; 2010.

DG SANCO. SANCO 4145/2000. Residue decline in plants. Guidance Document on Risk Assessment for Birds and Mammals Under Council Directive 91/414/EEC. Bruselas: European Commission; 2002.

Di Maro E, Ercolini D, Coppola S. Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *Int J Food Microbiol* 2007; 117 (2): 201-210.

Di Stefano R, Ciolfi G, Delphini C. Composti volatili prodotti dai lieviti. *Riv Vitic Enol* 1981; (34): 342-355.

Diguta CF, Vincent B, Guilloux-Benatier M, Alexandre H, Rousseaux S. PCR ITS-RFLP: A useful method for identifying filamentous fungi isolates on grapes. *Food Microbiol* 2011; 28 (6): 1145-1154.

Dik AJ, Koning G, Kohl J. Evaluation of microbial antagonists for biological control of *Botrytis cinerea* stem infection in cucumber and tomato. *European Journal of Plant Pathology* 1999; 105 (2): 115-122.

Dimakopoulou M, Tjamos SE, Antoniou PP, Pietri A, Battilani P, Avramidis N, *et al.* Phyllosphere grapevine yeast *Aureobasidium pullulans* reduces *Aspergillus carbonarius* (sour rot) incidence in wine-producing vineyards in Greece. *Biological Control* 2008; 46 (2): 158-165.

Dittrich HH, Eschenbruch R. Acetoin synthesis of yeast on change from anaerobic to aerobic conditions and on addition of  $\text{NH}_4^+$ . *Arch Mikrobiol* 1968; 63 (1):63-69.

Divol B, Strehaiano P, Lonvaud-Funel A. Effectiveness of dimethyldicarbonate to stop alcoholic fermentation in wine. *Food Microbiol* 2005; 22 (2-3): 169-178.

Dizy M, Bisson LF. Proteolytic Activity of Yeast Strains During Grape Juice Fermentation. *Am J Enol Vitic* 2000; 51 (2): 155-167.

Doaré-Lebrun E, El Arbi A, Charlet M, Guerin L, Pernelle JJ, Ogier JC, *et al.* Analysis of fungal diversity of grapes by application of temporal temperature gradient gel electrophoresis - potentialities and limits of the method. *J Appl Microbiol* 2006; 101 (6): 1340-1350.

DOCE. Directiva del Consejo de 15 de julio de 1991 relativa a la comercialización de productos fitosanitarios (91/414/CEE). 1991.

Doignon F, Rozes N. Effect of triazole fungicides on lipid metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Let App Microbiol* 1992; (15): 172-174.

Domizio P, Lencioni L, Ciani M, Di Blasi S, Pontremolesi C, Sabatelli MP. Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *Int J Food Microbiol* 2007; 115 (3): 281-289.

Domizio P, Romani C, Lencioni L, Comitini F, Gobbi M, Mannazzu I, *et al.* Outlining a future for non-*Saccharomyces* yeasts: Selection of putative spoilage wine strains to be used in association with *Saccharomyces cerevisiae* for grape juice fermentation. *Int J Food Microbiol* 2011; 147 (3): 170-180.

Domsch KH, Gams W. Variability and potential of a soil fungus population to decompose pectin, xylan and carboxymethyl-cellulose. *Soil Biol Biochem* 1969; 1 (1): 29-36.

Donéche BJ. Botrytized wines. En: G.H. Fleet, editor. *Wine microbiology and biotechnology*. 1ª ed. Switzerland: Harwood Academic Publishers; 1993. p. 327-351.

Drouillard JB, Martins-Gueunier M, Knauf-Beiter G. Goûts moisi-terreux dans les vins: premiers résultats pratiques d'un partenariat filière. *Revue des Oenologues* 2005; 214: 18-23.

Dugo G, Di Bella G, Saitta M, Cucinotta G. Determination of pesticide residues in sicilian wines of 1991. *Riv Sci Alimentazione* 1993; 22 (4): 419-427.

Edwards CG, Beelman RB, Bartley CE, McConnel AL. Production of decanoic acid and other volatile compounds and the growth of yeast and malolactic bacteria during vinification. *Am J Enol Vitic* 1990; 41 (1): 48-56.

Egli CM, Edinger WD, Mitrakul CM, Henick-Kling T. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J Appl Microbiol* 1998; 85 (5): 779-789.

Eglinton JM, McWilliam JS, Fogarty LFWM, Kwiatkowski MJ, Hoj PB, Henschke PA. The effect of *Saccharomyces bayanus*-mediated fermentation on the chemical composition and aroma profile of Chardonnay wine. *Aust J Grape Wine Res* 2000; 6 (3): 190-196.

Elad Y, Kohl J, Fokkema NJ. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* 1994; 100 (5): 315-336.

Eriksson OE. *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (*Pneumocystidaceae*, *Pneumocystidales*, *Ascomycota*). *Syst Ascomycetum* 1994; 13: 165-180.

Eriksson OE, Svedskog A, Landvik S. Molecular evidence for the evolutionary hiatus between *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Syst Ascomycetum* 1993; 11: 119-162.

Escot S, Feuillat M, Dulau L, Charpentier C. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Aust J Grape Wine Res* 2001; 7 (3): 153-159.

Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int J Syst Bacteriol* 1999; (49): 329-337.

Etiévant PX. En: Maarse H, editor. *Volatile Compounds in Foods and Beverages* New York: Marcel Dekker; 1991.

European Commission. EU Pesticides database. 2010; Disponible en: [http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm).

European Committee for Standardization/Technical Committee 275 (Standards under development). *Foods of plant origin - Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE - QuEChERS-method*. European Committee for Standardization, Brussels 2007.

FAO Development of a good agricultural practice approach. 1ª ed. Roma: F.A.O.; 2003.

FAO/OMS Pesticide residues in food 2005. 1º ed. Roma: F.A.O.; 2005.

FAO/OMS Garantía de la inocuidad y calidad de los alimentos: Directrices para el fortalecimiento de los sistemas nacionales de control de los alimentos. Roma: F.A.O.; 2003.

Fait A, Colosio C. Recent advances and current concepts in pesticide hazards. En: Emmet EA, Frank AL, Gochfeld M, Hez SM, editores. The year book of occupational and environmental medicine St. Louis: Mosby; 1998. p. 15-29.

Falqué E, Fernández E, Dubourdieu D. Differentiation of white wines by their aromatic index. *Talanta* 2001; 54 (2): 271-281.

Farris GA, Budroni M, Vodret T, Deiana P. Sull'origine dei lieviti vinari i lieviti dei terreni, della foglie e degli acini di alcuni vigneti sardi. *L'Enotecnico* 1990; 6: 99-108.

Fatichenti F, Farris GA, Deiana P. Improved production of a Spanish-type Sherry by using selected indigenous film-forming yeasts as starters. *Am J Enol Vitic* 1983; 34 (4): 216-220.

Fay JC, Benavides JA. Evidence for domesticated and wild populations of *Saccharomyces cerevisiae* *Plos Genetics* 2005; 1 (1): 66-71.

Fernández MJ. Influencia de diversos procesos enotécnicos y nuevos productos enológicos en la eliminación de residuos de los fungicidas ciprodinil, fludioxinil, pirimentanil y quinoxifen. Murcia: Universidad de Murcia; 2004.

Fernández MJ, Oliva J, Barba A, Cámara MA. Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (3): 804-811.

Fernández MJ, Oliva J, Barba A, Cámara MA. Effects of clarification and filtration processes on the removal of fungicide residues in red wines (Var. *Monastrell*). *J Agric Food Chem* 2005a; 53 (15): 6156-6161.

Fernández MJ, Oliva J, Barba A, Cámara MA, Fuster A. Influence of different clarifying agents in the elimination of quinoxifen residues in red wine. Abstracts Meeting of Mediterranean Group Pesticides Research "Pesticide Research in Food and Environment: Cooperation Between Mediterranean Countries Sousse Túnez 2002.

Fernández MJ, Oliva J, Ruiz E, Cámara MA, Barba A, Pardo F. Eliminación de residuos de plaguicidas en función de la técnica de desfangado de mosto blanco. *Enólogos* 2001a; 12: 36-40.

Fernández M, Úbeda JF, Briones AI. Typing of non-*Saccharomyces* yeasts with enzymatic activities of interest in wine-making. *Int J Food Microbiol* 2000; 59 (1-2): 29-36.

Fernández MJ, San Nicolás FT, Oliva J, Barba A. Nuevos fungicidas en la vid: Influencia sobre la densidad, fracción ácida e índices de color del vino. *Vitic Enol Prof* 2001; (77): 95-99.

Fernández MT, Ubeda JF, Briones AI. Comparative study of non-*Saccharomyces* microflora of musts in fermentation, by physiological and molecular methods. *FEMS Microbiol Lett* 1999; 173 (1): 223-229.

Fernández O, Martínez O, Hernández Z, Guadalupe Z, Ayestarán B. Effect of the presence of lysated lees on polysaccharides, color and main phenolic compounds of red wine during barrel ageing. *Food Res Int* 2011; 44 (1): 84-91.

Fernández-López JA, Hidalgo V, Almela L, López Roca JM. Quantitative changes in anthocyanin pigments of *Vitis vinifera* cv *monastrell* during maturation. *J Sci Food Agric* 1992; 58 (1): 153-155.

Ferraro R. *Viticultura moderna, Volumen 1*. 1ª ed. Montevideo: Agropecuaria, Hemisferio Sur; 1983.

Ferreira V, Fernández P, Peña C, Escudero A, Cacho J. Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young spanish wines by multivariate-analysis. *J Sci Food Agric* 1995; 67 (3): 381-392.

Ferreira V, Ortín N, Escudero A, López R, Cacho J. Chemical Characterization of the Aroma of Grenache Rosé Wines: Aroma Extract Dilution Analysis, Quantitative Determination, and Sensory Reconstitution Studies. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (14): 4048-4054.

Fleet GH. The commercial and community significance of yeasts in food and beverage production. En: Querol A, Fleet GH, editores. *Yeasts in food and beverages*. 1ª ed. Germany: Springer; 2006. p. 1-18.

Fleet GH, Heard GM. Yeasts-Growth during fermentation. En: Fleet GH, editor. Wine Microbiology and Biotechnology. 1<sup>a</sup> ed. Switzerland: Harwood Academic Publishers; 1993. p. 27-54.

Fleet GH, Lafon-Lafourcade S, Ribéreau-Gayon P. Evolution of yeasts and lactic acid bacteria during fermentation and storage of Bordeaux wines. Appl Environ Microbiol 1984; 48 (5): 1034-1038.

Fleet GH. Wine yeasts for the future. FEMS Yeast Res 2008; 8 (7): 979-995.

Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour. Int J Food Microbiol 2003; 86 (1-2): 11-22.

Flori P, Frabboni B, Cesari A. Pesticide decay models in the wine-making process and wine storage. Ital J Food Sci 2000; 12 (3): 279-289.

Fokkema NJ, Lorbeer JW. Interactions between *Alternaria porri* and saprophytic mycoflora of onion leaves. Phytopathol 1974; 64 (8): 1128-1133.

Foschino R, Galli A. Italian style of life: pane, amore, lievito naturale. Tecnologie Alimentari 1997; 1: 42-59.

Foschino R, Gallina S, Andrighetto C, Rossetti L, Galli A. Comparison of cultural methods for the identification and molecular investigation of yeasts from sourdoughs for Italian sweet baked products FEMS Yeast Res 2004; 4 (6): 609-618.

Fraile P, Garrido J, Ancin C. Influence of a *Saccharomyces cerevisiae* selected strain in the volatile composition of rose wines. Evolution during fermentation. J Agric Food Chem 2000; 48 (5): 1789-1798.

Francesca N, Chiurazzi M, Romano R, Aponte M, Settanni L, Moschetti G. Indigenous yeast communities in the environment of "Rovello bianco" grape variety and their use in commercial white wine fermentation. World J Microbiol Biotechnol 2010; 26 (2): 337-351.

Francioli S, Torrens J, Riu-Aumatell M, López-Tamames E, Buxaderas S. Volatile compounds by SPME-GC as age markers of sparkling wines. Am J Enol Vitic 2003; 54 (3): 158-162.

Frezier V, Dubourdieu D. Incidence du levurage sur l'ecologie des souches de *Saccharomyces cerevisiae* au cours de la vinification dans des crus du bordelais. J Int Sci Vigne Vin 1991; 25 (1): 63-70.

Fugelsang KC, Edwards CG. Wine Microbiology: Practical Applications and Procedures. 2<sup>a</sup> ed. New York.: Springer.; 2007.

Fugelsang KC, Osborn MM, Muller CJ. *Brettanomyces* and *Dekkera*. Implications in winemaking. En: Gump BH, editor. Beer and Wine Production. 1<sup>a</sup> ed. Washington: American Chemical Society; 1993. p. 110-129.

Fuguet J, Ferrer N, Fort F, Arola L, Zamora F. Las paradas de fermentación. Alimentación, Equipos y Tecnología 1999; 12: 133-138.

Gallego FJ, Martínez I, Pérez MA, Hidalgo L. Diferenciación de levaduras vínicas mediante marcadores moleculares: RAPDs-PCR. Grupos de Investigación Enológica. Jornadas Científicas 96. Ciudad Real. España. 1996.

Gallifuoco A, Alfani F, Cantarella M, Spagna G, Pifferi PG. Immobilized beta-glucosidase for the winemaking industry: study of biocatalyst operational stability in laboratory-scale continuous reactors. Process Biochem 1999; 35 (1-2): 179-185.

Gallifuoco A, D'Ercole L, Alfani F, Cantarella M, Spagna G, Pifferi PG. On the use of chitosan-immobilized beta-glucosidase in wine-making: kinetics and enzyme inhibition. Process Biochem 1998; 33 (2): 163-168.

Gangl H, Batusic M, Tscheik G, Tiefenbrunner W, Hack C, Lopandic K. Exceptional fermentation characteristics of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. New Biotechnology 2009; 25 (4): 244-251.

Gao L, Chi Z, Sheng J, Ni X, Wang L. Single-cell protein production from Jerusalem artichoke extract by a recently isolated marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and its nutritive analysis Appl Microbiol Biotechnol 2007; 77 (4): 825-832.

Gao L, Girard B, Mazza G, Reynolds AG. Changes in Anthocyanins and Color Characteristics of Pinot Noir Wines during Different Vinification Processes. J Agric Food Chem 1997; 45 (6): 2003-2008.

García M, Oliva J, Barba A, Cámara MA, Pardo F, Díaz-Plaza EM. Effect of fungicide residues on the aromatic composition of white wine inoculated with three *Saccharomyces cerevisiae* strains. J Agric Food Chem 2004; (52): 1241-1247.

García MA. Influencia de los residuos de fungicidas en la cinética fermentativa y calidad de vinos blancos de la D.O. Jumilla. Murcia: Universidad de Murcia; 2002.

García-Cazorla J, Xirau-Vayreda M. Persistence of dicarboximidic fungicide residues in grapes, must and wine. *Am J Enol Vitic* 1994; 45 (3): 338-340.

García-Esparza MA, Capri E, Pirzadeh P, Trevisan M. Copper content of grape and wine from Italian farms. *Food Addit Contam* 2006; 23 (3): 274-280.

García-Gómez E. Formación de sulfhídrico en la fermentación vínica. Selección de levaduras. Universidad Complutense de Madrid; 1987.

Generalitat Valenciana. Estudios de curvas de disipación de plaguicidas en cítricos. 1ª ed. Valencia: Generalitat Valenciana; 2001.

Gil M, Yuste J. Phenolic maturity of tempranillo grapevine trained as goblet, under different soil and climate conditions in the Duero valley area. *J Int Sci Vigne Vin* 2004; 38 (1): 81-88.

Giraudon S, Medina B, Merle MH, Tusseau D. Análisis y controles. Investigación de los residuos de pesticidas. En: Claude Flanzy, editor. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. 1ª ed. Madrid: AMV-Mundi-Prensa; 2000. p. 237-238.

Girond S, Maugen-Blazy F, Michel G. Influence de quelques pesticides viticoles sur les levures et la fermentation. *R F OE* 1989; 29 (119): 14-22.

Giudici P, Romano P, Zambonelli C. A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* 1990; 36 (1): 61-64.

Giudici P, Zambonelli C, Passarelli P, Castellari L. Improvement of wine composition with cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Am J Enol Vitic* 1995; 46 (1): 143-147.

Gnaegi F, Aerny J. Influence des fungicides inhibiteurs de la biosynthese des sterols sur la fermentation alcoolique et la qualite du vin. *Bull OIV* 1984; 57: 995-999.

Gobbetti M. The sourdough microflora: Interactions of lactic acid bacteria and yeasts. *Trends in food science and technology* 1998; 9 (7): 267-274.

Gobbetti M, Corsetti A, Rossi J, Rosa L, Vincenzi S. Identification and clustering of lactic acid bacteria and yeasts from wheat sourdough of central Italy. *Ital J Food Sci* 1994; 6: 85-94.

Goddard MR. Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology* 2008; 89 (8): 2077-2082.

Goddard MR, Anfang N, Tang RY, Gardner RC, Jun C. A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environ Microbiol* 2010; 12 (1): 63-73.

Gómez-Míguez MJ, Gómez-Míguez M, Vicario IM, Heredia FJ. Assessment of colour and aroma in white wines vinifications: Effects of grape maturity and soil type. *J Food Eng* 2007; 79 (3): 758-764.

Gómez-Plaza E, Gil-Muñoz R, López-Roca JM, Martínez A. Color and phenolic compounds of a young red wine. Influence of winemaking techniques, storage temperature and length of storage time. *J Agric Food Chem* 2000; (48): 736-741.

González SS, Barrio E, Querol A. Molecular identification and characterization of wine yeasts isolated from Tenerife (Canary Island, Spain). *J Appl Microbiol* 2007; 102 (4): 1018-1025.

González-Pombo P, Fariña L, Carrau F, Batista-Viera F, Brena BM. A novel extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Issatchenkia terricola*: Isolation, immobilization and application for aroma enhancement of white Muscat wine. *Process Biochem* 2011; 46 (1): 385-389.

González-Pombo P, Pérez G, Carrau F, Guisán JM, Batista-Viera F, Brena BM. One-step purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol Lett* 2008; 30 (8): 1469-1475.

González-Rodríguez RM, Cancho-Grande B, Torrado-Agrasar A, Simal-Gándara J, Mazaira-Pérez J. Evolution of tebuconazole residues through the winemaking process of Mencía grapes *Food Chem* 2009; 117 (3): 529-537.

Gonzalez-Rodriguez RM, Gonzalez-Barreiro C, Rial-Otero R, Regueiro J, Torrado-Agrasar A, Martinez-Carballo E, *et al.* Influence of new fungicides metiram and pyraclostrobin on *Saccharomyces cerevisiae* yeast growth and alcoholic fermentation course for wine production. *CYTA Journal of food* 2011; 9 (4): 329-334.

Grando MS, Colato L. Polimorfismo del cariotipo elettroforetico in lieviti *Saccharomyces cerevisiae* di interesse enologico. *Vignevisini* 1994; (21): 57-61.

Grube M, Schmid F, Berg G. Black fungi and associated bacterial communities in the phyllosphere of grapevine. *Fungal Biology* 2011.

Guang-Guo Y, Williams B. Herbicide residues in grapes and wine. *J Environ Sci Health B* 1999; 34 (3): 397-411.

Guasch J, Sala C, Fort F, Busto O, Zamora F, Arola LL. Estudio de la evolución de diferentes pesticidas a lo largo de la vinificación. I Congreso Internacional de Calidad y Tecnología de Alimentos Logroño España 1995.

Guérin L, Guyot F, Vincent B, Lempereur V. Epidémiologie des moisissures responsables des goûts moisi-terreux. 8ième Symposium International d'oenologie 2007; 1: 76-78.

Guerzoni E, Marchetti R. Analysis of yeast flora associated with grapes sour rot and of the chemical disease markers. *Appl Environ Microbiol* 1987; 53 (3): 571-576.

Guinebretiere MH, Nguyen-The C, Morrison N, Reich M, Nicot P. Isolation and characterization of antagonists for the biocontrol of the postharvest wound pathogen *Botrytis cinerea* on strawberry fruits. *J Food Prot* 2000; 63 (3): 386-394.

Guppy KH, Thomas C, Thomas K, Anderson D. Cerebral fungal infections in the immunocompromised host: a literature review and a new pathogen *Chaetomium atrobrunneum*: case report. *Neurosurgery* 1998; 43 (6): 1463-1469.

Guth H. Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *J Agric Food Chem* 1997; 45 (8): 3027-3032.

Gutierrez AR, Santamaria P, Epifanio S, Garijo P, Lopez R. Ecology of spontaneous fermentation in one winery during 5 consecutive years. *Let App Microbiol* 1999; 29 (6): 411-415.

Haag B, Krieger S, Hammes WP. Hemmung der Startkulturen zur Einleitung des biologischen Säurenabbaus durch Espritmittel-rückstände. *Wein-Wiss* 1988; 43: 261-278.

Hadfield TL, Smith MB, Winn RE, Rinaldi MG, Guerra C. Mycoses caused by *Candida lusitaniae*. *Reviews of Infectious Diseases* 1987; 9 (5): 1006-1012.

Hall B, Durall DM, Stanley G. Population dynamics of *Saccharomyces cerevisiae* during spontaneous fermentation at a british columbia winery. *Am J Enol Vitic* 2011; 62 (1): 66-72.

Hasnip S, Caputi A, Crews C, Brereton P. Effects of storage time and temperature on the concentration of ethyl carbamate and its precursors in wine. *Food Addit Contam* 2004; 21 (12): 1155-1161.

Hatzidimitriou E, Darriet P, Bertrand A, Dubourdieu D. Folpet hydrolysis, incidence on the initiation of the alcoholic fermentation. *J Int Sci Vigne Vin* 1997; 31 (1): 51-55.

Hausner G, Reid J, Klassen GR. Do galeate-ascospore members of the *Cephalosporaceae*, *Endomycetaceae* and *Ophiostomataceae* share a common phylogeny? *Mycologia* 1992; (84): 870-881.

Hawkins JL, Baddour LM. *Candida lusitanae* infections in the era of fluconazole availability. *Clin Infect Dis* 2003; 36 (2): 14-18.

Hayasaka Y, Birse M, Eglinton J, Herderich M. The effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* yeast on colour properties and pigment profiles of a Cabernet Sauvignon red wine. *Aust J Grape Wine Res* 2007; 13 (3): 176-185.

Heard GM, Fleet GH. The effects of temperature and pH on the growth of yeasts species during the fermentation of grape juice. *J Appl Bacteriol* 1988; (65): 23-28.

Heard GM, Fleet GH. Occurrence and growth of yeast species during the fermentation of some Australian wines. *Food Technol Aus* 1986; 38 (1): 22-25.

Hendriks L, Goris A, van de Peer Y, Neefs JM, Vancanneyt M, Kersters K, *et al.* Phylogenetic-relationships among ascomycetes and ascomycete-like yeasts as deduced from small ribosomal-subunit RNA sequences. *Syst Appl Microbiol* 1992; 15 (1): 98-104.

Henick-Kling T, Edinger W, Daniel P, Monk P. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J Appl Microbiol* 1998; 84 (5): 865-876.

Herce-Pagliai C, Moreno I, González G, Repetto M, Cameán AM. Determination of total arsenic, inorganic and organic arsenic species in wine. *Food Addit Contam* 2002; 19 (6): 542-546.

Hernández E. Evolución histórica de los vinos de Jumilla. *Revista Murciana de Antropología* 2005; 12: 249-261.

Hernández LF, Espinosa JC, Fernández-González M, Briones A.  $\beta$ -Glucosidase activity in a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *Int J Food Microbiol* 2003; 80 (2): 171-176.

Hernawan T, Fleet GH. Chemical and cytological changes during the autolysis of yeasts. *J Ind Microbiol* 1995; 14 (6): 440-450.

Herraiz T. Formación de compuestos volátiles por distintas levaduras vínicas. Influencia del SO<sub>2</sub> y de los hollejos utilizados durante la fermentación. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1989.

Hidalgo L. Tratado de viticultura General. Madrid. España: Mundi-Prensa.; 1993.

Holloway P, Subden RE. Volatile metabolites produced in a Riesling must by wild yeast isolates. *Can Inst Food Sci Technol J* 1991; 24 (1-2): 57-59.

Holloway P, Subden RE, Lachance MA. The yeasts in a Riesling must from the Niagara grape-growing region of Ontario Canada. *Can Inst Food Sci Technol J* 1990; 23 (4-5): 212-216.

Howell KS, Swiegers JH, Elsey GM, Siebert TE, Bartowsky EJ, Fleet GH, *et al.* Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by *Saccharomyces cerevisiae* commercial wine strains. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 240 (2): 125-129.

INE. Gasto total por alimentos, bebidas y tabaco y valor unitario. En: Instituto Nacional de Estadística, editor. Encuesta continua de presupuestos familiares, Base 1997, Resultados anuales 2010 Madrid: Instituto Nacional de Estadística; 2010.

Iembo T, Da Silva R, Pagnocca FC, Gomes E. Production, characterization, and properties of  $\beta$ -glucosidase and  $\beta$ -xylosidase from a strain of *Aureobasidium* sp. *App Biochem Microbiol* 2002; 38 (6): 549-552.

Ingledeew WM, Kunkee RE. Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am J Enol Vitic* 1985; 36 (1): 65-76.

Ippolito A, El Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski M. Control of postharvest decay of apple fruit by *Aureobasidium pullulans* and induction of defense responses. *Post Biol Technol* 2000; 19 (3): 265-272.

Ippolito A, Nigro F, Romanazzi G, Campanella V. Field application of *Aureobasidium pullulans* against *Botrytis* storage rot of strawberry. En: Bertolini P, Sijmons PC, Guerzoni ME, Serra F, editores. Non conventional methods for the control of post-harvest disease and microbiological spoilage Bologna: Workshop Proceedings; 1997. p. 127-133.

ISO/IEC 17025. Committee on Conformity Assessment (CASCO) UNE-EN ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization (ISO), Geneva. 2005.

Israilides CJ, Smith A, Harthill JE, Barnett C, Bambalov G, Scanlon B. Pullulan content of the ethanol precipitate from fermented agro-industrial wastes. *Appl Microbiol Biotechnol* 1998; 49 (5): 613-617.

Jackson RS. Wine Science: principles and applications. 3rd ed. Burlington.: Academic Press.; 2008.

Janisiewicz WJ, Tworkoski TJ, Kurtzman CP. Biocontrol Potential of *Metchnikowia pulcherrima* Strains Against Blue Mold of Apple. *Phytopathol* 2001; 91 (11): 1098-1108.

Jensen SL, Umiker NL, Arneborg N, Edwards CG. Identification and characterization of *Dekkera bruxellensis*, *Candida pararugosa* and *Pichia guilliermondii* isolated from commercial red wines. *Food Microbiol* 2009; 26 (8): 915-921.

Ji H, Zhang W, Zhou Y, Zhang M, Zhu J, Song Y, *et al.* A three-dimensional model of lanosterol 14 $\alpha$ -demethylase of *Candida albicans* and its interaction with azole antifungals. *J Med Chem* 2000; 43 (13): 2493-2505.

Johnson LJ, Koufopanou V, Goddard MR, Hetherington R, Schafer SM, Burt A. Population genetics of the wild yeast *Saccharomyces paradoxus*. *Genetics* 2004; 166 (1): 43-52.

Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS. The role and use of non-*Saccharomyces* yeasts in wine production. *S Afr J Enol Vitic* 2006; 27 (1): 15-39.

Jolly NP, Augustyn OPH, Pretorius IS. The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *S Afr J Enol Vitic* 2003; 24 (2): 63-69.

Juban Y. Límites máximos de residuos de pesticidas en uvas. *Vitic Enol Prof* 1996; 47: 6-11.

Juraske R, Antón A, Castells F. Estimating half-lives of pesticides in/on vegetation for use in multimedia fate and exposure models. *J Chromatogr A* 2007; 1150 (1-2): 208-214.

Kamzolova SV, Shishkanova NV, Morgunov IG, Finogenova TV. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res* 2003; 3 (2): 217-222.

Kato S, Kitamura E, Yamamoto S, Ohshima S. Changes in constituents during the growth of *Saccharomyces servazzii* and *Debaryomyces hansenii*. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 1991; 38 (7): 647-650.

Kato S, Nakase T. Yeast flora in soaked fluid of salted Daikon under a nitrogen packing system. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* 1986; 33 (9): 659-666.

Kavanagh K. *Fungi. Biology and Applications*. West Sussex.: John Wiley & Sons, Ltd.; 2005.

Khan SU. *Pesticides in the soil environment*. 1<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Scientific Publishing; 1980.

Kim D, Hong Y, Park H. Co-fermentation of grape must by *Issatchenkia orientalis* and *Saccharomyces cerevisiae* reduces the malic acid content in wine. *Biotechnol Lett* 2008; 30 (9): 1633-1638.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. *Dictionary of the fungi*. 10<sup>a</sup> ed. United Kingdom: CAB International; 2008.

Kluyver AJ, van der Walt JP, Vantriet AJ. Pulcherrimin, the pigment of *Candida pulcherrima*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1953; 39 (7): 583-593.

Kohl J, Molhoek WML, Van der Plas CH, Fokkema NJ. Effect of *Ulocladium atrum* and other antagonists on sporulation of *Botrytis cinerea* on dead lily leaves exposed to field conditions. *Phytopathol* 1995; 85 (4): 393-401.

Krcmery V, Mateicka F, Grausova S, Kunova A, Hanzen J. Invasive infections due to *Clavispora lusitaniae*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 23 (1): 75-78.

Krcmery V, Oravcova E, Spanik S, Mrazova-Studena M, Trupl J, Kunova A, *et al.* Nosocomial breakthrough fungaemia during antifungal prophylaxis or empirical antifungal therapy in 41 cancer patients receiving antineoplastic chemotherapy: analysis of aetiology risk factors and outcome. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41 (3): 373-380.

Kreger van Rij NJW, (Lodder J). *The Yeast, a taxonomic study*. 3<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science Publisher B.V.; 1984.

Kremnický L, Biely P. Disaccharides permeases: constituents of xyloanalytic and mannanolytic systems of *Aureobasidium pullulans*. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1425 (3): 560-566.

Kunkee RE, Amerine MA. *Yeasts in wine-making*. En: Rose AH, Harrison JS, editores. *The Yeasts* New York: Academic Press; 1970. p. 5-71.

Kurtzman CP. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* 1994; 10 (13): 1727-1740.

Kurtzman CP. The systematics of ascomycetous yeasts defined from ribosomal RNA sequence divergence: theoretical and practical aspects. En: Reynolds DR, Taylor JW, editores. *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics*. 1<sup>a</sup> ed. Wallingford: CAB International; 1993a. p. 271-279.

Kurtzman CP. Systematics of the ascomycetous yeasts assessed from ribosomal RNA sequence divergence. *Antonie van Leeuwenhoek* 1993; 63 (2): 165-174.

Kurtzman CP, Fell JW. *The Yeasts: a taxonomic study*. 4<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science V.B.; 1998.

Kurtzman CP, Robnett CJ. Molecular relationships among hyphal ascomycetous yeasts and yeast-like taxa. *Can J Bot* 1995; 73 (Suppl.1 E-H): 824-830.

Kurtzman CP. *Zygosaccharomyces* Barker. En: Kurtzman CP, Fell JW, editores. *The Yeasts, a taxonomic study*. 4<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1998a. p. 424-432.

Kurtzman CP. *Torulaspota* Lindner. En: Kurtzman CP, Fell JW, editores. The Yeasts, a taxonomic study. 4<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1998. p. 404-408.

La Guerche S. Recherches sur les déviations organoleptiques des moûts et des vins associées au développement de pourritures sur les raisins. Etude particulière de la géosmine. Bordeaux: Université Bordeaux; 2004.

La Guerche S, Dauphin B, Pons M, Blancard D, Darriet P. Characterization of some mushroom and earthy off-odors microbially induced by the development of rot on grapes. J Agric Food Chem 2006; 54 (24): 9193-9200.

La Guerche S, De Senneville L, Blancard D, Darriet P. Impact of the *Botrytis cinerea* strain and metabolism on (-)-geosmin production by *Penicillium expansum* in grape juice. Antonie van Leeuwenhoek 2007; 92 (3): 331-341.

Lafon-Lafourcade S, Larue F, Ribéreau-Gayon P. Quelques observations sur les problèmes microbiologiques de la vinification en blanc. Conn Vigne Vin 1979; (13): 51-76.

Lafon-Lafourcade S, Dubourdieu D, Hadjinicolaou P, Ribéreau-Gayon P. Incidence des conditions de travail des vendanges blanches sur la clarification et la fermentation des moûts. Conn Vigne Vin 1980; (14): 127-138.

Laforgue R, Guérin L, Pernelle JJ, Monnet C, Dupont J, Bouix M. Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. J Appl Microbiol 2009; 107 (4): 1208-1218.

Lambrechts MG, Pretorius IS. Yeast and its importance to wine aroma - A review. S Afr J Enol Vitic 2000; 21(Special): 97-129.

Larue F. Les facteurs de survie de la levure et leur rôle sur la fermentation alcoolique du moût de raisin. Burdeos: Universidad de Burdeos; 1978.

Larue F, Lafon-Lafourcade S, Ribéreau-Gayon P. Inhibition de *Saccharomyces cerevisiae* dans le moût de raisin. Compt Rend Acad Sci 1982; 294 (12): 587-590.

Larue F, Lafon-Lafourcade S, Ribéreau-Gayon P. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. Appl Environ Microbiol 1980; 39 (4): 808-811.

Las Heras-Vazquez FJ, Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jimenez JM, Rodriguez-Vico F. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. *FEMS Yeast Res* 2003; 3 (1): 3-9.

Lee JW, Yeomans WG, Allen AL, Deng F, Gross RA, Kaplan DL. Biosynthesis of novel exopolymers by *Aureobasidium pullulans*. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65 (12): 5265-5271.

Legras JL, Merdinoglu D, Cornuet JM, Karst F. Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol Ecol* 2007; 16 (10): 2091-2102.

Leite RSR, Alves-Prado HF, Cabral H, Pagnocca FC, Gomes E, Da-Silva R. Production and characteristics comparison of crude beta-glucosidases produced by microorganisms *Thermoascus aurantiacus* e *Aureobasidium pullulans* in agricultural wastes. *Enzyme Microb Technol* 2008; 43 (6): 391-395.

Lema C, Garcia-Jares C, Orriols I, Angulo Regueiro L. Contribution of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* Populations to the Production of Some Components of Albariño Wine Aroma. *Am J Enol Vitic* 1996; 47 (2): 206-216.

Leverentz B, Conway WS, Janisiewicz W, Abadias M, Kurtzman CP, Camp MJ. Biocontrol of the food-borne pathogens *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* serovar Poona on fresh-cut apples with naturally occurring bacterial and yeast antagonists. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72 (2): 1135-1140.

Li W, Qiu SP, Wu YJ. Triazophos residues and dissipation rates in wheat crops and soil. *Ecotox Environ Safe* 2008; 69 (2): 312-316.

Li E, Liu A, Xue B, Liu Y. Yeast species associated with spontaneous wine fermentation of Cabernet Sauvignon from Ningxia, China. *World J Microbiol Biotechnol* 2011; 27 (10): 2475-2482.

Li SS, Cheng C, Li Z, Chen JY, Yan B, Han BZ, *et al.* Yeast species associated with wine grapes in China. *Int J Food Microbiol* 2010; 138 (1-2): 85-90.

Lima G, Ippolito A, Nigro F, Salerno M. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Post Biol Technol* 1997; 10 (2): 169-178.

Liti G, Carter DM, Moses AM, Warringer J, Parts L, James SA, *et al.* Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* 2009; 458 (7236): 337-341.

Lodder J. *The Yeast. A Taxonomic Study.* Amsterdam: North-Holland Publishing Company; 1970.

Lončarić I, Oberlerchner JT, Heissenberger B, Moosbeckhofer R. Phenotypic and genotypic diversity among strains of *Aureobasidium pullulans* in comparison with related species. *Antonie van Leeuwenhoek* 2009; 95 (2): 165-178.

Longo E, Cansado J, Agrelo D, Villa TG. Effect of Climatic Conditions on Yeast Diversity in Grape Musts from Northwest Spain. *Am J Enol Vitic* 1991; 42 (2): 141-144.

Lopandić K, Tiefenbrunner W, Gangl H, Mandl K, Berger S, Leitner G, *et al.* Molecular profiling of yeasts isolated during spontaneous fermentations of Austrian wines. *FEMS Yeast Res* 2008; 8 (7): 1063-1075.

Lopes CA, Rodríguez ME, Sangorrín M, Querol A, Caballero AC. Patagonian wines: the selection of an indigenous yeast starter. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007; 34 (8): 539-546.

Lopes CA, Sáez JS, Sangorrín MP. Differential response of *Pichia guilliermondii* spoilage isolates to biological and physico-chemical factors prevailing in Patagonian wine fermentations. *Can J Microbiol* 2009; 55 (7): 801-809.

López R, Ortín N, Pérez-Trujillo JP, Cacho JF, V. Impact odorants of different young white wines from the Canary Islands. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (11): 3419-3425.

López-López T, Martínez-Vidal JL, Gil-García MD, Martínez-Galera M, Rodríguez-Lallena JA. Benzoylphenylurea residues in peppers and zucchinis grown in greenhouses: determination of decline times and pre-harvest intervals by modelling. *Pest Manag Sci* 2004; 60 (2): 183-190.

Lorenzo C, Pardo F, Zalacain A, Alonso GL, Salinas MR. Complementary effect of Cabernet Sauvignon on *Monastrell* wines. *J Food Comp Anal* 2008b; 21 (1): 54-61.

Lorenzo C, Pardo F, Zalacain A, Alonso GL, Salinas MR. Differentiation of co-winemaking wines by their aroma composition. *Eur Food Res Technol* 2008a; 227 (3): 777-787.

Loureiro V, Malfeito-Ferreira M. Spoilage yeasts in the wine industry. *Int J Food Microbiol* 2003; 86 (1-2): 23-50.

MAPA. Métodos oficiales de análisis. Tomo II. Madrid: Secretaría General de Alimentación; 1993.

MARM. Registro de Productos Fitosanitarios. 2010a; Disponible en: <http://www.mapa.es/es/agricultura/pags/fitos/registro/menu.asp>

MARM. Anuario de Estadística. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid: Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino; 2010.

MARM. Análisis del consumo de vino en hostelería y restauración. Madrid: Subdirección General de Industrias, Innovación y Comercialización Agroalimentaria (MARM); 2007.

Magyar I, Tóth T. Comparative evaluation of some oenological properties in wine strains of *Candida stellata*, *Candida zemplinia*, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol* 2011; 28 (1): 94-100.

Magyar I, Tóth T, Pomázi A. Oenological characterization of indigenous yeasts involved in fermentation of Tokaji aszú. *Bull OIV* 2008; 81: 35-43.

Magyar I, Tóth T, Pomázi A. Oenological characterization of indigenous yeast species involved in fermentation of Tokaji aszú. XXX OIV World Congress 2007.

Majdak A, Herjavec S, Orlic S, Redzepovic S, Mirosevic N. Comparison of wine aroma compounds produced by *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Technol Biotechnol* 2002; 40 (2): 103-108.

Mangani S, Buscioni G, Collina L, Bocci E, Vincenzini M. Effects of microbial populations on anthocyanin profile of Sangiovese wines produced in Tuscany, Italy. *Am J Enol Vitic* 2011; 62 (4): 487-494.

Mangiarotti AM, Picco AM, Crippa A, Savino E. Fungi on phylloplane of treated and not treated vineyard. *Riv Patol Veg* 1987; 23: 27-38.

Manzanares P, Rojas V, Genovés S, Vallés S. A preliminary search for anthocyanin- $\beta$ -D-glucosidase activity in non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int J Food Sci Tech* 2000; 35 (1): 95-103.

Mareca I. Origen, composición y evolución del vino. 1ª ed. España: Alhambra; 1983.

Marín A. Influencia de la refrigeración en la disipación de los fungicidas ciprodinil y fludioxonil en lechuga y uva de mesa. Murcia: Universidad de Murcia; 2000.

Martínez de Toda F. Biología de la vid. Fundamentos biológicos de la viticultura. Madrid. España: Mundi-Prensa; 1991.

Martínez Tomé A. El monasterio cisterciense en el origen de los vinos españoles. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.; 1991.

Martínez-Galera M, Gil-García MD, Rodríguez-Lallena JA, López-López T, Martínez-Vidal JL. Dissipation of Pyrethroid Residues in Peppers, Zucchini, and Green Beans Exposed to Field Treatments in Greenhouses: Evaluation by Decline Curves. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (19): 5745-5751.

Martini A. Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Wine Res* 1993; 4 (3): 165-176.

Martini A, Ciani M, Scorzetti G. Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *Am J Enol Vitic* 1996; 47 (4): 435-440.

Martini A, Federici F, Rosini G. A new approach to the study of yeast ecology of natural substrates. *Can J Microbiol* 1980; 26 (7): 856-859.

Masih EI, Alie I, Paul B. Can the grey mould disease of the grape-vine be controlled by yeast?. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 189 (2): 233-237.

Masneuf I, Aigle M, Dubourdieu D. Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* identification in enology. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 138 (2-3): 239-244.

Masneuf-Pomarede I, Bely M, Marullo P, Lonvaud-Funel A, Dubourdieu D. Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *Int J Food Microbiol* 2010; 139 (1-2): 79-86.

Matei F, Brinduse E, Nicolae G, Tudorache A, Teodorescu R. Yeast biodiversity evolution over decades in Delau Mare-Valea Calugareasca vineyard. *Romanian Biotechnological Letters* 2011; 16 (1): 113-119.

Mateo JJ, Peris L, Ibanez C, Maicas S. Characterization of glycolytic activities from non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Bobal musts. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2011; 38 (2): 347-354.

Mateos PL, Khayyat N, Arroyo V, Iñigo B. Agentes de fermentación de los mostos de uva de la zona Utiel-Requena. *Alimentaria* 1985a; 162: 63-69.

Mateos PL, Sanchez Infante P, Arroyo V, Iñigo B. Mostos de uva de la zona Utiel-Requena, influencia del anhídrido sulfuroso en la microflora fermentativa. *Alimentaria* 1985b; 164: 29-36.

Mauricio JC, Moreno J, Zea L, Ortega JM, Medina M. The effects of grape must fermentation conditions on volatile alcohols and ester formed by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Sci Food Agric* 1997; (75): 155-160.

Mauriello G, Capece A, D'Auria M, Garde-Cerdán T, Romano P. SPME-GC method as a tool to differentiate VOC profiles in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Food Microbiol* 2009; 26 (3): 246-252.

Mazauric JP, Salmon JM. Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: II. Analysis of Desorbed Polyphenol Compounds from Yeast Lees. *J Agric Food Chem* 2006; 54 (11): 3876-3881.

Mazauric JP, Salmon JM. Interactions between Yeast Lees and Wine Polyphenols during Simulation of Wine Aging: I. Analysis of Remnant Polyphenolic Compounds in the Resulting Wines. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (14): 5647-5653.

McCormack PJ, Wildman HG, Jeffries P. Production of antibacterial compounds by phylloplane inhabiting yeasts and yeastlike fungi. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60 (3):927-931.

McMahon H, Zoecklein BW, Fugelsang K, Jasinski Y. Quantification of glycosidase activities in selected yeasts and lactic acid bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1999; 23 (3): 198-203.

Meca G, Blaiotta G, Ritieni A. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of Italian red wine Moscato. *Food Control* 2010; 21 (4): 579-583.

Medina K, Boido E, Dellacassa E, Carrau F. Yeast Interactions with Anthocyanins during Red Wine Fermentation. *Am J Enol Vitic* 2005; 56 (2): 104-109.

Mendoza LM, de Nadra MCM, Farias ME. Kinetics and metabolic behavior of a composite culture of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* wine related strains. *Biotechnol Lett* 2007; 29 (7): 1057-1063.

Meng X, Tian S. Effects of preharvest application of antagonistic yeast combined with chitosan on decay and quality of harvested table grape fruit. *J Sci Food Agric* 2009; 89 (11): 1838-1842.

Merín MG, Mendoza LM, Fariás ME, Morata de Ambrosini VI. Isolation and selection of yeasts from wine grape ecosystem secreting cold-active pectinolytic activity. *Int J Food Microbiol* 2011; 147 (2): 144-148.

Miklos I, Sipiczki M, Benko Z. Osmotolerant yeasts isolated from Tokaj wines. *J Basic Microbiol* 1994; 34 (6): 379-385.

Mikusova P, Santini A, Ritieni A, Pavlokin J, Srobarova A. Berries contamination by microfungi in Slovakia vineyards regions: Impact of climate conditions on microfungi biodiversity. *Rev Iberoam Micol* 2012 (artículo en fase de corrección).

Miliadis GE, Aplada-Sarlis P, Liapis KS. Dissipation of pyrazophos residues in greenhouse tomatoes. *B Environ Contam Tox* 1994; 53 (6):883-887.

Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *Am J Clin Nutr* 1981; 34 (10): 2248-2256.

Mills DA, Johannsen EA, Cocolin L. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68 (10): 4884-4893.

Minarik E. Ecology of natural species of wine yeasts in Czechoslovakia. *Mikrobiologija* 1965; 20: 29-37.

Minarik E, Laho L. Die hefen des Tokayer weinbaugebietes. *Mitteilungen Klosterneuburg* 1962; 12 (1): 7-10.

Mingorance-Cazorla L, Clemente-Jiménez JM, Martínez-Rodríguez S, Las Heras-Vázquez FJ, Rodríguez-Vico F. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. *World J Microbiol Biotechnol* 2003; 19 (3): 297-304.

Molnár O, Prillinger H. Analysis of yeast isolates related to *Metschnikowia pulcherrima* using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; description of *Metschnikowia andauensis* sp. nov. *Syst Appl Microbiol* 2005; 28 (8): 717-726.

Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B. Evaluation of different *Saccharomyces cerevisiae* strains for red winemaking. Influence on the anthocyanin, pyranoanthocyanin and non-anthocyanin phenolic content and colour characteristics of wines. *Food Chem* 2007; 104 (2): 814-823.

Montedoro G, Fantozzi P. Dosage des tannins dans les mouts et les vins à l'aide de la méthylcellulose et évaluation d'autres fractions phénoliques. *Lebenswiss Technol* 1974; (7): 155-161.

Monteil H, Blazy-Maugen F, Michel G. Influence des pesticides sur la croissance des levures des raisins et des vins. *Sci Aliments* 1986; 6: 349-360.

Montemurro N, Grieco F, Lacertosa G, Visconti A. Chlorpyrifos decline curves and residue levels from different commercial formulations applied to oranges. *J Agric Food Chem* 2002; 50 (21): 5975-5980.

Mora J, Barbas JI, Mulet A. Growth of Yeast Species During the Fermentation of Musts Inoculated with *Kluyveromyces thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Enol Vitic* 1990; 41 (2): 156-159.

Mora J, Barbas JI, Ramis B, Mulet A. Yeast Microflora Associated with some Majorcan Musts and Wines. *Am J Enol Vitic* 1988; 39 (4): 344-346.

Mora J, Mulet A. Effects of some treatments of grape juice on the population and growth of yeast species during fermentation. *Am J Enol Vitic* 1991; 42 (2): 133-136.

Morata A, Gómez-Cordovés MC, Colomo B, Suárez JA. Cell wall anthocyanin adsorption by different *Saccharomyces* strains during the fermentation of *Vitis vinifera* L. cv Graciano grapes. *Eur Food Res Technol* 2005; 220 (3-4): 341-346.

Morata A, Gómez-Cordovés MC, Suberviola J, Bartolomé B, Colomo B, Suárez JA. Adsorption of Anthocyanins by Yeast Cell Walls during the Fermentation of Red Wines. *J Agric Food Chem* 2003; 51 (14): 4084-4088.

Morata A, González C, Suárez-Lepe JA. Formation of vinylphenolic pyranoanthocyanins by selected yeasts fermenting red grape musts supplemented with hydroxycinnamic acids. *Int J Food Microbiol* 2007; 116 (1): 144-152.

Moreira N, Pina C, Mendes F, Couto JA, Hogg T, Vasconcelos I. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control* 2011; 22 (5): 662-667.

Moreno J, Medina M, García MD. Optimization of the fermentation conditions of must of Pedro Ximénez grapes grown in Southern Spain. Production of higher alcohols and esters. *S Afr J Enol Vitic* 1988; (9): 16-20.

Moreno JJ, Millan C, Ortega JM, Medina M. Analytical differentiation of wine fermentations using pure and mixed yeast cultures. *J Ind Microbiol* 1991; 7 (3): 181-189.

Mortimer R., Polsinelli M. On the origins of wine yeast. *Research in Microbiology* 1999; 150 (3): 199-204.

Mounir R, Durieux A, Bodo E, Allard C, Simon JP, Achbani EH, *et al.* Production, formulation and antagonistic activity of the biocontrol like-yeast *Aureobasidium pullulans* against *Penicillium expansum*. *Biotechnol Lett* 2007; 29 (4): 553-559.

Mrak EM, McClung LS. Yeasts occurring on grapes and in grape products in California. *J Bacteriol* 1940; 40 (3): 395-407.

Mühlberger FH, Grohmann H. Über das glycerin in traubenmosten und weinen. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* 1962; (58): 65-69.

Mulet A, Mora JA, Barbas JI, Rosello C. Estudio de la ecología de las levaduras en la fermentación de los mostos y vinos mallorquines. En: Conselleria d'Agricultura Pesca del Govern Balear. Universidad Islas Baleares, editor.; 1990.

NCBI. NCBI Taxonomy Browser. 2010; Disponible en:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>.

Nam YD, Chang HW, Kim KH, Roh SW, Kim MS, Jung MJ, *et al.* Bacterial, Archaeal, and Eukaryal Diversity in the Intestines of Korean People. *The Journal of Microbiology* 2008; 46 (5): 491-501.

Nancy FC, Michael B. *Candida lusitanae* Meningitis: Case Report and Review of the Literature. *Infect Dis Clin Pract* 2007; 15 (6): 359-363.

Naumov GI. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* comb. nov., a new variety established by genetic analysis. *Microbiology* 2000; 69 (3): 338-342.

Naumov GI. Divergent population of the *Saccharomyces paradoxus* yeast in Hawaii: Species in Statu nascendi. *Dokl Biol Sci* 1999; 364 (2): 281-283.

Naumov GI. Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *J Ind Microbiol* 1996; 17 (3-4): 295-302.

Naumov GI, Masneuf I, Naumova ES, Aigle M, Dubourdieu D. Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. *Research in Microbiology* 2000; 151 (8): 683-691.

Naumov GI, Naumova ES, Antunovics Z, Sipiczki M. *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Appl Microbiol Biotechnol* 2002; 59 (6): 727-730.

Naumov GI, Naumova ES, Azbukina ZM, Korhola M, Gaillardin C. Genetic and karyotypic identification of *Saccharomyces* yeasts from far-east Asia. *Cryptogam Mycol* 1993; 14 (2): 85-93.

Naumov GI, Naumova ES, Sniegowski PD. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks *Can J Microbiol* 1998; 44 (11): 1045-1050.

Naumov GI, Naumova ES, Sniegowski PD. Differentiation of European and Far East Asian populations of *Saccharomyces paradoxus* by allozyme analysis. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47 (2): 341-344.

Naumova ES, Smith MT, Boekhout T, de Hoog GS, Naumov GI. Molecular differentiation of sibling species in the *Galactomyces geotrichum* complex. *Antonie van Leeuwenhoek* 2001; 80 (3-4): 263-273.

Navarro García S, Barba A, Cámara MA, Navarro S. Persistencia de los plaguicidas en los suelos agrícolas. Procesos y factores condicionantes. 1ª ed. Universidad de Murcia: Secretariado de Publicaciones e Intercambio Científico; 1992.

Navarro JM, Durand G. Fermentation alcoolique. Influence de la température sur l'accumulation d'alcool dans les cellules de levures. *Ann Microbiol* 1978; 129 (2): 215-224.

Navarro S. Pesticide residues in enology. En: Mohan RM, editor. *Research advances in agricultural and food chemistry*. 1ª ed. Kerala: Global research Network; 2000c. p. 101-112.

Navarro S, Barba A, Oliva J, Navarro G, Pardo F. Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of wine-making procedures in their disappearance. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (1): 264-270.

Navarro S, García B, Navarro G, Oliva J, Barba A. Effect of wine-making practices on the concentrations of fenerimol and penconazole in rose wines. *J Food Prot* 1997; 60 (9): 1120-1124.

Navarro S, Oliva J, Barba A, Navarro G, Garcia MA, Zamorano M. Evolution of chlorpyrifos, fenarimol, metalaxyl, penconazole, and vinclozolin in red wines elaborated by carbonic maceration of *Monastrell* grapes. *J Agric Food Chem* 2000a; 48 (8): 3537-3541.

N'Guessan FK, N'Dri DY, Camara F, Djè MK. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* as starter cultures for the alcoholic fermentation of *tchapalo*, a traditional sorghum beer. *World J Microbiol Biotechnol* 2010; 26 (4): 693-699.

Nguyen HV, Lepingle A, Gaillardin C. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae* including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Syst Appl Microbiol* 2000; 23 (1): 71-85.

Nguyen MH, Morris AJ, Dobson ME, Snyderman DR, Peacock JE, Rinaldi MG, et al. *Candida lusitaniae*: An important emerging cause of candidemia. *Infect Dis Clin Pract* 1996; 5 (4): 273-278.

Nigro F, Ippolito A, Romanazzi G, Salerno M. Prove di integrazione tra UV-C, curing e *Aureobasidium pullulans* nella lotta contro la muffa grigia dell'actinidia in postraccolta. Primi risultati. Proceedings V Convegno Annuale S I Pa V 1997; 3.

Nikfardjam MSP, Pickering GJ. Influence of variety and commercial yeast preparation on red wine made from autochthonous Hungarian and Canadian grapes. Part I: phenolic composition. Eur Food Res Technol 2008; 227 (4): 1077-1083.

Nikolaou E, Soufleros EH, Bouloumpasi E, Tzanetakis N. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. Food Microbiol 2006; 23 (2): 205-211.

Nishida H, Sugiyama J. Phylogenetic-relationships among *Taphrina*, *Saitoella*, and other higher fungi. Mol Biol Evol 1993; 10 (2): 431-436.

Nisiotou AA, Nychas GJE. Yeast populations residing on healthy or *Botrytis*-infected grapes from a vineyard in Attica, Greece. Appl Environ Microbiol 2007; 73 (8): 2765-2768.

Nisiotou AA, Spiropoulos AE, Nychas GJE. Yeast community structures and dynamics in healthy and *Botrytis*-affected grape must fermentations. Appl Environ Microbiol 2007; 73 (21): 6705-6713.

Nissen P, Arneborg N. Characterization of early deaths of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures with *Saccharomyces cerevisiae*. Arch Microbiol 2003; 180 (4): 257-263.

Nissen P, Nielsen D, Arneborg N. Viable *Saccharomyces cerevisiae* cells at high concentrations cause early growth arrest of non-*Saccharomyces* yeasts in mixed cultures by a cell-cell contact-mediated mechanism. Yeast 2003; 20 (4): 331-341.

Noguerol-Pato R, González-Rodríguez RM, González-Barreiro C, Cancho-Grande B, Simal-Gándara J. Influence of tebuconazole residues on the aroma composition of Mencía red wines. Food Chem 2011; 124 (4): 1525-1532.

Núñez DR, Walker MJ. A review of palaeobotanical findings of early *Vitis* in the mediterranean and of the origins of cultivated grape-vines, with special reference to new pointers to prehistoric exploitation in the western mediterranean. *Rev Palaeobot Palynol* 1989 11/14; 61 (3-4): 205-237.

Nurgel C, Erten H, Canbas A, Cabaroglu T, Selli S. Yeast Flora during the Fermentation of Wines Made from *Vitis vinifera* L. cv. Emir and Kalecik Karasi Grown in Anatolia. *World J Microbiol Biotechnol* 2005; 21 (6-7): 1187-1194.

Nykänen L. Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *Am J Enol Vitic* 1986; 37 (1): 84-96.

OIV. Situación del Sector Vitivinícola Mundial. 9ª ed. Paris: Organización Internacional de la Viña y el Vino; 2007.

OMS. The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009. 1ª ed. Alemania: World Health Organization; 2010.

OMS. Estrategia global de la OMS para la inocuidad de los alimentos: alimentos más sanos para una salud mejor. 1ª ed. Ginebra: OMS. Departamento de Inocuidad de los Alimentos; 2002.

Ocón E, Gutiérrez AR, Garijo P, López R, Santamaría P. Presence of non-*Saccharomyces* yeasts in cellar equipment and grape juice during harvest time. *Food Microbiol* 2010b; 27 (8): 1023-1027.

Ocón E, Gutiérrez AR, Garijo P, Tenorio C, López I, López R, *et al.* Quantitative and qualitative analysis of non-*Saccharomyces* yeasts in spontaneous alcoholic fermentations. *Eur Food Res Technol* 2010a; 230 (6): 885-891.

Oliva J. Control integrado de plagas en viticultura. Influencia de los residuos de plaguicidas en la calidad de vinos tintos obtenidos en la D.O. Jumilla. Murcia: Universidad de Murcia; 1998.

Oliva J, Barba A, Navarro G, Alonso GL, Navarro S. Effect of pesticide residues in the content of organic acids in red wines elaborated in Jumilla wine-producing region. *Vitic Enol Prof* 1998b; 59: 35-43.

Oliva J, Barba A, Paya P, Camara MA. Disappearance of fenhexamid residues during wine-making process. *Commun Agric Appl Biol Sci* 2006; 71 (2): 65-74.

Oliva J, Bernal C, Barba A, Navarro S, Pardo F. Efecto de los residuos de diclofuanida y miclobutanil durante la elaboración de vinos rosados en la D.O. Jumilla. *Sem Vitiv* 1999d; 2763-2764: 2621-2627.

Oliva J, Navarro G, Salinas MR, Garijo J, Barba A, Navarro S. Influence of pesticide residues in the colour of red wines elaborated with *Monastrell* grape variety. *Proc 1st International Congress Pigments in Food Technology Sevilla* 1999c: 393-398.

Oliva J, Navarro S, Barba A, Navarro G. Determination of chlorpyrifos, penconazole, fenarimol, vinclozolin and metalaxyl in grapes, must and wine by on-line microextraction and gas chromatography. *J Chromatogr A* 1999; 833 (1): 43-51.

Oliva J, Navarro S, Barba A, Navarro G, Salinas MR. Effect of pesticide residues on the aromatic composition of red wines. *J Agric Food Chem* 1999b; 47 (7): 2830-2836.

Oliva J, Paya P, Camara MA, Barba A. Removal of pesticides from white wine by the use of fining agents and filtration. *Commun Agric Appl Biol Sci* 2007b; 72 (2): 171-180.

Oliva J, Paya P, Camara MA, Barba A. Removal of famoxadone, fluquinconazole and trifloxystrobin residues in red wines: Effects of clarification and filtration processes. *J Environ Sci Health B* 2007a; 42 (7): 775-781.

Oliva J, Barba A, San Nicolás FT, Payá P. Efecto de residuos de fungicidas en la composición fenólica de vinos tintos (var. *Monastrell*). *Tecnología del vino* 2005; (23): 37-41.

Oliva J, Navarro G, Barba A, Navarro S. Influencia de los residuos de plaguicidas en la fermentación alcohólica. *Aliment Equip Tecnol* 2000; (2): 153-156.

Oliva J, Pardo F, Navarro S, Barba A, Navarro G. Influencia de residuos de diversos plaguicidas en la elaboración de vinos tintos de la D.O. Jumilla. *Sem Vitiv* 1998a; 2730 (31): 4330-4339.

Orlic S, Redzepovic S, Jeromel A, Herjavec S, Iacumin L. Influence of indigenous *Saccharomyces paradoxus* strains on Chardonnay wine fermentation aroma. *Int J Food Sci Tech* 2007; 42 (1): 95-101.

Oura E. Reaction products of yeast fermentations. *Process Biochem* 1977; 12 (3): 19-21.

Palencia R. Los rasgos característicos del viñedo jumillano. *Anal Univ Murcia Fil y Letras* 1962-63; 21: 154-188.

Palomero F, Morata A, Benito S, González MC, Suárez-Lepe JA. Conventional and enzyme-assisted autolysis during ageing over lees in red wines: Influence on the release of polysaccharides from yeast cell walls and on wine monomeric anthocyanin content. *Food Chem* 2007; 105 (2): 838-846.

Palomero F, Ntanos K, Morata A, Benito S, Suárez-Lepe JA. Reduction of wine 4-ethylphenol concentration using lyophilised yeast as a bioadsorbent: influence on anthocyanin content and chromatic variables. *Eur Food Res Technol* 2011; 232 (6): 971-977.

Papadopoulou-Mourkidou E, Kotopoulou A, Papadopoulos G, Hatziphanis C. Dissipation of cyproconazole and quinalphos on/in grapes. *Pestic Sci* 1995; 45 (2): 111-116.

Pappagianis D, Collins MS, Hector R, Remington J. Development of resistance to amphotericin-B in *Candida lusitanae* infecting a human. *Antimicrob Agents Chemother* 1979; 16 (2): 123-126.

Parapouli M, Hatziloukas E, Drinas C, Perisynakis A. The effect of Debina grapevine indigenous yeast strains of *Metschnikowia* and *Saccharomyces* on wine flavour. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2010; 37 (1): 85-93.

Pardo F. Jumilla. Viñas, bodegas y vinos. 1ª ed. Comunidad Autónoma de Murcia.: Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Agua.; 1996.

Parish ME, Carroll DE. Indigenous Yeasts Associated with Muscadine (*Vitis rotundifolia*) Grapes and Musts. *Am J Enol Vitic* 1985; 36 (2): 165-169.

Patouillard M. Essai Taxonomique sur les Families et les Genres des Hyménomycètes. : Duclune, Lons-le-Saunier; 1900. p. 184.

Payá P. Persistencia, degradación y biodisponibilidad de inhibidores y reguladores de crecimiento de insectos en alimentos de origen vegetal. Murcia: Universidad de Murcia; 2008.

Peinado RA, Moreno J, Bueno JE, Moreno JA, Mauricio JC. Comparative study of aromatic compounds in two young white wines subjected to pre-fermentative cryomaceration. *Food Chem* 2004; 84 (4): 585-590.

Pérez de Obanos JJ. Oídio (*Uncinula necator* Burr.). En: Coedición MAPA-Mundi-Prensa, editores. Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada. 3ª ed. Madrid: MAPA-Mundi-Prensa; 1992. p. 196-201.

Pérez F, Ramírez M, Regodón JA. Influence of killer strains of *Saccharomyces cerevisiae* on wine fermentation. *Antonie van Leeuwenhoek* 2001; 79 (3-4): 393-399.

Pérez-Nevado F, Albergaria H, Hogg T, Girio F. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Food Microbiol* 2006 5/1; 108 (3): 336-345.

Petersson S, Schnurer J. Biocontrol of mold growth in high-moisture wheat stored under airtight conditions by *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61 (3): 1027-1032.

Peynaud E. *Enología práctica*. 2º ed. Madrid: Mundi-Prensa; 1984.

Piano S, Neyrotti V, Migheli Q, Gullino ML. Biocontrol capability of *Metschnikowia pulcherrima* against *Botrytis* postharvest rot of apple. *Post Biol Technol* 1997; 11 (3): 131-140.

Piggott JR, Findlay AJ. En: Nykänen L, Lehtonen P, editores. *Flavour Research of Alcoholic Beverages - Instrumental and Sensory Analysis* Helsinki: Foundation for Biotechnological and Industrial Fermentation Research; 1984. p. 189.

Pimentel D. *Techniques of Reducing Pesticide Use: Economic and Environmental Benefits*. Madrid: Mundi-Prensa; 1997.

Pina C, Santos C, Couto JA, Hogg T. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae*—influence of different culture conditions. *Food Microbiol* 2004; 21 (4): 439-447.

Piskur J, Rozpedowska E, Polakova S, Merico A, Compagno C. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet* 2006; 22 (4): 183-186.

Poulard A. Influence of several factors affecting variability of the yeast microflora of musts and wines. *Vignes et Vins* 1984; 326: 18-21.

Povhe Jemec K, Cadez N, Zagorc T, Bubic V, Zupec A, Raspor P. Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must. *Food Microbiol* 2001 6; 18 (3): 247-259.

Povhe Jemec K, Raspor P. Initial *Saccharomyces cerevisiae* concentration in single or composite cultures dictates bioprocess kinetics. *Food Microbiol* 2005; 22 (4): 293-300.

Prakitchaiwattana CJ, Fleet GH, Heard GM. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *FEMS Yeast Res* 2004; 4 (8): 856-877.

Pramateftaki PV, Lanaridis P, Typas MA. Molecular identification of wine yeasts at species or strain level: a case study with strains from two vine-growing areas of Greece. *J Appl Microbiol* 2000; 89 (2): 236-248.

Praphailong W, Fleet GH. *Debaryomyces*. En: Robinson RK, editor. *Encyclopedia of Food Microbiology* New York: Academic Press; 1999. p. 515-520.

Pretorius IS, van der Westhuizen TJ, Augustyn OPH. Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African wine industry. A review. *S Afr J Enol Vitic* 1999; 20 (2): 61-74.

Pretorius IS. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 2000; 16 (8): 675-729.

Prillinger H, Dörfler C, Laaser G, Ecklerlein B, Lehle L. Ein Beitrag zur Systematik und Entwicklungsbiologie höherer Pilze: Hefe-Typen der Basidiomyceten. Teil I: *Schizosaccharomycetales*, Protomyces-Typ. *Z. Mykol* 1990; (56): 219-250.

Pulvirenti A, Nguyen HV, Caggia C, Giudici P, Rainieri S, Zambonelli C. *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiol Lett* 2000; 192 (2): 191-196.

Qin GZ, Tian SP, Xu Y. Biocontrol of postharvest diseases on sweet cherries by four antagonistic yeasts in different storage conditions. *Post Biol Technol* 2004; 31 (1): 51-58.

Quecedo CR, Somavilla QF, Arroyo V, Iñigo B. Agentes de fermentación de mosto de uva de la zona de Galicia. *Rev Agric Tecnol Aliment* 1976; 16: 123-130.

Querol A, Fleet GH. *Yeasts in food and beverages*. 1ª ed. Germany: Springer; 2006.

Querol A, Barrio E, Ramón D. Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int J Food Microbiol* 1994; 21 (4): 315-323.

Querol A, Huerta T, Barrio E, Ramon D. Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines selection and DNA patterns. *J Food Sci* 1992; 57 (1): 183-216.

Querol A, Jimenez M, Huerta T. Microbiological and enological parameters during fermentation of musts from poor and normal grape-harvests in the region of Alicante (Spain). *J Food Sci* 1990; 55 (6): 1603-1606.

Querol A, Ramon D. The application of molecular techniques in wine microbiology. *Trends in food science and technology* 1996; 7 (3): 73-78.

Quesada MP. *Identificación y selección de levaduras autóctonas de la Región de Murcia*. Murcia: Universidad de Murcia; 1994.

Quilter MG, Hurley JC, Lynch FJ, Murphy MG. The production of isoamyl acetate from amyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Inst Brew* 2003; 109 (1): 34-40.

Radler F, Schütz H. Glycerol production of various strains of *Saccharomyces*. *Am J Enol Vitic* 1982; 33 (1): 36-40.

Radler F, Schoning I. Über die Wirkung einiger fungizide aufmilchsaurebakterien. *Wein-Wiss* 1974; 29: 181-187.

Ramón D. Trends in wine microbiology. *Microbiologia Sem* 1997; 13 (4): 405-411.

Rankine BC. The importance of yeasts in determining the composition and quality of wines. *Vitis* 1968; 7: 22-49.

Raspor P, Cus F, Jemec KP, Zagorc T, Cadez N, Nemanic J. Yeast population dynamics in spontaneous and inoculated alcoholic fermentations of Zametovka must. *Food Technology and Biotechnology* 2002; 40 (2): 95-102.

Raspor P, Milek DM, Polanc J, Smole Možina S, Čadež N. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int J Food Microbiol* 2006; 109 (1-2): 97-102.

Ravindra P. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnol Adv* 2000; 18 (6): 459-479.

Redhead SA, Malloch DW. The Endomycetaceae: new concepts, new taxa. *Can J Bot* 1977; (55): 1701-1711.

Redzepovic S, Orlic S, Majdak A, Kozina B, Volschenk H, Viljoen-Bloom M. Differential malic acid degradation by selected strains of *Saccharomyces* during alcoholic fermentation. *Int J Food Microbiol* 2003; 83 (1): 49-61.

Reed G, Nagodawithana TW. *Yeast Technology*. 2<sup>o</sup> ed. New York: Van Nostrand Reinhold; 1991.

Regodón JA, Pérez F, Valdés ME, De Miguel C, Ramírez M. A simple and effective procedure for selection of wine yeast strains. *Food Microbiol* 1997; 14 (3): 247-254.

Renouf V, Claisse O, Lonvaud-Funel A. Understanding the microbial ecosystem on the grape berry surface through numeration and identification of yeast and bacteria. *Aust J Grape Wine Res* 2005; 11 (3): 316-327.

Reynier A. *Manual de Viticultura*. 6<sup>a</sup> ed. Madrid.: Mundi-Prensa.; 2002.

Ribéreau-Gayon P. *New Developments in Wine Microbiology*. *Am J Enol Vitic* 1985; 36 (1): 1-10.

Ribéreau-Gayon P. Anthocyanins as food colors. En: Academic Press, editor. *The anthocyanins of grapes and wines* New York: Academic Press; 1982.

Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Ribéreau-Gayon P, Sudraud P. *Traité d'oenologie. Sciences et techniques du vin*. Paris: Dunod; 1976.

Ribéreau-Gayon J, Peynaud E, Sudraud P, Ribéreau-Gayon P. *Tratado de enología. Ciencia y Técnica del Vino. Tomo I. Análisis y control de Los Vinos*. Buenos Aires: Hemisferio Sur; 1980.

Ribéreau-Gayon P, Dubourdiou D, Donèche B, Lonvaud A. *Handbook of Enology Volume 1. The Microbiology of Wine and Vinifications*. 2<sup>o</sup> ed. Chichester: John Wiley and Sons; 2006.

Ribéreau-Gayon P, Dubourdieu D, Donèche B, Lonvaud A. Cytology, taxonomy and ecology of grape and wine yeasts. En: John Wiley and Sons, editores. The Handbook of Enology: Microbiology of Wine, Volume 1 Chichester: John Wiley and Sons; 2000. p. 1-49.

Ribéreau-Gayon P, Peynaud E. Traite d'Oenologie. Paris: Paris et Liège Librarie Polytechnique; 1960.

Rinaldi MG, Inderlied CB, Mahnovski V. Fatal *Chaetomium atrobrunneum* Ames, 1949, systemic mycosis in a patient with acute lymphoblastic leukemia. XI Congreso de la Sociedad Intenacional de Micología Humana y Animal 1991; 2: 69-107.

Riou V, Vernhet A, Doco T, Moutounet M. Aggregation of grape seed tannins in model wine—effect of wine polysaccharides. Food Hydrocolloids 2002; 16 (1): 17-23.

Rodrigues de Miranda L. *Clavispora*, a new yeast genus of the *Saccharomycetales*. Antonie van Leeuwenhoek 1979; 45 (3): 479-483.

Rodriguez ME, Infante JJ, Molina M, Dominguez M, Rebordinos L, Cantoral JM. Genomic characterization and selection of wine yeast to conduct industrial fermentations of a white wine produced in a SW Spain winery. J Appl Microbiol 2010; 108 (4): 1292-1302.

Rodríguez ME, Lopes CA, Barbagelata RJ, Barda NB, Caballero AC. Influence of *Candida pulcherrima* Patagonian strain on alcoholic fermentation behaviour and wine aroma. Int J Food Microbiol 2010a; 138 (1-2): 19-25.

Rojas V, Gil JV, Pinaga F, Manzanares P. Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. Int J Food Microbiol 2001; 70 (3): 283-289.

Rojas V, Gil JV, Piñaga F, Manzanares P. Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. Int J Food Microbiol 2003; 86 (1-2): 181-188.

Romano P, Suzzi G. Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. Appl Environ Microbiol 1996; 62 (2): 309-315.

Romano P, Suzzi G, Domizio P, Fatichenti F. Secondary products formation as a tool for discriminating non-*Saccharomyces* wine strains. Antonie van Leeuwenhoek 1997; 71 (3): 239-242.

Romano P, Fiore C, Paraggio M, Caruso M, Capece A. Function of yeast species and strains in wine flavour. *Int J Food Microbiol* 2003; 86 (1-2): 169-180.

Rombouts FM, Pilnik W. Enzymes in fruit and vegetable juice technology. *Process Biochem* 1978; 13 (8): 9-13.

Rosi I, Vinella M, Domizio P. Characterization of beta-glucosidase activity in yeasts of enological origin. *J Appl Bacteriol* 1994; 77 (5): 519-527.

Rosini G, Federici F, Martini A. Yeast flora of grape berries during ripening. *Microbial Ecology* 1982; 8 (1): 83-89.

Rudy H, Scholten G. Reduction of fungicidal residues in wines by means of an activated carbon fining of the must. *Mitteilungen Klosterneuburg, Rebe und Wein, Obstbau und Früchteverwertung* 1997; 47 (3): 85-94.

Ruediger GA, Pardon KH, Sas AN, Godden PW, Pollnitz AP. Fate of Pesticides during the Winemaking Process in Relation to Malolactic Fermentation. *J Agric Food Chem* 2005; 53 (8): 3023-3026.

Ruediger GA, Pardon KH, Sas AN, Godden PW, Pollnitz AP. Removal of pesticides from red and white wine by the use of fining and filter agents. *Aust J Grape Wine Res* 2004; 10 (1): 8-16.

Ruggeri R, Vannini P, Carugo C, Colli A, Amanti S, Pedrotti P. Evaluation of pesticide residues in wines in the province of Sondrio. *Riv Sci Alimentazione* 1996; 25 (1): 17-22.

Sabate J, Cano J, Esteve-Zarzoso B, Guillamón JM. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal genes and mitochondrial DNA. *Microbiol Res* 2002; 157 (4): 267-274.

Sacchi KL, Bisson LF, Adams DO. A Review of the Effect of Winemaking Techniques on Phenolic Extraction in Red Wines. *Am J Enol Vitic* 2005; 56 (3): 197-206.

Sáez JS, Lopes CA, Kirs VC, Sangorrín MP. Enhanced volatile phenols in wine fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and spoiled with *Pichia guilliermondii* and *Dekkera bruxellensis*. *Let App Microbiol* 2010; 51 (2): 170-176.

Sáez JS, Lopes CA, Kirs VE, Sangorrín M. Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiol* 2011; 28 (3): 503-509.

Salinas MR, Alonso GL, Navarro G, Pardo F, Jimeno J, Huerta MD. Evolution of the aromatic composition of wines undergoing carbonic maceration under different aging conditions. *Am J Enol Vitic* 1996; 47 (2): 134-144.

Salinas MR, Alonso GL, Pardo F, Bayonove C. Free and bound volatiles of *Monastrell* wines *Sci Aliments* 1998; 18 (2): 223-231.

Sampaio JP, Gonçalves P. Natural Populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal Are Associated with Oak Bark and Are Sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74 (7): 2144-2152.

San Nicolás FT, Oliva J, Barba A, Fernández MJ, Salinas MR. Influence of new fungicide residues in the colour of red wine. Phenolic compounds of under molecular weight and anthocyanins. *Proc 2nd Int Congress Pigments in Food Technol* 2002: 377.

San Romáo MV, Coste Belchior AP. Study of the influence of some antifungal products on the microbiological flora of grapes and musts. *Cienc Téc Vitivinic* 1982; 1: 101-112.

Sanchez PJ, Cooper BH. *Candida lusitanae* sepsis and meningitis in a neonate. *Pediatr Infect Dis J* 1987; 6 (8): 758-759.

Santos C. Aplicación de fungicidas antibottríticos en vid: eficacia, residuos y consecuencias enológicas. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid; 1997.

Sartini E, Arfelli G, Fabiani A, Piva A. Influence of chips, lees and micro-oxygenation during aging on the phenolic composition of a red Sangiovese wine. *Food Chem* 2007; 104 (4): 1599-1604.

Schacherer J, Shapiro JA, Ruderfer DM, Kruglyak L. Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 2009; 458 (7236): 342-U103.

Schena L, Ippolito A, Zahavi T, Cohen L, Nigro F, Droby S. Genetic diversity and biocontrol activity of *Aureobasidium pullulans* isolates against postharvest rots. *Post Biol Technol* 1999; 17 (3): 189-199.

Schena L, Nigro F, Pentimone I, Ligorio A, Ippolito A. Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. *Post Biol Technol* 2003; 30 (3): 209-220.

Schuller D, Alves H, Dequin S, Casal M. Ecological survey of *Saccharomyces cerevisiae* strains from vineyards in the Vinho Verde Region of Portugal. *FEMS Microbiology Ecology* 2005; 51 (2): 167–177.

Schütz M, Gafner J. Analysis of yeast diversity during spontaneous and induced alcoholic fermentations. *J Appl Microbiol* 1993; 75 (6): 551-558.

Segal R, Kusne S. Cerebral fungal infections in the immunocompromised host: a literature review and a new pathogen *Chaetomium atrobrunneum*: case report. *Neurosurgery* 1999; 45 (1): 200.

Segarra O. La cultura del vino. Una guía amena para pasar de iniciado a experto en vinos. 1ª ed. Barcelona: Amat; 2004.

Seiber JN. Environmental transport and fate. En: Krieger RI, editor. *Handbook of pesticide toxicology*. 2ª ed. New York: Academic Press; 2001. p. 643-648.

Seibold A, Fried A, Kunz S, Moltmann E, Lange E, Jelkmann W. Yeasts as antagonists against fire blight. *EPPO Bull* 2004; 34: 389-390.

Serra R, Braga A, Venancio A. Mycotoxin-producing and other fungi isolated from grapes for wine production, with particular emphasis on ochratoxin A. *Research in Microbiology* 2005; 156 (4): 515-521.

Serra R, Lourenço A, Alípio P, Venâncio A. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Mycological Research* 2006; 110 (8): 971-978.

Sharma AK, Sawant SD, Adsule PG, Rajguru YR. Comparison of commercial and locally identified yeast strains in relation to young wine quality of Cabernet Sauvignon. *S Afr J Enol Vitic* 2009; 30 (2): 148-150.

Shinohara T. L'importance des substances volatiles du vin. Formation et effects sur la qualité. *Bull OIV* 1984; 641-642: 606-618.

Shinohara T. Gas-Chromatographic analysis of volatile fatty-acids in wines. *Agric Biol Chem* 1985; 49 (7): 2211-2212.

Sicard D, Legras JL. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Compt Rend Biol* 2011; 334 (3): 229-236.

Sidari R, Postorino S, Caparello A, Caridi A. Evolution during wine aging of colour and tannin differences induced by wine starters. *Ann Microbiol* 2007; 57 (2): 197-201.

Simó V. Historia del vino. *Enciclopedia del vino: Orbis*; 1987. p. 261-300.

Simon L, Bouchet B, Bremond K, Gallant DJ, Bouchonneau M. Studies on pullulan extracellular production and glycogen intracellular content in *Aureobasidium pullulans*. *Can J Microbiol* 1998; 44 (12): 1193-1199.

Sipiczki M. Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Res* 2008; 8 (7): 996-1007.

Sipiczki M. *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72 (10): 6716-6724.

Sipiczki M. Species identification and comparative molecular and physiological analysis of *Candida zemplinia* and *Candida stellata*. *J Basic Microbiol* 2004; 44 (6): 471-479.

Sipiczki M. *Candida zemplinia* sp. nov., an osmotolerant and psychrotolerant yeast that ferments sweet botrytized wines. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; 53: 2079-2083.

Sipiczki M. Taxonomic and physiological diversity of *Saccharomyces bayanus*. En: Ciani M, editor. *Biodiversity and Biotechnology of Wine Yeasts Kerala: Research Signpost*; 2002. p. 53-69.

Sipiczki M, Csoma H, Antunovics Z, Pfliegler W. Biodiversity in yeast populations associated with botrytised wine making. *Mitteilungen Klosterneuburg* 2010; 60: 387-394.

Sipiczki M, Romano P, Lipani G, Miklos I, Antunovics Z. Analysis of yeasts derived from natural fermentation in a Tokaj winery. *Antonie van Leeuwenhoek* 2001; 79 (1): 97-105.

Smith Th. *Hanseniaspora Zikes*. En: Kurtzman CP, Fell JW, editores. *The Yeasts, a taxonomic study*. 4<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1998. p. 214-220.

Sniegowski PD, Dombrowski PG, Fingerman E. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* coexist in a natural woodland site in North America and display different levels of reproductive isolation from European conspecifics. *FEMS Yeast Res* 2002; 1 (4): 299-306.

Soden A, Oakey H, Francis IL, Henschke P. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust J Grape Wine Res* 2000; 6 (1): 21-30.

Soleas GJ, Goldberg DM. Potential Role of Clarifying Agents in the Removal of Pesticide Residues During Wine Production and Their Effects upon Wine Quality. *J Wine Res* 2000; 11 (1): 19-34.

Son H, Hwang G, Park W, Hong Y, Lee CH. Metabolomic Characterization of Malolactic Fermentation and Fermentative Behaviors of Wine Yeasts in Grape Wine. *J Agric Food Chem* 2009; 57 (11): 4801-4809.

Soufleros E, Bertrand A. Rôle de la souche de levure dans la production des substances volatiles au cours de la fermentation du jus de raisin. *Conn Vigne Vin* 1979; (13): 181-189.

Spadaro D, Vola R, Piano S, Gullino ML. Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Post Biol Technol* 2002; 24 (2): 123-134.

Squadrito M, Corona O, Ansaldi G, Di Stefano R. Evolution of anthocyanin profile from grape to wine. *J Int Sci Vigne Vin* 2010; 44 (3): 167-177.

Stockley CS, Hoj PB. Better wine for better health: Fact or fiction? *Aust J Grape Wine Res* 2005; 11 (2): 127-138.

Strehaiano P, Goma G. Effect of initial substrate concentration on two wine yeasts: relation between glucose sensitivity and ethanol inhibition. *Am J Enol Vitic* 1983; 34 (1): 1-5.

Strehaiano P, Moreno M, Goma G. Fermentation alcoolique: Influence de la concentration en glucose sur le taux de production d'éthanol et le taux de croissance. *Compt Rend Acad Sci* 1978; 286 (2): 225-228.

Suárez Lepe JA. Paradas de fermentación, causas y manejo tecnológico. *Sevi* 1999; (2761): 2319-2327.

Suárez Lepe JA. Levaduras vnicas. Funcionalidad y uso en bodega. 1ª ed. Madrid.: Ediciones Mundi-Prensa.; 1997.

Suárez Lepe JA, Íñigo Leal B. Microbiología Enológica. Fundamentos de Vinificación. 2ª ed. España: Ediciones Mundi-Prensa; 1992.

Subden RE, Husnik JL, van Twest R, van der Merwe G, van Vuuren HJJ. Autochthonous microbial population in a Niagara Peninsula icewine must. Food Res Int 2003; 36 (7): 747-751.

Succi M, Reale A, Andrighetto C, Lombardi A, Sorrentino E, Coppola R. Presence of yeasts in southern Italian sourdoughs from *Triticum aestivum* flour FEMS Microbiol Lett 2003; 225 (1): 143-148.

Sumby KM, Grbin PR, Jiranek V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. Food Chem 2010; 121 (1): 1-16.

Suresh ER, Ethiraj S. Effect of grape maturity on the composition and quality of wines made in India. Am J Enol Vitic 1987; 38 (4): 329-331.

Swangkeaw J, Vichitphan S, Butzke CE, Vichitphan K. The characterisation of a novel *Pichia anomala*  $\beta$ -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. Ann Microbiol 2009; 59 (2): 335-343.

Swiegers JH, Pretorius IS. Modulation of volatile sulfur compounds by wine yeast. Appl Microbiol Biotechnol 2007; 74 (5): 954-960.

Talbot PHB. Fossilized pre-Patouillardian Taxonomy? Taxon 1968; 17 (6): 620-628.

Thomas C, Mileusnic D, Carey RB, Kampert M, Anderson D. Fatal chaetomium cerebritis in a bone marrow transplant patient. Human Pathology 1999; 30 (7): 874-879.

Thomas DS, Rose AH. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. Arch Microbiol 1979; 122 (1): 49-55.

Timme G, Frehse H. Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 1980; 33 (1): 47-60.

Timme G, Frehse H, Laska V. Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 1986; 39 (2): 187-203.

Tini V, Romano P, Soli MG. Investigation and clonal selection of yeasts for winery purposes. 1. The "Trebiano di Romagna" yeasts. Vignevini 1979; (6): 21-25.

Todaro A, Palmeri R, Barbagallo RN, Pifferi PG, Spagna G. Increase of *trans*-resveratrol in typical Sicilian wine using  $\beta$ -Glucosidase from various sources. Food Chem 2008; 107 (4): 1570-1575.

Tofalo R, Chaves-Lopez C, Di Fabio F, Schirone M, Felis GE, Torriani S, *et al.* Molecular identification and osmotolerant profile of wine yeasts that ferment a high sugar grape must. Int J Food Microbiol 2009; 130 (3): 179-187.

Tofalo R, Schirone M, Telera GC, Manetta AC, Corsetti A, Suzzi G. Influence of organic viticulture on non-*Saccharomyces* wine yeast populations. Ann Microbiol 2011; 61 (1): 57-66.

Toledo J. Podredumbre ácida del racimo. En: Coedición MAPA-Mundi-Prensa, editor. Los parásitos de la vid. Estrategias de protección razonada. 3ª ed. Madrid: MAPA-Mundi-Prensa; 1992. p. 220-223.

Tominaga T, Okuzawa Y, Kato S, Suzuki M. The first isolation of two types of trifluoroleucine resistant mutants of *Saccharomyces servazzii*. Biotechnol Lett 2003; 25 (20): 1735-1738.

Torija MJ, Rozès N, Poblet M, Guillamón JM, Mas A. Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. Antonie van Leeuwenhoek 2001; 79 (3-4): 345-352.

Toro ME, Vazquez F. Fermentation behaviour of controlled mixed and sequential cultures of *Candida cantarellii* and *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. World J Microbiol Biotechnol 2002; 18 (4): 351-358.

Torok T, Mortimer RK, Romano P, Suzzi G, Polsinelli M. Quest for wine yeasts - An old story revisited. J Ind Microbiol 1996; 17 (3-4): 303-313.

Torriani S, Zapparoli G, Suzzi G. Genetic and phenotypic diversity of *Saccharomyces sensu stricto* strains isolated from Amarone wine - Diversity of *Saccharomyces* strains from Amarone wine. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 1999; 75 (3): 207-215.

Tosi E, Azzolini M, Guzzo F, Zapparoli G. Evidence of different fermentation behaviours of two indigenous strains of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* isolated from Amarone wine. *J Appl Microbiol* 2009; 107 (1): 210-218.

Tregouat O, Van Leeuwen C, Choné X, Gaudillière JP. Étude du régime hydrique et de la nutrition azotée de la vigne. *J Int Sci Vigne Vin* 2002; (36): 133-142.

Tsiropoulos NG, Aplada-Sarlis PG, Miliadis GE. Evaluation of teflubenzuron residue levels in grapes exposed to field treatments and in the must and wine produced from them. *J Agric Food Chem* 1999; 47 (11): 4583-4586.

Tsiropoulos NG, Miliadis GE, Likas DT, Liapis K. Residues of spiroxamine in grapes following field application and their fate from vine to wine. *Food Addit Contam* 2005; 53 (26): 10091-10096.

Türkel S, Ener B. Isolation and characterization of new *Metschnikowia pulcherrima* strains as producers of the antimicrobial pigment pulcherrimin. *Z Naturforsch* 2009; 64c: 405-410.

Tutulescu FD, Popa A. Wine-growing areas in Oltenia (Romania) major natural sources for the isolation, identification and selection of oenological microorganisms. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 2009; 37 (2): 139-144.

USDA Per capita consumption. Washington: United States Department of Agriculture; 2010.

Úbeda J, Briones AI, Izquierdo PM. Comportamiento in vitro de cepas enológicas de *Saccharomyces cerevisiae* frente a distintos fungicidas empleados en viticultura. *Aliment Equip Tecnol* 1996; 15 (2): 117-120.

Unwin T. Los orígenes de la viticultura, símbolos y misterios. El vino y la viña. *Geografía histórica de la viticultura y el comercio del vino*. Barcelona: Tusquets; 2001. p. 97-138.

Valero E, Moyano L, Millan MC, Medina M, Ortega JM. Higher alcohols and esters production by *Saccharomyces cerevisiae*. Influence of the initial oxygenation of the grape must. *Food Chem* 2002; (78): 57-61.

van der Aa Kuhle A, Jespersen L. Detection and identification of wild yeasts in lager breweries. *Int J Food Microbiol* 1998; 43 (3): 205-213.

van der Merwe CA, van Wyk CJ. The contribution of some fermentation products to the odor of dry white wines. *Am J Enol Vitic* 1981; 32 (1): 41-46.

van Keulen H, Lindmark DG, Zeman KE, Gerlosky W. Yeasts present during spontaneous fermentation of Lake Erie Chardonnay, Pinot Gris and Riesling. *Antonie van Leeuwenhoek* 2003; 83 (2): 149-154.

Vasserot Y, Caillet S, Maujean A. Study of Anthocyanin Adsorption by Yeast Lees. Effect of Some Physicochemical Parameters. *Am J Enol Vitic* 1997; 48 (4): 433-437.

Vaughan-Martini A, Martini A. *Saccharomyces* Meyen ex Rees. En: Kurtzman CP, Fell JW, editores. *The Yeasts, a taxonomic study*. 4<sup>a</sup> ed. Amsterdam: Elsevier Science B.V.; 1998. p. 358-371.

Vaughan-Martini A, Martini A. Facts, myths and legends on the prime industrial microorganism. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1995; 14 (6): 514-522.

Verginer M, Leitner E, Berg G. Production of Volatile Metabolites by Grape-Associated Microorganisms. *J Agric Food Chem* 2010; 58 (14): 8344-8350.

Vernocchi P, Ndagijimana M, Serrazanetti DI, Chaves López C, Fabiani A, Gardini F, *et al.* Use of *Saccharomyces cerevisiae* strains endowed with  $\beta$ -glucosidase activity for the production of Sangiovese wine. *World J Microbiol Biotechnol* 2011; 27 (6): 1423-1433.

Versavaud A, Couroux P, Roulland C, Dulau L, Hallet JN. Genetic diversity and geographical distribution of wild *Saccharomyces cerevisiae* strains from wineproducing area of Charentes, France. *Appl Environ Microbiol* 1995; 61 (10): 3521-3529.

Versini G, Orriols I, Dallaserra A. Aroma Components of Galician Albarino, Loureira and Godello wines. *Vitis* 1994; 33 (3): 165-170.

Veziñhet F, Hallet J, Valade M, Poulard A. Ecological Survey of Wine Yeast Strains by Molecular Methods of Identification. *Am J Enol Vitic* 1992; 43 (1): 83-86.

Vilela-Moura A, Schuller D, Mendes-Faia A, Corte-Real M. Reduction of volatile acidity of wines by selected yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 2008; 80 (5): 881-890.

Viudes A, Peman J, Canton E, Salavert M, Ubeda P, Lopez-Ribot JL, *et al.* Two cases of Fungemia due to *Candida lusitaniae* and a literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21 (4): 294-299.

von Arx JA. On *Endomyces*, *Endomycopsis* and related yeast-like fungi. *Antonie van Leeuwenhoek* 1972; 38 (1): 289-309.

von Arx JA, van der Walt JP. Ophiostomatales and Endomycetales. En: de Hoog GS, Smith MT, Weijman ACM, editores. *The Expanding Realm of Yeast-like Fungi*. 1ª ed. Amsterdam: Elsevier; 1987. p. 167-176.

Walker WF. 5S ribosomal-RNA sequences from ascomycetes and evolutionary implications. *Syst Appl Microbiol* 1985; 6 (1): 48-53.

Walker GM. *Yeast Physiology and Biotechnology*. Chichester: John Wiley and Sons; 1998.

Walter HF, Frehse H, Timme G. Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues III. Extension of the formal description of degradation. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 1993; 46 (3): 265-288.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, editors. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* New York: Academic Press; 1990. p. 315-322.

Whitmyre GK, Ross JH, Lunchick C, Volger B, Singer S. Biphasic dissipation kinetics for dislodgeable foliar residues in estimating postapplication occupational exposures to endosulfan. *Arch Environ Contam Toxicol* 2004; 46 (1): 17-23.

Willis GH, McDowell LL. Pesticide persistence on foliage. *Rev Environ Contam Toxicol* 1987; 100: 23-73.

Wolfe KH, Shields DC. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 1997; 387 (6634): 3-713.

Yalcin SK, Bozdemir MT, Ozbas ZY. Utilization of Whey and Grape Must for Citric Acid Production by Two *Yarrowia lipolytica* Strains. *Food Biotechnology* 2009; 23 (3): 266-283.

Yarrow D. Genus *Saccharomyces* Meyen ex Rees. En: Kreger van Rij NJW, editor. *The Yeasts: A Taxonomic Study* Amsterdam: Elsevier; 1984. p. 379-396.

Yeghen T, Fenelon L, Campbell CK, Warnock DW, Hoffbrand AV, Prentice HG, *et al.* *Chaetomium* pneumonia in patient with acute myeloid leukaemia. *J Clin Pathol* 1996; 49 (2): 184-186.

Yinnon AM, Woodin KA, Powell KR. *Candida lusitanae* infection in the newborn case report and review of the literature. *Pediatr Infect Dis J* 1992; 11 (10): 878-880.

Yurlova NA, de Hoog GS, van den Ende AHGG. Taxonomy of *Aureobasidium* and allied genera. *Stud Mycol* 1999; (43): 63-69.

Yurlova NA, Mokrousov IV, De Hoog GS. Intraspecific variability and exopolysaccharide production in *Aureobasidium pullulans*. *Antonie van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 1995; 68 (1): 57-63.

Zabala O, Íñiguez M, Ayala R, Puras PM. Estudio de residuos de fungicidas desde la uva al vino. *Enol Prof* 1992; 23: 82-92.

Zambonelli C. *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Edagricole, 1988 p. 159-163.

Zamorano M, García MA, Pardo F, Oliva J, Barba A, Navarro S. Influence of benalaxyl and cyproconazole in the viability of yeasts during the fermentation of *monastrell* grapes. *Procc International Symposium of Pesticides in Food in Mediterranean Countries Cagliari* 1999: 175-180.

Zapparoli G, Malacrino P, Suzzi G, Dellaglio F. Influenza delle caratteristiche enologiche sulla successione di *Saccharomyces bayanus* e *S. cerevisiae* nei vini Recioto e Amarone de la Valpolicella. *Riv Vitic Enol* 2003; 1: 43-52.

Zara S, Caboni P, Orro D, Farris GA, Pirisi F, Angioni A. Influence of fenamidone, indoxacarb, pyraclostrobin, and deltamethrin on the population of natural yeast microflora during winemaking of two sardinian grape cultivars. *J Environ Sci Health B* 2011; 46 (6): 491-497.

Zhang D, Spadaro D, Garibaldi A, Gullino ML. Efficacy of the antagonist *Aureobasidium pullulans* PL5 against postharvest pathogens of peach, apple and plum and its modes of action. *Biological Control* 2010; 54 (3): 172-180.

Zhang H, Ran Y, Li D, Liu Y, Xiang Y, Zhang R, *et al.* *Clavispora lusitaniae* and *Chaetomium atrobrunneum* as Rare Agents of Cutaneous Infection. *Mycopathologia* 2010b; 169 (5): 373-380.

Zhang HY, Lee SA, Bradbury JE, Warren RN, Sheth H, Hooks DO, *et al.* Yeasts isolated from New Zealand vineyards and wineries. *Aust J Grape Wine Res* 2010a; 16 (3): 491-496.

Zhang HY, Skelton A, Gardner RC, Goddard MR. *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* reside on oak trees in New Zealand: evidence for migration from Europe and interspecies hybrids. *FEMS Yeast Res* 2010c; 10 (7): 941-947.

Zironi R, Romano P, Suzzi G, Bautista F, Comi G. Volatile metabolites produced in wine by mixed and sequential cultures of *Hanseniaspora guilliermondii* or *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* 1993; 15 (3): 235-238.

Zohary D, Hopf M. *Domestication of Plants in the Old World*. 1<sup>a</sup> ed. New York: Oxford University Press; 1988.

Zohre DE, Erten H. The influence of *Kloeckera apiculata* and *Candida pulcherrima* yeasts on wine fermentation. *Process Biochem* 2002; 38 (3): 319-324.

Zott K, Miot-Sertier C, Claisse O, Lonvaud-Funel A, Masneuf-Pomarede I. Dynamics and diversity of non-*Saccharomyces* yeasts during the early stages in winemaking. *Int J Food Microbiol* 2008; 125 (2): 197-203.