

## **INFLUENCIA DE LA APLICACIÓN DE DISOLUCIONES ACUOSAS DE OZONO EN VIÑA SOBRE LA CALIDAD DE LA UVA Y DEL VINO**

Salinas, M.R.\*(1); Serrano de la Hoz, K.(2); García-Martínez, M.(1); Sánchez-Martínez, J.F. (1); Campayo, A. (2); Zalacain, A.(1); Alonso G.L.(1).

(1) Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Cátedra de Química Agrícola, Avda. de España s/n, 02071 Albacete. \*Rosario.Salinas@uclm.es

(2) BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), Carretera de Las Peñas (CM-3203), Km 3.2, Campo de prácticas – UCLM, 02071, Albacete.

### **RESUMEN**

Los resultados que se muestran son un pequeño avance del efecto de la aplicación de disoluciones acuosas de ozono en viña sobre la calidad de la uva y de sus vinos. Resultan del proyecto INNTER ECOSANVID 2015, cuya principal finalidad es impulsar una nueva estrategia ecológica para mejorar el estado sanitario de las viñas, con especial atención en las enfermedades de madera. Los resultados en relación con la sanidad no serán difundidos hasta finalizar el proyecto, aunque cabe señalar que el estado sanitario de la vid se vio notablemente mejorado por los tratamientos, y que incluso se han recuperado plantas clasificadas con afección extrema de enfermedades de la madera. Además, como han puesto de manifiesto los resultados que se exponen en este trabajo, podemos afirmar que los tratamientos realizados con disoluciones acuosas de ozono no influyen en los parámetros enológicos clásicos de uvas ni de sus vinos. Sin embargo, se observa un incremento importante en determinados polifenoles y aromas varietales, en especial de los que están implicados en una mejor calidad del vino, que es dependiente de la variedad de uva, de la añada y del tipo de tratamiento. Todo ello sugiere que el empleo de ozono no sólo puede ser eficaz para mejorar el estado sanitario del viñedo, sino que también mejoraría la calidad de las uvas y de los vinos.

## INTRODUCCIÓN

En este trabajo se presentan algunos resultados obtenidos sobre el efecto en la calidad de la uva de la aplicación en viñas de disoluciones acuosas de ozono, fruto del proyecto titulado “Intervención ecológica para mejorar el estado sanitario de las viñas y su efecto en la calidad de las uvas y sus vinos”, perteneciente al Programa FEDER INNTERCONECTA (CDTI, EXP: 00093497/ITC-20151026), que se está desarrollando desde julio de 2015 y que finalizará en 2017.

Dicho proyecto es financiado por el consorcio interregional de empresas formado por DCOOP-BACO (coordinador), FINCA ANTIGUA, VIALCON Y NUTRICONTRON, y cuenta con el apoyo científico-técnico de los grupos de investigación de la Cátedra de Química Agrícola de la E.T.S.I. Agrónomos y Montes de Albacete (Universidad de Castilla-La Mancha, UCLM), del Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria del Instituto Técnico Agronómico Provincial de la Diputación de Albacete (ITAP), y con la empresa BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), *spin-off* de la UCLM.

Tiene como objetivo impulsar una nueva estrategia ecológica que mejore el estado sanitario de las viñas, con especial atención en las enfermedades de madera. Dicha estrategia se basa en la construcción de diferentes prototipos de aplicación de disoluciones acuosas de ozono, evaluando su repercusión en la calidad de las uvas y sus vinos; su acrónimo es INNTER ECOSANVID 2015.

El ozono es una forma natural del oxígeno, y su forma triatómica se genera a partir de tres moléculas de oxígeno mediante una reacción endotérmica y no espontánea en condiciones estándar. Es parcialmente soluble en agua, y como ocurre con la mayoría de los gases, aumenta su solubilidad si disminuye la temperatura. Las fuerzas de atracción entre los tres átomos de oxígeno son muy pequeñas, por lo que es muy inestable. Tiene un elevado potencial redox que lo hace un poderoso oxidante químico, de ahí su potente acción germicida y su rápida descomposición en oxígeno. Su principal

característica es que se consume inmediatamente en el proceso y no deja residuos tóxicos, propiedad única del ozono denominada autodescomposición (Langlais et al., 1991). Su corta vida media no permite su almacenamiento y distribución como cualquier otro gas industrial, sino que debe generarse in situ, a partir de aire o de oxígeno puro mediante una descarga eléctrica de alto voltaje (Palou et al., 2004). Disuelto en agua es completamente inocuo y su vida media a pH neutro y a 20°C varía entre 20 y 160 minutos, aumentando su inestabilidad cuanto mayor es el pH. En disolución su modo de acción es como tal molécula de ozono, pero también como radicales libres hidroxilo, que constituyen uno de los más potentes antioxidantes, incluso más que el propio ozono, aunque su vida media es del orden de microsegundos.

La acción germicida del ozono es de sobra conocida y desde hace mucho tiempo se usa para combatir tanto hongos como bacterias y virus, siendo además eficaz contra esporas difíciles de erradicar por otros agentes (Langlais et al., 1991; Orta et al., 2008; Rojas-Valencia et al., 2008; Stockburger, 2002), lo cual explica su amplia utilización. La acción más conocida del ozono es la protección frente a la radiación ultravioleta del sol, pero su uso más tradicional ha sido para el tratamiento de aguas en donde posee la mayor acción desinfectante, eliminando gérmenes, algas, restos de plaguicidas orgánicos, materia orgánica en general, colores y olores desagradables, todo ello sin dejar residuos tóxicos (Cosaemaro, 2015). Es también conocido el empleo de ozono médico, habiéndose incluido la ozonoterapia en la cartera de servicios de la Unidad del Dolor (SEOT, 2015), en tratamientos odontológicos para abordar las infecciones bucales y en tratamientos estéticos.

Su empleo en el Sector Agroalimentario es cada vez más demandado, debido al interés creciente por la utilización de tratamientos ecológicos no agresivos con el medio ambiente. Los tratamientos más utilizados son para reducir la incidencia de la podredumbre en frutos y prolongar su almacenamiento: aceituna (Weiland et al., 2011), cítricos (Palou et al., 2004), fresas (Pérez et al., 1999), zanahorias, manzanas, uvas (Sharpe et al., 2009),

uva de mesa (Cayuela, 2009), etc. Se debe tener presente que el uso de ozono, en estado gaseoso o acuoso, para tratamientos postcosecha de frutas y vegetales ha sido reconocido en EE.UU como producto GRAS (Generally Recognized As Safe).

También se ha usado en Agricultura con resultados muy interesantes en lechugas, en donde además de reducir la carga microbiana cuando se regaron con aguas residuales, se observó un aumento del tamaño de hojas y de raíces (Rojas-Valencia et al., 2008). Éste mismo efecto se puso de manifiesto en tomates y en pepinos (Fujiwara et al., 2009; Ohashi-Kaneko et al., 2009).

En lo que respecta al cultivo de la vid para vinificación, Raio et al. (2015), demostraron que los tratamientos con agua ozonizada en hojas y racimos estimularon el sistema inmunitario de la planta y redujeron el impacto del uso de plaguicidas. Por su parte, Pierron et al. (2015), observaron una importante reducción de *Phaeoacremonium aleophilum*, en esquejes de vid inoculados con dicho hongo.

El efecto que tiene el ozono sobre uvas de vinificación ha sido poco estudiado. No obstante, cuando éste se ha usado en postcosecha para reducir el uso de sulfuroso, se ha puesto de manifiesto un efecto positivo sobre ciertos polifenoles relacionados con la calidad del vino y con su capacidad de extracción (Bellicontro et al., 2017; Carbone and Mencarelli, 2015; Paissoni et al., 2017). Así mismo, se ha observado que reduce la población de levaduras indígenas y que favorece los aromas positivos en el vino (Cravero et al., 2016).

Los resultados que a continuación presentamos del proyecto INNTER ECOSANVID 2015, deben considerarse como un primer avance del mismo relacionados exclusivamente con la calidad de las uvas y de los vinos procedentes de las cepas tratadas con la disolución acuosa de ozono. Cabe señalar que el estado sanitario de la vid se vio notablemente mejorado por los tratamientos, y que incluso se han recuperado plantas clasificadas con afección extrema de enfermedades de la madera. Sin embargo, los estudios acerca de

la aplicación directa de ozono sobre la vid son escasos, y no se conoce a qué nivel puede afectar a la calidad de la uva, ni tampoco al desarrollo de la fermentación ni a la calidad del vino, que constituyen el objetivo de este trabajo.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Se seleccionaron parcelas en diversas zonas de la región de Castilla-La Mancha, en las que se realizó el seguimiento de más de 600 plantas/año, de diferentes variedades de uva. Las parcelas pertenecen a las empresas socias del proyecto DCOOP-BACO, FINCA ANTIGUA, VIALCON. En cada parcela de cada variedad se identificaron las plantas con distintos grados de afección sanitaria, en especial de las enfermedades de la madera, y se clasificaron según el avance de dicha enfermedad. La evolución del estado sanitario se realizó mediante valoración visual y analizando los principales hongos patógenos de la madera.

La empresa NUTRicontrol desarrolló prototipos para la generación de ozono en la propia viña, preparación de sus disoluciones y aplicación a la cepa. Durante las diferentes cosechas se hicieron diferentes tipos de tratamientos con dicha disolución, aunque en este trabajo sólo se comentarán algunos resultados de las aplicaciones que se realizaron a la parte aérea de las plantas, tanto afectadas como sanas, y de las que tuvieron lugar a través del sistema de riego, combinadas o no con las aplicaciones aéreas.

A lo largo de la maduración se tomaron muestras de uva representativas de cada variedad y tratamiento, así como de uvas no tratadas, y en ellas se analizaron tanto los parámetros enológicos convencionales (DOCE, 1990), como el índice de polifenoles totales (IPT, Singleton y Rossi, 1965), la madurez fenólica (Saint-Cricq et al., 1998), el índice de potencial aromático varietal (IPAV, Serrano et al., 2015), así como los compuestos fenólicos y aromáticos pormenorizados mediante HPLC-DAD-MS y SBSE-GC-MS de acuerdo a los

métodos de Pardo-García et al., (2014) y Martínez-Gil et al. (2013) respectivamente.

A lo largo de todas las cosechas, las empresas realizaron vinificaciones utilizando el sistema tradicional de vinificación en tinto y en blanco de la zona, aunque los resultados que a continuación se exponen proceden de las vinificaciones a escala de laboratorio realizados por los autores de este artículo en las instalaciones de la UCLM en la ETSIAM de Albacete. En todos los vinos se usaron las mismas levaduras comerciales, y a lo largo de la fermentación alcohólica se realizó un seguimiento a través de medidas diarias de °Brix, densidad y temperatura hasta que se dio por concluida. En los vinos tintos se favoreció la fermentación maloláctica empleado bacterias comerciales, las mismas en todos ellos y controlando la formación de ácido láctico.

En los vinos acabados, tanto blancos como tintos, se midieron los parámetros enológicos convencionales (DOCE, 1990), el IPT, el color CIELAB, el IPAv y los compuestos fenólicos y aromáticos pormenorizados (HPLC-DAD-MS y SBSE-GC-MS respectivamente) por los métodos indicados anteriormente.

Todos los vinos se elaboraron en duplicado y los análisis de uvas y vinos se realizaron en duplicado o en triplicado dependiendo del método analítico empleado. El análisis estadístico de los datos se realizó usando el ANOVA.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

A continuación, se muestran algunos de los resultados más significativos cuando los tratamientos se realizaron a cepas sanas en su parte aérea, a través del sistema de riego (radicular), o mediante una combinación de riego y aérea.

Las uvas de las distintas variedades, tratadas con la disolución acuosa de ozono, se comportaron de igual manera que el control, con respecto a los parámetros enológicos clásicos. Sin embargo, se encontraron diferencias en relación con los compuestos fenólicos y aromáticos, que dependieron de la variedad de uva y del año de cosecha. A modo de ejemplo se muestra en la Figura 1 el contenido de antocianos totales en variedades tintas, y en la Figura 2 la maduración aromática de las mismas variedades tintas, y de otras blancas, en el momento de la vendimia. Se puede ver que en uvas Bobal y Tempranillo hay un incremento en antocianos, pero en Cabernet Sauvignon los contenidos fueron similares a los de las uvas procedentes de cepas no tratadas (control). También se puso de manifiesto un importante aumento del índice de potencial aromático varietal (IPAv) en uvas Bobal, Cabernet Sauvignon y Macabeo, mientras que se mantuvo constante en Tempranillo y disminuyó significativamente en Airén.

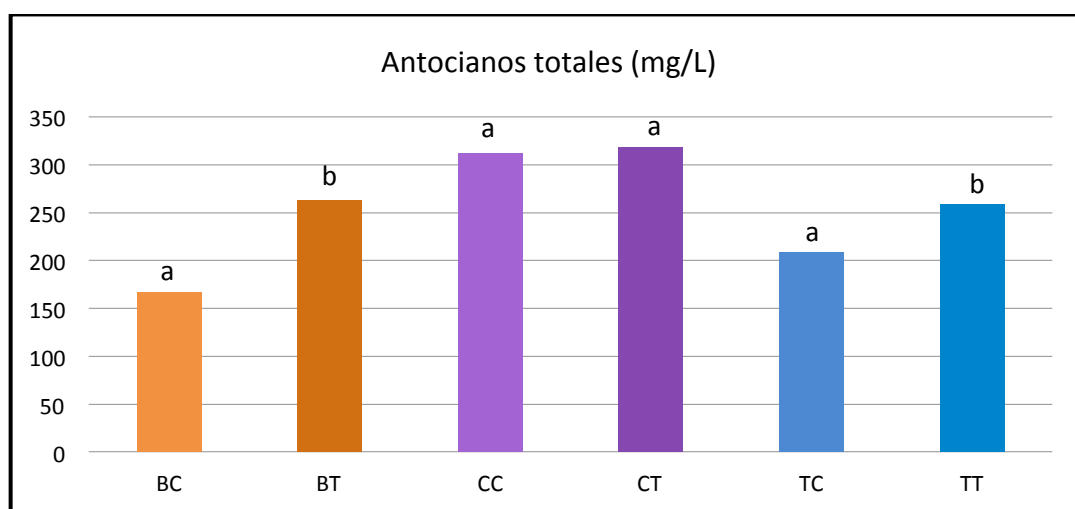


Figura 1. Concentración de antocianos totales (mg/L) en el momento de vendimia de uvas de las variedades Bobal (B), Cabernet Sauvignon (C) y Tempranillo (T), sometidas a un tratamiento aéreo (T) y en uvas control (C). Letras diferentes para una misma variedad indican diferencias significativas entre control y tratamiento al nivel de probabilidad del 99,95%.

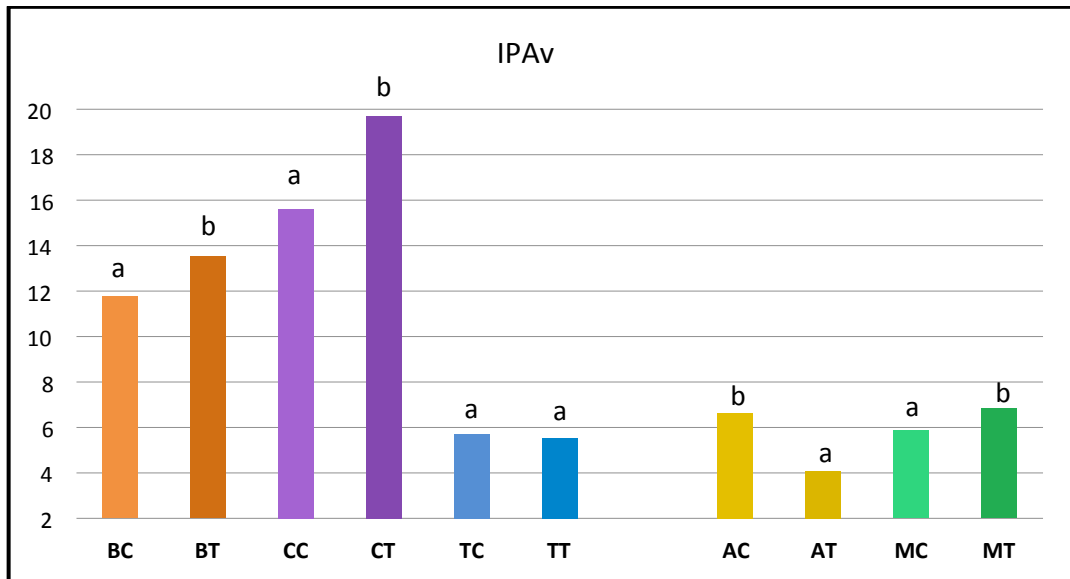


Figura 2. Índice de potencial aromático varietal (IPAv) en el momento de vendimia de uvas de las variedades Bobal (B), Cabernet Sauvignon (C), Tempranillo (T), Airén (A) y Macabeo (M) sometidas a un tratamiento aéreo (T) y en uvas control (C). Letras diferentes para una misma variedad indican diferencias significativas entre control y tratamiento al nivel de probabilidad del 99,95%.

En cuanto a la vinificación de las distintas variedades de uva, a lo largo de la fermentación alcohólica tampoco se observaron diferencias significativas respecto a los correspondientes controles. Por tanto, la fermentación alcohólica no se vio afectada por los tratamientos realizados en viña con las disoluciones de ozono.

En cuanto a los vinos, en varios de los parámetros analizados, se encontraron diferencias entre los tratamientos y el control. Así, en los de Cabernet Sauvignon, el tratamiento con ozono aplicado mediante riego produjo el mejor color (Figura 3), posiblemente debido a su mayor contenido en polifenoles (Figura 4).



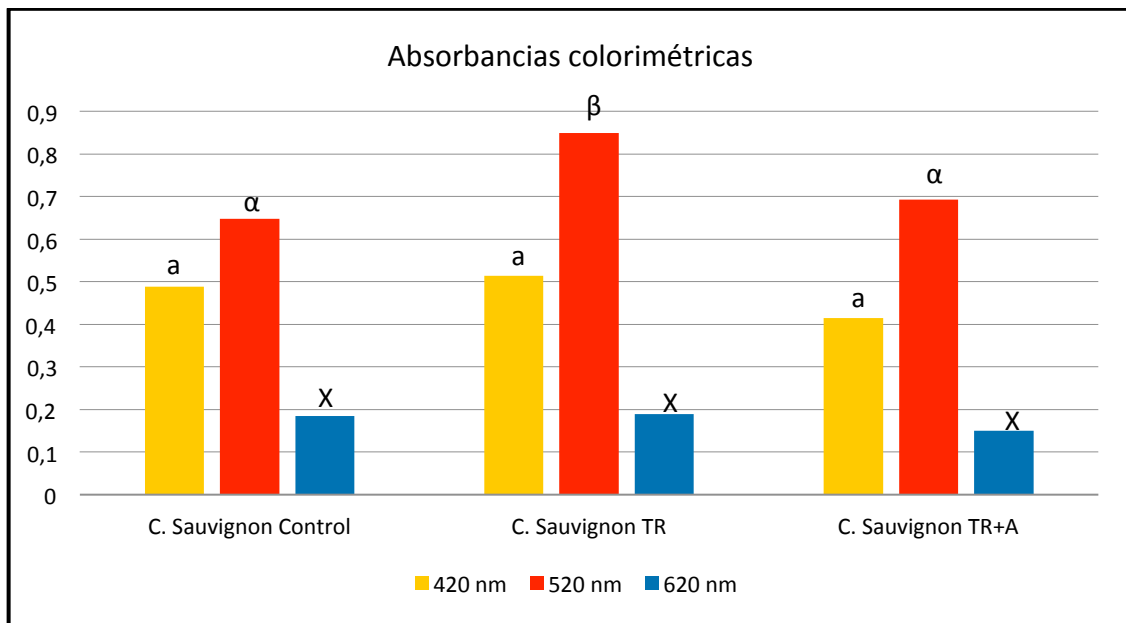


Figura 3. Absorbancias colorimétricas de vinos Cabernet Sauvignon procedentes de cepas sometidas a un tratamiento de riego (TR) y combinado riego y aéreo (TR+A). Letras diferentes para una misma variedad indican diferencias significativas entre control y tratamientos al nivel de probabilidad del 99,95%.

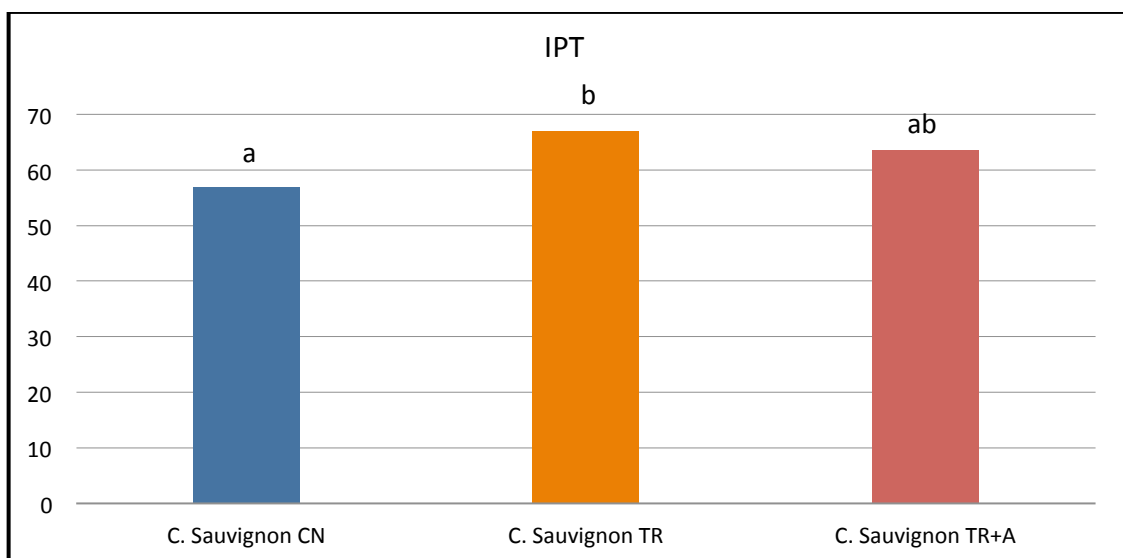


Figura 4. Índice de polifenoles totales (IPT) en los vinos Cabernet Sauvignon procedentes de cepas sometidas a un tratamiento de riego (TR) y combinado riego y aéreo (TR+A). Letras diferentes para una misma variedad indican diferencias significativas entre control y tratamientos al nivel de probabilidad del 99,95%.

Las antocianinas son las principales moléculas polifenólicas implicadas en el color de los vinos tintos y en su estabilidad. El análisis pormenorizado de

estos vinos reveló un importante aumento de varias antocianinas por efecto de los tratamientos con la disolución de ozono (Figura 5). Éste es el caso de la malvidin-3-O-glucósido, que es la mayoritaria, cuyo contenido fue muy superior al control en el caso de los vinos procedentes de cualquiera de los tratamientos usados, en especial cuando éste se hizo solamente a través del riego.

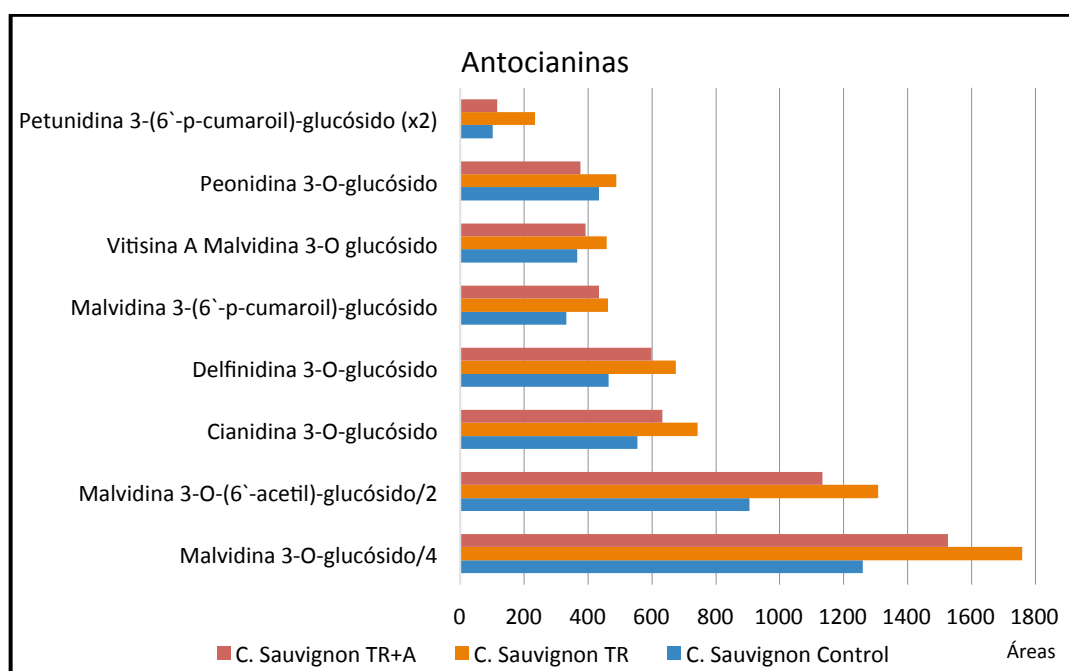


Figura 5. Contenido en antocianinas (expresado como área) en los vinos Cabernet Sauvignon procedentes de cepas sometidas a un tratamiento de riego (TR) y combinado riego y aéreo (TR+A).

Con respecto a la composición aromática de los vinos, se observaron diferencias tanto a nivel cualitativo como cuantitativo en las principales familias de aromas. En la Figura 6 se muestra el contenido de aromas varietales en vinos de Airén y se puede observar que cualquiera de los tratamientos con ozono influyó sobre estos compuestos. Es de destacar el importante aumento de farnesol, ya que es una constante en todos los vinos procedentes de estos tratamientos, independientemente de la variedad de uva y del año de cosecha.

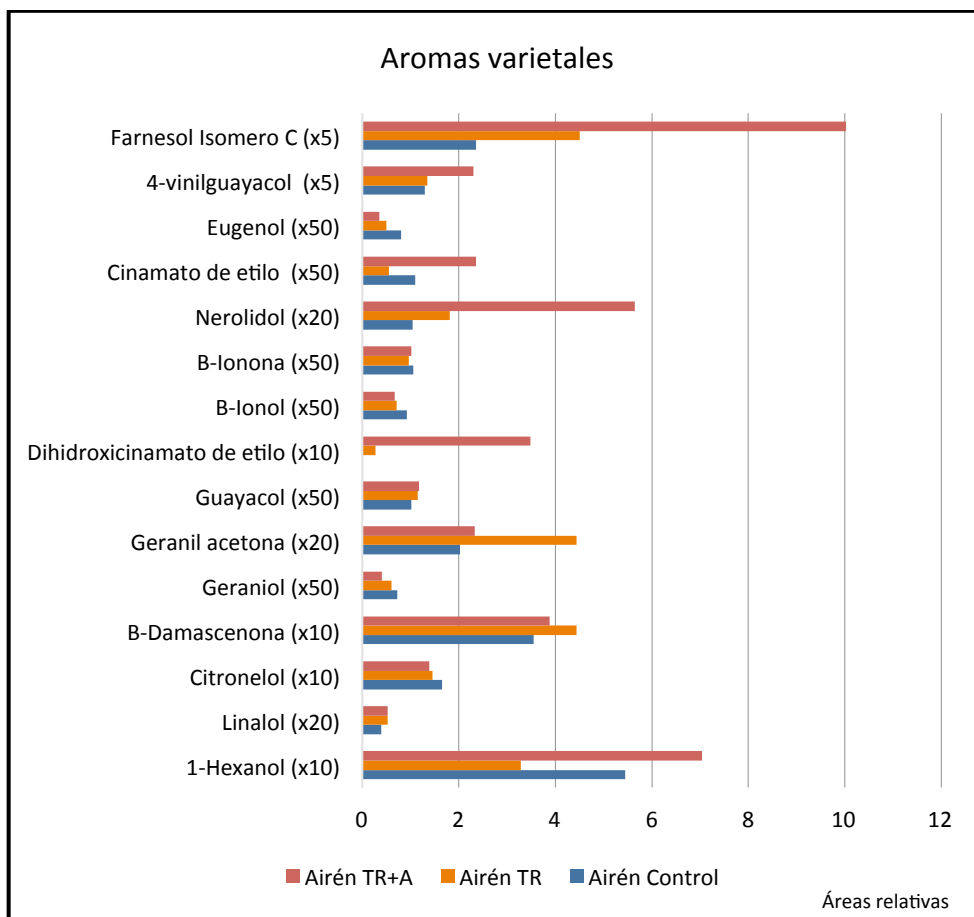


Figura 6. Contenido de aromas varietales (expresado como áreas relativas) en los vinos Airén procedentes de cepas sometidas a un tratamiento de riego (TR) y combinado riego y aéreo (TR+A).

Como conclusión podemos decir que, los tratamientos realizados con disoluciones acuosas de ozono, no influyen en los parámetros enológicos clásicos de uvas ni vinos. Sin embargo, se observa un incremento en determinados polifenoles y aromas varietales, en especial de los que están implicados con una mejor calidad del vino, que es dependiente de la variedad de uva, de la añada y del tipo de tratamiento. Todo ello sugiere que el empleo de ozono no sólo puede ser eficaz para mejorar el estado sanitario del viñedo, sino que también mejoraría la calidad de las uvas y de los vinos.

## AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a las empresas del proyecto INNTER ECOSANVID 2015 (FEDER-CDTI, EXP: 00093497/ITC-20151026): DCOOP-BACO, FINCA ANTIGUA, VIALCON, NUTRICONROL y ARTICA, y al personal de las mismas, su implicación en éste trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

Bellincontro, A., Catelli, C., Cotarella, R., & Mencarelli, F. (2017). Postharvest ozone fumigation of Petit Verdot grapes to prevent the use of sulfites and to increase anthocyanin in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23, 200-206.

Carbone, K., y Mencarelli, F. (2015). Influence of short-term postharvest ozone treatments in nitrogen or air atmosphere on the metabolic response of white wine grapes. *Food and Bioprocess Technology*, 8(8), 1739–1749.

Cayuela, J.A., Vazquez, A., Perez, A.G., Garcia, J.M. (2009). Control of table grapes postharvest decay by ozone treatment and resveratrol induction. *Food Science and Technology International*, 15 (5), 495-502.

Cosemarozono (2015). Higiene alimentaria. [Consulta: 03/05/2015] <http://www.cosemarozono.com/servicios/higiene-alimentaria/>

Cravero, F., Englezos, V., Rantsiou, K., Torchio, F., Giacosa, S., Segade, S.R., Gerbi, V., Rolle, L., Cocolin, L., (2016). Ozone treatments of post harvested wine grapes: impact on fermentative yeasts and wine chemical properties. *Food Res. Int.* 87, 134-141.

DOCE (1990). Commission Regulation VO 2676/90 concerning the establishment of common analytical methods in the sector of wine. *Official Journal of the European Community*, L272 (3), 1-192.

Fujiwara, K., Fujii, T., Park, J.-S., (2009). Comparison of foliar spray efficacy of electrolyt-ically ozonated water and acidic electrolyzed oxidizing water for controlling powdery mildew infection on cucumber leaves. *Ozone Sci. Eng.* 31 (1), 10–14.

Langlais, B., D. A. Reckhow, and D. R. Brink. (1991). *Ozone in water treatment-application and engineering*. American Water Works Association Research Foundation, Denver.

Ohashi-Kaneko, K., Yoshii, M., Isobe, T., Park, J.-S., Kurata, K., Fujiwara, K., (2009). Nutrient solution prepared with ozonated water does not damage early growth of hydroponically grown tomatoes. *Ozone Sci. Eng.* 31 (1), 21–27.

Orta de Velásquez, M.T., N. Rojas, and A. Ayala. (2008). Wastewater Disinfection Using Ozone to Remove Free-Living, Highly Pathogenic Bacteria and Amoebae. *Ozone: Science and Engineering* 30(5), 367–375.

Paissoni, M. A., Río Segade, S., Giacosa, S., Torchio, F., Cravero, F., Englezos, V., et al. (2017). Impact of post-harvest ozone treatments on the skin phenolic extractability of red winegrapes cv Barbera and Nebbiolo (*Vitis vinifera* L.). *Food Research International*, 98, 68-78.

Palou, LL., Smilanick, J.L., Crisosto, C.H. (2004). Conservación frigorífica de cítricos en atmósferas ozonizadas: efecto sobre las enfermedades de postcosecha. *Levante Agrícola. Especial postcosecha*. 321-328.

- Pérez, A.G., Sanz, C., Ríos, J.J., Olías, R. y Olías, J.M. (1999). Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47, 1652-1656.
- Pierron, R.J., Pages, M., Couderc, C., Compant, S., Jacques, A., Violleau, F., (2015). In vitro and in planta fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*. *Sci. Hortic.* 189, 184-191.
- Martínez-Gil, A.M., Pardo-García, A.I., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R. (2013). Lavandin hydrolat applications to Petit Verdot vineyards and their impact on their wine aroma compounds. *Food Research International*, 53, 391-402.
- Pardo-García, A.I., Martínez-Gil, A.M., Cadahia, E., Pardo, F., Alonso, G.L., Salinas, M.R. (2014b). Oak extract application to grapevines as a plant biostimulant to increase wine polyphenols. In: *Food Research International*. 55, 150-160.
- Raio, A., Feliciani, A., Ferri, V., Carboni, C. (2015). Prove di difesa integrata del vigneto con acque ozonizzata ed elettrolizzata. Premio Nazionale SIVE "G. VERSINI" 2015.
- Rojas-Valencia, M.N., Orta de Valásquez, M.T., García-Ramírez, N., Martínez Zamudio, M. y Franco, V. (2008). Removal of microorganisms present in lettuces and soil irrigated with treated wastewaters. Wiley-VCH. 2008.
- Sharpe, D., Fan, L., McRae, K., Walker, B., MacKay, R., Doucette, C., (2009). Effects of ozone treatment on *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* in relation to horticultural product quality. *J. Food Sci.* 74, 250–257.
- Saint-Cricq de Gaulejac, N., Vivas, N., & Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue Française d'Oenologie* 173, 22-25.
- Serrano de la Hoz, K., Carmona, M., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R. The varietal aroma potential index (IPAv): a tool to evaluate the quality of grapes and wines, white and red. 37 th World Congress of Vine and Wine, 9-14 Noviembre 2014, Mendoza, Argentina. ISBN: 979-10-91799-33-1 BIO Web of Conferences.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A., Jr. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16, 144-158.
- Stockburger, D. (2002). *Ozon-Therapie*. Foitzick Verlag. Junio de 2002. Alemania.
- SEOT (2015). El ozono en medicina. Sociedad Española de Ozonoterapia.[Consulta 02/06/2015]. <http://www.seot.es/content/el-ozono-en-medicina>
- Weiland, C.M., Yousfi, K., Martínez, M.C., Sandonis, V., García, J.M. (2001). El ozono retrasa la prodredumbre de la aceituna de Molino durante su conservación en frío. Foro de la Industria Oleícola, Tecnología y Calidad: IND-19. XV Simposio Científico-Técnico del aceite de oliva (EXPOLIVA). 11-13 Mayo. Jaén, España.