



UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROFORESTAL Y GENÉTICA

**EVALUACIÓN DE LOS SARMIENTOS DE PODA
PARA SER USADOS COMO UNA NUEVA FUENTE
DE ADITIVOS ENOLÓGICOS**

**EVALUATION OF VINE-SHOOTS AS A NEW
SOURCE OF ENOLOGICAL ADDITIVES**

Memoria presentada por

Cristina Cebrián Tarancón

para optar al título de Doctor por la Universidad de Castilla-La Mancha
en Enología, Viticultura y Sostenibilidad con Mención Internacional

Directoras:

Amaya Zalacain Aramburu

M. Rosario Salinas Fernández

Albacete, 2019

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

Este trabajo de Tesis Doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos:

Cebrián, C., Sánchez-Gómez, R., Salinas, M.R., Alonso, G.L., Zalacain, A. *Effect of post-pruning vine-shoots storage on the evolution of high-value compounds.* En: *Industrial Crops and Products* 2017. Vol. 109. Pág. 730-736. ISSN: 0926-6690. Factor de impacto: 3.849. *Primer cuartil.*

Cebrián-Tarancón, C., Sánchez-Gómez, R., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutierrez, I., Mena-Morales, A., García-Romero, E., Salinas, M.R., Zalacain, A. *Vine-Shoot Tannins: Effect of Post-pruning Storage and Toasting Treatment.* En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2018. Vol. 66 (22). Pág. 5556-5562. ISSN: 0021-8561. Factor de impacto: 3.412. *Primer cuartil.*

Cebrián-Tarancón, C., Sánchez-Gómez, R., Salinas, M.R., Alonso, G.L., Oliva, J., Zalacain, A. *Toasted vine-shoot chips as enological additive.* En: *Food Chemistry* 2018. Vol. 263. Pág. 96-103. ISSN: 0308-8146. Factor de impacto: 4.946. *Primer cuartil.*

Cebrián-Tarancón, C., Sánchez-Gómez, R., Carot, J. M., Zalacain, A., Alonso, G., Salinas, M. R. *Assessment of vine-shoots in a model wine as enological additives.* En: *Food Chemistry* 2019. Vol. 288 Pág. 86-95. ISSN: 0308-8146. Factor de impacto: 4.946. *Primer cuartil.*

Cebrián-Tarancón, C., Sánchez-Gómez, R., Cabrita, M. J., García, R., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R. *Winemaking with vine-shoots. Modulating the composition of wines by using their own resources.* En: *Food Research International* 2019. Vol. 121 Pág. 117-126. ISSN: 0963-9969. Factor de impacto: 3.52. *Primer cuartil.*

FINANCIACIÓN

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación recibida por:

El Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) en el Programa Estatal de Investigación, Desarrollo e Innovación orientada a los Retos de la Sociedad del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016, convocatoria 2015, por la concesión del proyecto de investigación titulado *“Aprovechamiento de los sarmientos para ser usados como nueva fuente de aditivos enológicos y de productos agroquímicos naturales con propiedades bioestimulantes y fitosanitarias para el viñedo.(SAGROVID)”* (Ref. AGL2015-65133-C2-1-R), cofinanciado con fondos FEDER de la Unión Europea. 1 de enero de 2016 hasta 31 de diciembre de 2018.

ESTANCIA INTERNACIONAL

La estancia Internacional se realizó durante un periodo de tres meses, comprendido entre noviembre de 2017 y febrero de 2018, en el Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) de la Universidad de Évora (Évora, Portugal) bajo la supervisión de la Dra. Maria João Cabrita.

RESEARCH FUNDING

This Doctoral Thesis has been possible thanks to the funding received by the following organisms:

Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO) in the State Research, Development and Innovation Program oriented to the Challenges of the Society of the State Plan for Scientific and Technical Research and Innovation 2013-2016, call 2015, for the concession of the research project entitled "*Use of vine-shoots as a new source of enological additives and natural agrochemicals with biostimulant and phytosanitary properties for the vineyard.(SAGROVID)*" (Ref: AGL2015-65133-C2-1-R), co-financed by the European Union's FEDER program, January, 1st 2016 to December, 31th 2018.

INTERNATIONAL MOBILITY

The International stay was carried out for three months, between November 2017 and February 2018, at the Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas (ICAAM) of University of Évora (Évora, Portugal) by Dra. Maria João Cabrita supervision.

Agradecimientos

Llegados a este punto y con una visión global de todo lo vivido, tengo el firme convencimiento de que nada de esto hubiera sido posible sin el apoyo de todas las personas que, de una forma u otra, me han dado la mano durante el todo camino.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directoras, Amaya y Rosario, por brindarme la oportunidad de llegar hasta aquí y no dejar que me sintiera perdida en ningún momento durante toda la Tesis. Vuestras diferencias se complementan tan bien que no podéis hacer mejor equipo (a pesar de volverme loca de vez en cuando ... ¡ja, ja!). Gracias.

A Gonzalo, por despertar todavía más, si cabe, mi curiosidad y espíritu crítico.

Gracias a los tres por transmitirnos día a día vuestra pasión por la investigación y ser los pilares que mantienen la Cátedra de Química Agrícola.

A Ro, por tu incalculable ayuda y paciencia conmigo durante el comienzo de la tesis.

A mis chicas del laboratorio, Natalia, Candi, Ana, Kortés, Esther y Merce. Sois el mejor regalo de esta etapa, gracias por acogerme con los brazos abiertos desde el primer día.

A Maria, Raquel y Nuno, por vuestra amabilidad durante mi estancia en Évora, siempre con una sonrisa y disponibilidad plena ante cualquier duda. No me olvido de vuestro consejo: "*Calma Cristina, Calma. Que el secreto de la cromatografía es la paciencia*", (que gran verdad... ¡ja, ja!).

A mi pequeña gran revolución, María José, por tu apoyo incondicional y confianza en mí, a veces incluso más que yo.

Al que ha sido mi principal compañero de viaje durante toda esta etapa, Aaron, gracias por tu paciencia y comprensión.

A mi hermano, Daniel, por estar siempre ahí, a tu manera, tan única y especial.

A mis padres, Juan Miguel y Juani, gracias, por tanto. Sin vosotros y vuestro esfuerzo nunca hubiera podido llegar hasta aquí.

A mis abuelos, por haber estado tan presentes en mi vida, siendo siempre la máxima expresión de amor y cariño. Gracias por demostrarme día a día lo orgullosos que estáis de mí. Abuelo Juan, aunque tu no lo sepas, eres el culpable de mi espíritu investigador 😊.

En especial:











A mi abuelo Juan Miguel, agricultor incansable.

Por su cariño infinito, humildad y honestidad.






Gracias por todo lo que me enseñaste.

ÍNDICE

INDEX

| | | | | |
|---|----|---|----|---|
| 1. RESUMEN / ABSTRACT | 3 |  | 6 |  |
| 2. JUSTIFICACIÓN / JUSTIFICATION | 11 |  | 14 |  |
| 3. INTRODUCCIÓN / INTRODUCTION | | | 17 |  |
| 3.1. Vine-shoot wastes generation. Problematic. | | | 19 | |
| 3.2. Vine-shoot chemical composition. | | | 20 | |
| 3.3. Vine-shoot uses. | | | 27 | |
| 3.4. Other woods within wine industry: Oak. | | | 30 | |
| 3.4.1. Alternative systems to oak. | | | 34 | |
| 4. OBJETIVOS / OBJECTIVES | 39 |  | 40 |  |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS / MATERIALS AND METHODS | 43 |  | | |
| 5.1. Material vegetal: Sarmientos. | 43 | | | |
| 5.1.1. Análisis de residuos de plaguicidas. | 44 | | | |
| 5.2. Extracción de compuestos de interés del sarmiento: Agotamiento. | 46 | | | |
| 5.3. Tostado del sarmiento. | 49 | | | |
| 5.3.1. Selección de la temperatura de tostado. | 49 | | | |
| 5.3.2. Proceso de tostado. | 49 | | | |
| 5.4. Vino modelo. | 50 | | | |
| 5.5. Elaboración de vinos blancos y tintos. | 51 | | | |
| 5.6. Caracterización química del sarmiento y de los vinos. | 56 | | | |
| 5.6.1. Composición fenólica en sarmientos y vinos. | 56 | | | |
| 5.6.1.1. Compuestos fenólicos totales. Índice de polifenoles totales (IPT). | 56 | | | |
| 5.6.1.2. Composición fenólica pormenorizada. | 56 | | | |
| 5.6.2. Composición tánica en sarmientos y vinos. | 59 | | | |
| 5.6.2.1. Taninos totales. Precipitación con metilcelulosa. | 59 | | | |
| 5.6.2.2. Taninos pormenorizados en sarmientos. | 59 | | | |
| 5.6.3. Determinación de compuestos volátiles de sarmientos y de vinos. | 62 | | | |
| 5.6.4. Capacidad antioxidante en vinos. | 65 | | | |
| 5.6.5. Parámetros generales específicos de uvas y vinos. | 66 | | | |
| 5.7. Análisis sensorial. | 66 | | | |
| 5.8. Análisis estadístico. | 71 | | | |
| 6. PLAN DE TRABAJO / WORK PLAN | 75 |  | 77 |  |



| | | |
|---|-----|---|
| 7. RESULTADOS / RESULTS | 83 |  |
| 7.1. Caracterización de los sarmientos post-poda. | 83 | |
| 7.1.1. Introducción. | 85 | |
| 7.1.2. Artículos publicados. | 88 | |
| 7.1.2.1. Resumen Artículo I. | | |
| <i>Effect of post-pruning vine-shoots storage on the evolution of high value compounds.</i> | 89 | |
| 7.1.2.2. Resumen Artículo II. | | |
| <i>Vine-Shoot Tannins: Effect of Post-pruning Storage and Toasting treatment.</i> | 92 | |
| 7.1.2.3. Resumen Artículo III. | | |
| <i>Toasted vine-shoot chips as enological additive.</i> | 95 | |
| 7.1.3. Resultados no publicados: Residuos de plaguicidas. | 99 | |
| 7.2. Aplicación enológica de los sarmientos de poda. | 103 | |
| 7.2.1. Introducción. | 105 | |
| 7.2.2. Artículos publicados. | 107 | |
| 7.2.2.2. Resumen Artículo IV. | | |
| <i>Assessment of vine-shoots in a model wine as enological additive.</i> | 108 | |
| 7.2.2.3. Resumen Artículo V. | | |
| <i>Winemaking with vine-shoots. Modulating the composition of wines by using their own resources.</i> | 111 | |
| 7.2.3. Resultados no publicados: Análisis sensorial. | 114 | |
| 8. DISCUSIÓN CONJUNTA Y PERSPECTIVAS DE FUTURO / RESULTS OVERVIEW AND FURTHER INSIGHTS | 123 |   |
| 9. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS | 133 |   |
| 10. BIBLIOGRAFÍA | 141 | |
| 11. OTRAS CONTRIBUCIONES | 159 | |



1.

RESUMEN

ABSTRACT

La problemática generada por la gran cantidad de sarmientos que anualmente son quemados o abandonados en los viñedos, y la necesidad de buscarles una nueva salida, ha sido abordada esta Tesis Doctoral, mediante el estudio de su composición química y su uso como aditivos enológicos.

El almacenamiento durante 6 meses de los sarmientos de poda, tanto de la variedad Airén como Cencibel, incrementa su fracción minoritaria constituida por compuestos fenólicos y aromáticos. Entre los compuestos fenólicos estudiados, cabe destacar el importante aumento del *trans*-resveratrol, especialmente en la variedad Airén, el cual es conocido por su efecto positivo en la salud. Entre los compuestos aromáticos destaca el incremento de la vainillina, por su importancia en el sector enológico, especialmente en Cencibel. El estudio de su fracción tánica, reveló por primera vez, que los taninos de los sarmientos son proantocianidinas, constituidas principalmente por procianidinas, con un grado de polimerización próximo a 3 y un porcentaje de galoilación cercano a 10 en Airén y a 9 en Cencibel.

Además, se ha demostrado que cuando los sarmientos son sometidos a un proceso de tostado a 180°C durante 45 minutos, se modifica notablemente su composición química. Es significativo el aumento de compuestos volátiles con interés enológico como, por ejemplo, vainillina y guaiacol, aunque se observa un ligero descenso del *trans*-resveratrol. El proceso de tostado también eliminó todos los residuos de los plaguicidas usados habitualmente en viticultura, si bien el propio almacenamiento disminuyó su contenido hasta valores inferiores a sus LMRs en uvas.

Por todo ello, la composición química de los sarmientos de poda tras 6 meses de almacenamiento, y una vez tostados, permite que estos puedan ser propuestos como nuevos aditivos enológicos.



Para ello, se realizó un estudio previo donde se adicionaron distintos sarmientos a vinos modelo para conseguir la mayor transferencia posible de compuestos de interés. Las características de los sarmientos estudiadas fueron: tostados o sin tostar, formato, dosis y tiempo de maceración adecuados. Los resultados revelaron que, indistintamente de la variedad, la mayor liberación de compuestos tiene lugar cuando los sarmientos son tostados y añadidos en una dosis de 12 g/L. Sin embargo, los de la variedad Airén transfieren mayor cantidad de compuestos cuando se aportan en formato granulado, mientras que los sarmientos de Cencibel lo hacen cuando se utilizan en formato chip, siendo necesario menor tiempo de maceración en Airén (21 días) que en Cencibel (35 días).

Finalmente, y para poder proponer los sarmientos como aditivos enológicos desde un punto de vista objetivo y real, los sarmientos tostados de ambas variedades, Airén y Cencibel, se adicionaron en los dos formatos propuestos, a los vinos de su misma variedad en diferentes momentos de la vinificación. En comparación con el vino control, los sarmientos contribuyen al vino con importantes concentraciones de vainillina en los vinos Cencibel, cuando estos se adicionaron en formato granulado después de la fermentación maloláctica. Mientras que en los vinos Airén cuando se utilizó el formato granulado, se observó una elevada transferencia de *trans*-resveratrol, independientemente del momento de adición. Además, la permanencia en botella durante 6 meses influyó positivamente en el perfil sensorial de estos vinos. Así, los vinos tintos mejor calificados fueron los que estuvieron en contacto con el formato granulado después de la fermentación maloláctica y con el formato chip en la etapa de maceración. En el caso de los vinos blancos, el vino mejor valorado fue el que estuvo en contacto con el formato chip adicionado después de la fermentación alcohólica.



Estos resultados, por tanto, nos permiten proponer una nueva forma de aprovechamiento de los sarmientos como aditivos para el vino, los cuales constituyen el mayor residuo agrícola generado en las zonas vitícolas, como es Castilla-La Mancha. Es por tanto posible intervenir en el perfil fenólico y aromático de los vinos utilizando sus propios recursos e incrementar su posible efecto beneficioso en la salud del consumidor.

Consecuentemente, en este trabajo de Tesis Doctoral con cinco artículos publicados, se demuestra que los sarmientos de poda, preparados y utilizados como se describe, pueden ser usados como valiosos *aditivos enológicos*, lo cual contribuye a un nuevo concepto de “*Vitivinicultura Circular*”.



The problem generated by the large number of vine-shoots which are burned or abandoned annually in the vineyards, and the need to find a new exploitation, has been addressed in this Doctoral Thesis, through the study of its chemical composition and its use as enological additives.

The 6-months of post-pruning storage of vine-shoots, of both the Airén and Cencibel varieties, increases their minor fraction in terms of phenolic and aromatic compounds. It is important to note the significant increase of *trans*-resveratrol, well-known by its beneficial health properties, especially in Airén vine-shoot variety. Regarding to the volatile compounds, highlights vanillin for its enological value, whose increment is especially significant in Cencibel. The tannic fraction study showed, for the first time, that vine-shoot tannins are proanthocyanidins, mainly procyanidins, with a polymerization degree close to 3 and a percentage of galloylation close to 10 in Airén and 9 in Cencibel.

In addition, it has been confirmed that when vine-shoots are toasted at 180°C for 45 minutes, their chemical composition is significantly modified, due to the increment of several high-value enological volatile compounds, such as vanillin or guaiacol, and a slightly decrease of *trans*-resveratrol was also observed. Toasting also totally eliminated the residues of pesticides normally used in viticulture, although only with the 6 months post-pruning storage, their content decreased below their respective LMRs in grapes.

Therefore, the chemical composition of vine-shoots after 6 months of post-pruning storage and toasted, allows them to be proposed as new enological additives.

To this end, a preliminary study was carried out in which different vine-shoots were added to a model wines in order to achieve the greatest transference of high-value enological compound. The characteristics of the vine-shoots let us to determine: if vine-shoots should be toasted or not,



their format, dose and time of maceration. The results showed that, in terms of the variety, a greater release of compounds takes place when vine-shoots are toasted and added in a dosage of 12 g/L. However, Airén variety transfers more compounds when they are added in granule format, while in case of Cencibel vine-shoots the release is higher when chip format is used, being necessary a lower maceration time in Airén (21 days) than in Cencibel (35 days).

Finally, in order to proposed vine-shoots as enological additive from a real and objective point of view, vine-shoots of Airén and Cencibel vine-shoots were added in both formats to wines of their same variety at different winemaking steps. The main contribution of vine-shoots to wines when compared with their respective control wines, is the important concentration of vanillin in Cencibel wines when granule format was used after malolactic fermentation; and the high release of *trans*-resveratrol in Airén wines, when the same format was used, independently of the moment of addition. Moreover, a bottling time of 6 months have a positive effect in the sensorial profile of these wines. Thus, the best scored red wines were those that were in contact with granule format after malolactic fermentation and with chip format in the maceration step. In case of white wines, the best scored wine was when chips format was added after alcoholic fermentation.

These results, allow us to propose the use of vine-shoots, which constitute the largest agricultural waste generated in areas such as Castilla-La Mancha, as a new enological additive. This means the possibility of modulating the phenolic and aromatic profile of wines using their own resources and increasing their possible positive effect on the health of consumer.

Consequently, in this Doctoral Thesis with the five articles that encompasses, it has demonstrated that vine-shots, prepared and used as



described, can be used as valuable enological additive, contributing to a new concept of "*Circular Viticulture*".



2.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICATION

El cultivo de la vid en el mundo tiene un gran valor económico, cultural y medioambiental, como demuestra que en 2018 la superficie vitícola mundial se situara aproximadamente en unas 7.6 millones de hectáreas, destacando España como el país vitícola por excelencia. Uno de los mayores retos para estas regiones productoras de vino, es crear alternativas para procesar la gran cantidad de residuos que se generan en el sector vitivinícola durante la temporada de cosecha. En esta línea, la Unión Europea en su Directiva 2008/98/CE1, declaró que la prioridad en la gestión de residuos debe ser su reutilización y reciclado con preferencia a su valorización energética. Los sarmientos de poda constituyen el residuo más abundante de la viticultura, estimándose su producción mundial media en $1,95 \cdot 10^7$ toneladas al año. No obstante, su valor económico actual es tan bajo, que la práctica más extendida para procesar estos residuos es su quema en campo, lo que supone serios problemas medioambientales, como la emisión de gases efecto invernadero, o el desgaste de los suelos debido a la pérdida de materia orgánica. A ello hay que sumarle el aporte de los residuos de plaguicidas que puedan contener, como consecuencia de los tratamientos fitosanitarios realizados anualmente en el viñedo.

El sarmiento está constituido por un 94% de material polimérico lignocelulósico, un 55% de celulosa y hemicelulosa, y un 39% de lignina. Mientras que el aprovechamiento tradicional de este residuo se ha beneficiado del material celulósico, el procedente de la lignina y de sus derivados es escaso.

Por otro lado, entremezclada entre la red de polisacáridos y lignina, los sarmientos poseen una fracción minoritaria formada por pequeñas cantidades de compuestos orgánicos de bajo peso molecular, tales como estilbenos, flavonoles, ácidos fenólicos y de cadena lineal, alcoholes, aldehídos y terpenos, entre otros. En esta fracción recae la posibilidad de



que los sarmientos puedan ser convertidos en una potencial fuente de compuestos bioactivos.

Recientemente, se ha demostrado que vinos procedentes de cepas tratadas foliarmente con extractos acuosos de sarmientos, presentaban un efecto “feedback” o de retorno al vino de sus propios compuestos, lo cual mejoraba notablemente su perfil químico y sensorial con respecto al control, razón por la cual dichos extractos de sarmientos fueron propuestos como bioestimulantes de la vid.

En el sector enológico, el uso de la madera de roble se ha convertido desde hace años en una parte indispensable en la elaboración de determinados vinos, bien para la fabricación de barricas o para producir productos alternativos como, por ejemplo, los chips. En ambos casos, se busca aportar al vino una complejidad aromática característica, procedente de los compuestos generados en la descomposición de la madera de roble durante el proceso de tostado. El hecho de que el sarmiento posea lignina en su composición química, hace que, durante su tostado, al igual que en el roble, se generen compuestos como la vainillina, el guayacol, o el siringol, entre otros, los cuales son relevantes para el sector enológico ya que impactan en el aroma de los vinos.

Por tanto, y teniendo en cuenta todo lo anterior, el principal objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral es demostrar que los sarmientos de poda tostados y preparados en un formato de acuerdo a la legislación existente para el roble, pueden ser usados como aditivos enológicos sólidos para modular la composición química de los vinos. Además, hay que tener presente que la madera de sarmiento es propia de la cepa, a diferencia de la del roble, por lo que se utilizarían los propios recursos de la viña para intervenir en el vino. De esta forma, a los agricultores se les proporcionaría una alternativa económicamente viable a las quemas, que aportaría un valor añadido al ciclo agronómico del viñedo, y que conectaría la



viticultura y enología a través de un nuevo concepto de “*Vitivinicultura Circular*”.



Vine growing have a great economic, cultural and environmental value, as it can be seen with the 7.6 million of vineyard hectares that in 2018 were in the world, highlighting Spain as the most important wine country. One of the biggest challenges for the wine producing regions is to create alternatives to process the large amount of waste generated in this sector during the harvest season. In this line, The European Union in its Directive 2008/98/EC states that the priority in waste management should be their reuse and recycle better than their energy recovery. Vine-shoots are the most abundant residue of the vineyard, with an estimated average world production of about $1,95 \cdot 10^6$ tons for year. However, due to their lower value, the most general practice to process this waste is left or burned in the vineyard, which involve environmental problems, such as the emission of greenhouse gases or soil erosion due to the loss of organic material. To this, it must be added the contribution of pesticide residues that may contain, as a result of the phytosanitary treatments carried out annually in the vineyard.

Vine-shoots are formed by an 94% of lignocellulosic polymeric material, 55% cellulose and hemicellulose, and 39% lignin. While the traditional use of this waste has been taken account of the cellulosic material, the exploitation of lignin and its derivatives is limited.

On the other hand, mixed between polysaccharides and lignin, there is a minor fraction formed by a small quantity of organic compounds of low molecular weight, such as stilbenes, flavonols, phenolic, alcohols, aldehydes and terpenes, among others. In this fraction, lies the possibility to exploit vine-shoots in a potential source of bioactive compounds.

Recently, it has been shown that wines from vines foliarly treated with aqueous vine-shoots extract, had a “feedback” effect or return to the wine of their own compounds, which improved the chemical and sensorial



profile of wines with respect to the control, which is why vine-shoots were proposed as vine biostimulants.

In the enological sector, the use of oak wood has become essential for the elaboration of certain wines, either for the manufacture of barrels or to elaborate alternative products, such as chips. In both cases, the objective is to provide the wine with a characteristic aroma complexity, coming from the compounds generated while oak wood toasting. In the similar way than oak, vine-shoots have lignin in its chemical composition, whose degradation generates compounds with a great importance for the enological sector due to their influence in wines aroma profiles, such as vanillin, guaiacol or syringol

Therefore, and taking into account all the above, the main objective of this Doctoral Thesis is to demonstrate that vine-shoots toasted and prepared in a format according to the actual legislation for oak, can be used as enological additive to modulate the chemical composition of wines. It has also to keep in mind that vine-shoots are the own wood of the vine, unlike oak, so therefore vineyard's own resources would be used to modulate the wine. In this sense, the growers would be provided with an economically and viable alternative to vine-shoot burning, which would add value to the vineyard's agronomic cycle, and which would connect viticulture and oenology through a new concept of "*Circular Vitiviniculture*".



3.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCTION

3.1. Vine-Shoot Wastes Generation. Problematic.

Viticulture and wine industry are one of the principal agricultural activities in most European Mediterranean countries, spreading their worldwide economic and social importance along other areas of the world.

According to the International Organization of Vine and Wine (OIV), the world total area dedicated to vineyard in 2018 was around 7.5 million hectares. Spain is the largest area of vineyards in the world, with approximately 12.83% of the total, followed by China (11.50%), France (10.40 %), Italy (9,2 %), and Turkey (6.32%), accounting around the 50% of the surface of world vineyards (*Figure 1*). In Spain, Castilla-La Mancha region cultivate around 478.162 ha, which suppose for 13% of European Union (EU) and almost 6% of the vineyard world area.

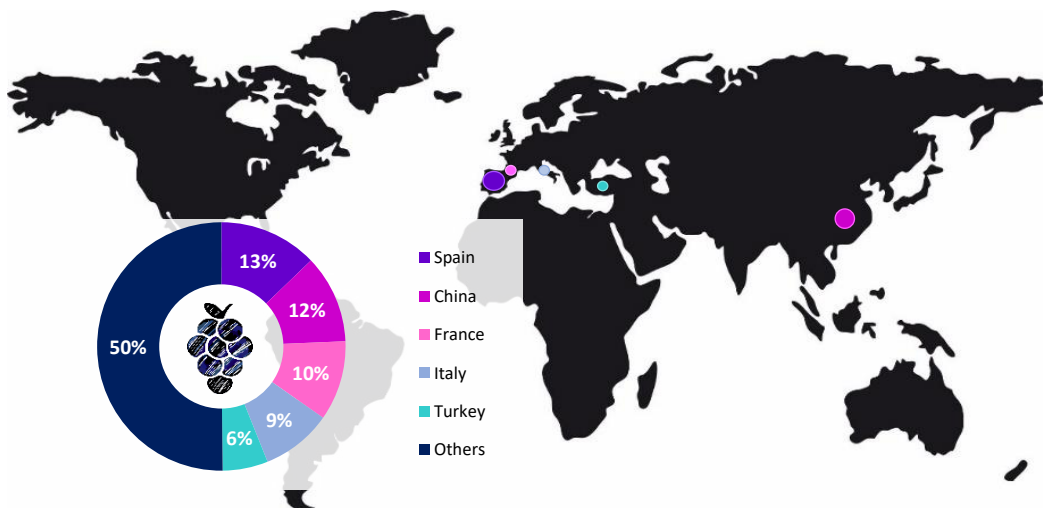


Figure 1. World vineyard surface (OIV, 2018).



Nowadays, there is a growing concern for all environment issues, which have generated a "green" revolution in agriculture, resulting in a higher interest on management and revalorization of wastes.

Examples of such concern are the Directive 2008/98/EC and CST 1/2008 from The European Parliament and OIV respectively, which since 2008 give priority to the management of waste and by-products to promote their reduction.

In viticulture, as consequence of the annual agronomic activities and techniques applied to the development of vine and winemaking, a huge number of residues are generated such as vine-shoots, leaves, pomaces or seeds, among others. Vine-shoots, are the residues produced after cutting the branches of the vines, which suppose approximately the 93% of the total wastes obtained in the viticulture (Sánchez et al. 2002). If we try to extrapolate this percentage to the vineyard area in Spain, assuming a mean value of 2.000 vines/ha and 1.3 kg of vine-shoots/vine as weight for an annual average production, approximately around $2.49 \cdot 10^6$ tons of vine-shoots are harvested per year in our country (Sánchez-Gómez, 2017), which suppose $1.95 \cdot 10^7$ tons globally of vine-shoots whose economic value is nearly nule, as they are mainly burn in the field (Peralbo-Molina et al. 2013) or composted (Devesa-Rey et al. 2011).

However, vine-shoots have a residual chemical composition which includes a high number of value compounds with an important intrinsic value, whose use must be promoted.

3.2. Vine-shoot chemical composition.

Vine-shoot wood is characterized by two main fractions: holocellulose, whose content is about 55.1%, corresponding to 31.9% for cellulose and



23.2% for hemicellulose, and a lignin fraction, whose content is about 38.5% (Briones et al. 2015). *Figure 2* shows the principal fractions in the chemical composition of vine-shoots.

Cellulose is a linear polymer of glucose linked by β -(1-4) glycosidic bonds, meanwhile hemicellulose is a polymer formed by heterogeneous units, where the main backbone of the 1-4-linked β -D-xylopyranose unit can be substituted with arabinose, galactose, mannose and rhamnose among others (Terrett & Dupree 2019).

The other principal fraction is lignin, a phenolic polymer presents in all woods, with important functions such as the transport of water, nutrients and metabolites (Ralph et al. 2004). It is synthesized in the phenylpropanoid pathway and its chemical composition is formed by three cross-linked units, *trans-p*-coumaril, guaiacil and syringyl alcohols (Terrett & Dupree, 2019), which are derived from the monolignols, *p*-coumaric, coniferyl and synapyl acids, respectively.

Lignin is considered one of the most abundant, valuable, renewable, and natural sources of high value compounds (Brebu & Vasile, 2010). When lignin is submitted to high temperatures, non-volatile and volatile compounds are released during the degradation of its structure, mainly due to temperature.

However, mixed between polysaccharides and lignin structure there is combined a minor fraction, relatively unknown, integrated by minerals, proteins and carbohydrates (Çetin et al. 2011, Dávila et al. 2016, Sánchez-Gómez et al. 2014) and most important by a small amount of low molecular weight phenolic compounds (LMWPC) (Sánchez-Gómez et al. 2014, Delgado-Torre et al. 2012).



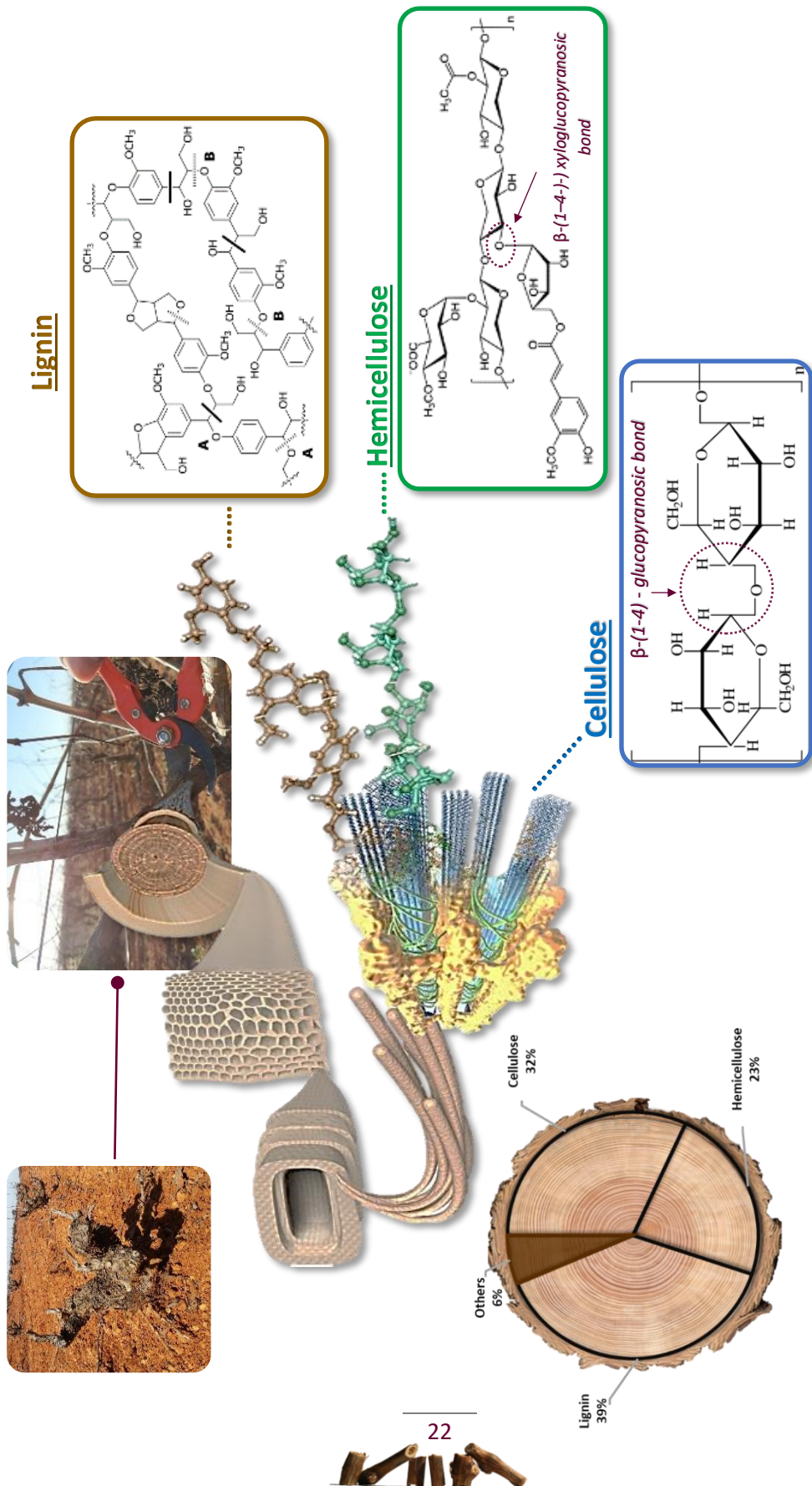


Figure 2. Principal fractions in the chemical composition of vine-shoots.

The minerals concentration depends on the type of soil and variety, among other factors, and these can be associated with the so-called "terroir effect" of the vines and wines because they come from the inorganic soil fraction. The first study, carried out by Çetin et al. (2011) on ten Turkish cultivars, concluded that vine-shoots are rich in some of the essential minerals including K, Ca, Fe, Mg, P, and Zn, so they could be useful as dietary supplements or as fertilizers. On its behalf, the characterization performed by Mendivil et al. (2013) on vine-shoots from Spanish cultivars also suggested that, due to the concentration of N, S, Al, K, and Ca, these wastes could be used as fertilizers as such minerals are essential nutrients for plants growth. In the same way, Sánchez-Gómez et al. (2014) characterized the mineral content of Airén vine-shoot aqueous extracts, and regardless of the extraction system used, the highest concentration of minerals corresponded to K and S, followed by Ca, Mg, and P. The most abundant nutrients were Cl followed by N (as NO_2^- or NO_3^-). As cation micronutrients, the most abundant was Mn and the lowest was Fe (Fe^{2+}). Although in this case the mineral content quantified in Airén was lower than referred for other cultivars, these vine-shoot extracts could be sufficient to support the plant nutrition whether they are directly foliarly applied or suitably diluted. Subsequently, Sánchez-Gómez et al. (2016a) verified the relation between the fertilizer applications of Airén vine-shoot aqueous extracts with the enhancing of the wine amino acidic content.

LMWPC includes flavanols, flavonols, phenolic acids and stilbenes. Of these, the flavanols (+)-catechin and (-)-epicatechin are the representative compounds of such fraction (Sánchez-Gómez et al. 2014, Delgado-Torre et al. 2012), followed by phenolic acids such as *trans*-p-coutaric, ellagic and gallic acids. Although, in a lower content, this phenolic fraction also is form by other compounds such as vanillic, synaptic or ferulic acid, among others.



The stilbene fraction has a special impact on vine-shoots characterization, widely studied by several authors (Çetin et al. 2011, Vergara et al. 2012, Lambert et al. 2013, Guerrero et al. 2016, Gabaston et al. 2017, Sáez et al. 2018) and not found in other woods. Stilbenes are a group of plant phytoalexins displaying different bioactivities making them compounds of high current interest (Fernández-Mar et al. 2012). Among them, it is necessary to highlight *trans*-resveratrol, knowing by its human health properties and antioxidant properties (Teissedre, 2012) or even by its chemo-preventive activity (Pezzuto, 2008). During grape development, stilbenes are accumulated in the plant and especially in woody tissues (Wang et al. 2010), which can be retrieved from vine-shoots during winter pruning, making these by-products a valuable source of bioactive compounds (Houillé et al. 2015b). The glucosylated *trans*-resveratrol form, piceid, was only detected by Sánchez-Gómez et al. (2014), being its concentration seven times lower than *trans*-resveratrol. Other stilbenes, such as *trans*-piceatannol, *trans*- ϵ -viniferin, or vitisinol have been also characterized in different vine-shoots cultivars (Gorena et al. 2014, Vergara et al. 2012) as well as a new oligostilbenoid name isoscirpusin A (Sáez et al. 2018).

Although the chemical composition of vine-shoots may vary due to the origin of the raw material, type of cultivar or any post-pruning treatment, among others (Sánchez-Gómez et al. 2017, Delgado de la Torre et al. 2012, Çetin et al. 2011, Gorena et al. 2014, Vergara et al. 2012). Undoubtedly, the effect of post-pruning time storage observed in stilbenes composition opens up the possibility that other compounds also behave in the same way. Gorena et al. (2014), showed that stilbenes in vine-shoots are accumulated during postharvest storage with a fivefold increase of *trans*-resveratrol within 8 months in Pinot noir canes. In the same way, Houillé et al. (2015a) showed that *trans*-resveratrol accumulation is temperature



and time dependent, with an optimal range at 15–20°C at 6 weeks storage. Recently, Ewald et al. (2017) have also monitored the long-term post-harvest increase of *trans*-resveratrol and *trans*- ϵ -viniferin content in eight cultivars over 30 months of storage. The highest content of *trans*-resveratrol occurred after 6 months of storage for all vine-shoots varieties, except for Regent variety.

Although at first, it has been thought that the accumulation of *trans*-resveratrol takes place only on intact cells (Houillé et al. 2015a), in an attempt to understand the induction of stilbenes metabolism, Billet et al. (2018) studied the effect of mechanical wounding on freshly vine-shoots. When vine-shoots were cut in short segments immediately after pruning with five different sizes and storage them at different times, the expression of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and stilbene synthase (STS) genes was activated, followed by a rapid accumulation of *trans*-resveratrol and *trans*-piceatannol. Such increment was achieved, shorting the time required to reach the highest stilbenoid accumulation from 6 to 2 week. The degree of stilbenoid induction was related to the intensity of mechanical cutting, being lower the time required to reach the maximal stilbenoid content with a smaller section length used for the storage.

Vine-shoots volatile fraction is characterized by its “varietal” character due to the presence of some terpenic compounds such as α -terpineol, linalool, D-limonene, linalyl acetate, and geranyl acetone, together with β -ionone, this last representing the norisoprenoid family and only quantified by Sánchez-Gómez et al. (2014). When vine-shoots are subjected to a degradation process, some compounds are generate/release from the lignocellulosic fraction in the form of important “wood” aroma compounds such as, furfural, vanillin or guaiacol, which are highly appreciated for their organoleptic properties. Moreover, Sánchez-Gómez et al. (2014) reported for first time, the presence of *cis* and *trans* β -methyl-



γ -octalactones compounds (whiskeylactones) in vine-shoots, which are characteristic mainly in oak wood and whose origin is the degradation of lipids.

The toasting process has been widely studied in case of oak wood, due to its high significance in the wine sector. Toasting is an excellent procedure to enhance the release/formation of volatile and phenolic compounds such as phenols, aldehydes, alcohols, ketones, furan derivatives, lactones, etc., depending on the toasted conditions selected (Chatonnet et al. 1999, Le Grottaglie et al. 2015, Martínez-Gil et al. 2019).

Due to the same lignocellulosic composition of vine-shoots and oak woods, vine-shoots were submitted to different toasting conditions and their chemical composition studied (Sánchez-Gómez et al. 2016b, Sánchez-Gómez et al. 2016c, Delgado De La Torre et al. 2015).

The influence of toasting, 180 °C during 15, 30 and 45 minutes, in low molecular weight phenolic compounds (LMWPC) was studied by Sánchez-Gómez et al. (2016b) in Airén and Moscatel vine-shoot cultivars. An important degradation for most non-volatile LMWPC, especially under higher toasting conditions were observed. Most of these compounds reduced their content when thermal treatment was achieved, independent of the variety, except to vanillic acid, which had a positive increment during the light and medium toasting intensities. Along with the previous compound, the toasting process induced conyferaldehyde and synapaldehyde generation. The stilbene family was positively affected by the toasting process, increasing the content around four times than in non-toasted samples when medium and high intensities were used.

Regarding to volatile compounds, the so-called "wood aromas" which are derived from thermodegradation of vine-shoot lignin such as vanillin, acetovanillone, guaiacol, syringol and eugenol increased significantly their concentration at high toasted conditions (Sánchez-Gómez et al. 2016c).



Along with these, both whiskeylactones (*cis* and *trans* isomers) also increased their concentration with toasting. All these compounds are the origin of many of the organoleptic characteristics found in wines in contact with oak wood. Moreover, derived from the degradation of cellulose and hemicellulose and as a result of several Maillard reactions from carbohydrate compounds (Fernández De Simón et al. 2014), the content of furanic compounds also increase when vine-shoots are toasted, becoming the most abundant family of compounds related with the toasting process.

The initial “varietal aroma” of vine-shoots was modified due to the toasting process as compounds such as *cis/trans*-linalool oxides, D-limonene and linalyl acetate which showed a major content, but α -terpineol was higher in non-toasted samples.

As can be seen, this minor fraction transforms vine-shoots in an important source of phenolic and aroma compounds with enological interest, to be used in new practices than to the current ones, as for example their use as enological additives in the same way as oak chips. An important consideration has to be in mind is that along the vegetative cycle of the vineyard different pesticides are applied. The presence of such phytosanitary residues in vine-shoots may evolve/disappear along the time and may limit vine-shoot future applications.

3.3. Vine-shoot uses.

Traditionally, vine-shoots are left and burned in the vineyard or used as a source of domestic fuel due to its high calorific power, but the emergence of more innovative sources of energy replaced these at a background. However, in the last years this traditional uses have been recuperated, for example as pellets for the heating boilers (Mendivil et al. 2013, Ludin et al. 2016). Recently, vine-shoots have been submitted to a biologic process for



their use as a substrate soil, such as compost (Morales et al. 2016, Mondini et al. 2018). The dissipation of pesticides using a biomixture of vine-shoots has been recently proved (Romero et al. 2019).

Due to their lignocellulosic character, current applications are aimed at the use of this majority fraction (Figure 3). Some authors have proposed vine-shoots as an attractive precursor for obtaining activated carbon (Barroso-Bogeat et al. 2015, Corcho-Corral et al. 2005, Yahya et al. 2015, Mourão et al. 2011, Cardoso et al. 2018), which also has been used for the production of biosurfactants (Moldes et al. 2011, Rodríguez-Pazo et al. 2013). The production of biochar from vine-shoots is an interesting use with environmental and agronomic benefits, due to its potential to simultaneously sequester carbon and amend agricultural soils (Azuara et al. 2017, Manyà et al. 2018). Also vine-shoots could be revalorized for biogas production according to Gañán et al. (2006) and Pérez-Rodríguez et al. (2016). Finally, in base of the major components of vine-shoots, they could be used as a new source of prebiotic oligosaccharides (Dávila et al. 2019).

The exploitation of vine-shoots due to their minor compounds are rather limited, although emerging due to the potential source of bioactive molecules. The most appreciated group of phenolic compounds in vine-shoots are stilbenes, in particularly *trans*-resveratrol. Numerous data are available on antioxidant, anti-inflammatory and antitumor effects of this compound, including its role in improving brain health during aging, benefits to the cardiovascular system, prevention of type 2 diabetes and other beneficial effects (Marques et al. 2009, Gambini et al. 2015, Diaz-Gerevini et al. 2016, Poulouse et al. 2015). *trans*-Resveratrol has also been found to be effective against a number of human cancers in preclinical studies, suggesting that it could be a useful chemotherapeutic agent (Singh, Ndiaye et al. 2015). This has led to an increased interest in the



commercialization of products based on stilbenes obtained from vine-shoots, such as Vineatrol®. There are several studies that have proven the efficacy of this polyphenol mixture in the treatment of certain diseases (Billard et al. 2002, Gupta & Briyal 2006, Brizuela et al. 2010, MacKe et al. 2012), its effective antioxidant capacity (Müller et al. 2009, Obrenovich et al. 2010), as well as with an important preservative capacity of red and white wines (Cruz et al. 2018, Raposo et al. 2016). Newly, it had been demonstrated that a vine-shoot extract (VIN) is able to replace SO₂ after alcoholic fermentation with no detriment in aroma compounds and nor in sensory properties (Ruiz-Moreno et al. 2018).

A bioplaguicide effect (antifeedant and phytotoxic) of Airén vine-shoots extracts was recently confirmed by Sánchez-Gómez et al. (2017a) on three herbivorous insects *Leptinotarsa decemlineata*, *Spodoptera littoralis*, and *Myzus persicae* in case of antifeedant effect, and on *Lactuca sativa* and *Lolium perenne* seeds in case of phytotoxic effect. Also, the efficacy of the non-toast vine-shoot aqueous extract as insecticide and in some cases, as inhibitors and/or stimulators of seed and roots has been confirmed by the same authors.

Recently, vine-shoot extracts have been proposed as “*Viticultural Biostimulants*” (Sánchez-Gómez et al. 2016d, Sánchez-Gómez et al. 2017b). Different vine-shoot aqueous extracts of toasted and non-toasted Airén and Moscatel varieties were applied. In case of Airén extracts, results showed an increased in the grape yield in comparison with the control grape and a decreased in the alcohol degree in resulted wines, which could be considered an interesting alternative for wine industry as wines with low alcoholic degree are required by consumers. Moreover, an important “*feedback*” effect was observed, as many of the minor compounds present in vine-shoot aqueous extracts were assimilated by the grape and returned to the Airén wines, improved their varietal aroma potential index and their



volatile and phenolic composition. On the other hand, when Moscatel extract were applied increased the wood aroma, as for example, eugenol, syringol, guaiacol or vanillin, last only detected with Moscatel extract.



Figure 3. Some of emerging/potential uses of vine-shoots based on their minor compound fraction.

Other potential alternatives for vine-shoots are being required by the wine industry, since the vast number of vine-shoots are causing an important environmental problem regarding their disposal and its value has been nearly non-existent over the years.

3.4. Other woods within wine industry: Oak.

The use of oak wood barrels for aging wines is an indispensable part of making high-quality wines, since such process enhance wine quality by improving their appearances, woody flavours and mouth feel.



Oak wood is one of the few tree species with optimal physical and chemical characteristics to be used in the manufacture of barrels. Approximately 600 species of the genus *Quercus* are distributed worldwide, but only American white oak (*Quercus alba*) and two French red oaks species (*Quercus robur* and *Quercus petraea*) are the most frequently used sources of oak woods (Zhang et al. 2015). Although, the use of Spanish (*Quercus pirenaica*), East European, Colombia (*Quercus humboldtii*) or China oaks have been proposed as an alternative to French and American oaks for winemaking (Cadahía et al. 2001, Hernández et al. 2007, Fernández de Simón et al. 2003, Martínez-Gil et al. 2019), but for the moment their use is rather limited.

As other woods, oak have a predominant fraction integrate by the polysaccharides cellulose (40-50%) and hemicellulose (25-35%) and a lignin fraction (15-35%) (Fernández De Simón et al. 1996, Nonier et al. 2006). There is also a minor fraction of compounds with diverse nature, which contributes to certain wood properties such as colour or flavour, as it may be the case of vine-shoots.

Within the non-volatile phenolic fraction, oak low molecular weight phenolic compounds (LMWPC) are mainly represented by phenolic acids. Among them, gallic and ellagic acid are the two more abundant, although other compounds such as vanillic, syringic or ferulic acids are also present.

Oak tannins are one of the most important group of non-volatile phenolic compounds, represented mainly by ellagitannins. Several ellagitannins have been identified as vescalagine, castalagine or different roburins (Cadahía et al. 2001). These compounds are particularly significant because they confer astringency when oak wood is in contact with wines, as well they are involved in the stabilization of pigment structures (García-Estévez et al. 2017, Kyrleou et al. 2016).



With no doubt, the aroma contribution of oak wood to wine is the main reason for its use while aging. It is particularly important the presence of *cis* and *trans*-whiskeylactones in oak wood. They contribute with distinctive coconut notes of wines aged in oak barrels, being the *cis*-isomer more easily perceived since its odour threshold is lower than in *trans*-isomer (Boidron et al. 1988). Moreover, compounds such as vanillin, eugenol and guaiacol are also of great importance due to its contribution with vanilla, clove and smoke aromatic notes in wines, respectively (Ferreira et al. 2000).

Nevertheless, there are factors with a significant influence in the composition of oak wood and, hence, in the behavior and polyphenolics extraction from oak wood when it is in contact with wines. For example, in case of the specie and geographical origin, American white oak gives a greater quantity of *cis*-whiskeylactone, vanillin and eugenol but lower concentration of ellagitannins to the wine compared to European oaks (Prida & Puech 2006, Guchu et al. 2006, Alañón et al. 2011, Díaz-Maroto et al. 2008). Seasoning is another influential factor as during this process there is a loss of polyphenolic substances, such as ellagitannins (Klumpers et al. 1994) and an increase in the concentration of whiskeylactones, volatile phenols and phenolic aldehydes. Consequently, wines decrease in bitterness and astringency, but there is a significant aroma contribution (Fernández de Simón et al. 2010). Toasting is probably the process with the most influence in the chemical composition oak wood, since in the course of this practice a great number of new compounds with high enological value are increased (guaiacol, syringol, vanillin, eugenol or furanic compounds) (Cadahía et al. 2003). The level of toasting is generally referred in terms of light, medium or heavy and, a different change is observed in the evolution of different compounds depending of the toasting degree (Cadahía et al.2001, Cadahía et al.2003, Fernández de Simón et al.2010).



Although wine aging in oak wood barrels is a common enological practice, winemakers have been looking for alternatives to speed up that process, and to obtain more-affordable wines with characteristics similar to those of wines aged in barrels for several months (Laqui-Estaña et al. 2019). An alternative already consolidated are the oak wood chips.

Different studies have been carried out with several oak fragments, for example, oak wood pellets include small pieces with size less than 2 mm, chips are pieces of wood with an irregular size close to 1 cm and with a splintery appearance, whereas cubes have a regular size of 1x1 cm (Domínguez & Del Álamo-Sanza, 2016), resulting in a different release of compounds from the wood fragments to the wine. For instance, some authors suggest that furfural extractions are faster in wine treated with oak staves and barrels than in wine aged with chips (Del Álamo-Sanza et al. 2015, Arapitsas et al. 2004, Rubio-Bretón et al. 2018a). Other authors have found a higher extraction of compounds such as vanillin and syringaldehyde, gallic acid or ellagitannins when smaller dimensions of oak pieces are used, or the content of guaiacol lower in case of smaller sizes (Le Grottaglie et al. 2015, Fernández de Simón et al. 2010, Del Álamo Sanza et al. 2004). However, a decrease in anthocyanins levels have been reported when wine is in contact with a small size fragment (Del Álamo-Sanza et al. 2004).

But not only the oak sizes are important, it has also to be in mind the fragment doses added, time in contact with the wine and/or the moment of addition while the wine-making process (Arapitsas et al. 2004, Rubio-Bretón et al. 2018). Some works about the moment of chips addition in red wines reported that when chips are added after fermentation, red wines seem to have a greater aging potential compared to the wines fermented with chips, due to their higher ellagitannin content and enhanced condensation reactions. However, wines fermented with wood chips



contained higher contents of whiskeylactones, eugenol or ethyl vanillate (Kyrleou et al. 2016). On the other hand, depending on the characteristics of the final product desired, the contact time between the wood and the wine can vary from a few days to several weeks, and even months, getting a different behavior depending on the compounds (Domínguez et al. 2016), for example, compounds such as vanillin, syringaldehyde or lactones achieved their high concentration faster than others compounds. Oak chips are normally used in doses ranging from 2 to 8 mg/L, although larger chips amounts produce significant increases of “woody” aroma causing losses of desirable aromas from a consumer’s point of view (Pérez - Coello et al. 2000). As we can see, all this parameter contributes significantly to the final product desired.

3.4.1. Alternative systems to oak.

Since the European Union (ECC 2006) authorized the use of oak wood fragments as an alternative to barrel aging in the winemaking, new other woods are sought for cooperage. Thus, research suggested that chestnut (*Castanea sativa*), acacia (*Robinia pseudoacacia*), cherry (*Prunus avium*), ash (*Fraxinus excelsior and F. vulgaris*) and wild cherry (*Morus alba and M. nigra*) could be considered as possible sources of materials to be use for cooperage (Sanz et al. 2010, Alañón et al. 2013, Fernández de Simón et al. 2014b).

Several studies show that, for example, chestnut wood have the most similar phenolic profile to oak, although its low molecular weight phenolic and tannic contents are higher, highlighting the high levels of gallic acid and the presence of gallotannins different to oak ones (Canas et al. 2000, Sanz et al. 2010). Chestnut woods show a very high content of volatiles, and compounds such as guaiacol and furanic compounds, mainly furfural, are transferred when wines are elaborated in contact with these woods



(Fernández De Simón et al. 2014). It is also important to highlight the presence of *cis* and *trans*-whiskeylactones in chestnut's wines, not found in the rest of species alternative to oak.

Different from other woods is the chemical composition of acacia, since no hydrolysable tannins were found, but it has a few amounts of condensed tannins together with a small quantity of gallic and ellagic acids (Sanz et al. 2011) and high amounts of specific acacia flavonoids such as dihydrorobinetin and robinetin (Fernández de Simón et al. 2014b, Alañón et al. 2018). Sanz et al. (2012) pointed that red wines in contact with acacia barrels, showed flavonoid and non-flavonoid compounds that were not present in the wines from oak wood, as it is the case of dihydrorobinetin. On the other hand, Alañón et al. (2018) pointed that red wines aging with acacia chips present a high content of vanillin, ferulic acid, syringaldehyde, and furfural although, in case of barrels, the amounts of these compounds decreased drastically when aging continued due to oxidation reactions reduced by the acacia wood's porosity. Recently, in rosé wines aged in contact with acacia wood chips an important total phenolic increment was also quantified (Santos et al. 2019).

Cherry wood is characterized by condensed tannins, flavonoids and some phenolic acids (Sanz et al. 2012a), that in contact with wines results in a high content of *p*-hydroxybenzoic acid, coumaric acid and (+)-catechin (Fernández de Simón et al. 2014b). However, some papers have reported that the use of cherry wood in cooperage, promoted a faster evolution and oxidation of red wines due to greater reduction in flavanols and flavonols (Chinnici et al. 2015). Cherry wood contributed only with high levels of some phenols and phenolic acids with respect to other wood wines (Fernández de Simón et al. 2014a).

Surprisingly ash wood don't have tannins, nor hydrolysable nor condensed, and it is characterized by levels of vanillin higher than those



normally detected in toasted oak (Sanz et al. 2012b). However, the polyphenolic profile of wines aged in contact with ash wood barrels, analyzed by Fernández de Simón et al.(2014b), did not show any specific polyphenols provided by this wood such as secoiridoids, phenylethanoid glycosides and lignols, previously identified as marker of this wood by Sanz et al., (2012b), although these wines showed important levels of vanillin (Fernández de Simón et al. 2014a)

Consequently, although only oak and chestnut have been approved by the International Organization of Vine and Wine (OIV) to be used for wine aging, the search for alternative woods to complement the use of oak chips in enology, as for example vine-shoots, could contribute to obtain wines with different aromatic and gustative characteristic, reducing at the same time the current demand of oak.



4.

OBJETIVOS

OBJECTIVES

El presente trabajo de Tesis Doctoral tiene como objetivo general:

“Evaluar el potencial de los sarmientos de poda para ser usados como aditivos enológicos en la elaboración de los vinos”.

Para alcanzar dicho objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos:

- **Objetivo 1.** Estudiar la evolución de los principales compuestos fenólicos y aromáticos de los sarmientos después de la poda.
- **Objetivo 2.** Estudiar el efecto del tostado de sarmientos sobre los compuestos de interés enológico.
- **Objetivo 3.** Seleccionar las mejores condiciones para la transferencia de compuestos de interés desde distintos fragmentos de sarmientos tostados, a un vino modelo.
- **Objetivo 4.** Evaluar el efecto de la adición de fragmentos tostados de sarmientos de poda en la composición química de vinos blancos y tintos.



The general objective of this Doctoral Thesis is:

“Evaluate the potential of vine-shoots to be used as enological additives in winemaking”.

To achieve this main objective, the following specific objectives are proposed:

- ❶ **Objective 1.** Study the evolution after pruning of the main phenolic and aromatic compounds of vine-shoots.
- ❷ **Objective 2.** Study the effect of vine-shoots toasting on the content of high-value enological compounds.
- ❸ **Objective 3.** Select the best conditions to transfer the highest quantity of high-value enological compounds from toasted vine-shoots to a model wine.
- ❹ **Objective 4.** Evaluate the effect in the red and white wines chemical composition of adding toasted vine-shoot fragments.



5.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALS AND METHODS

5.1. Material vegetal: Sarmientos.

Se han utilizado sarmientos de viñedos pertenecientes a la Denominación de Origen La Mancha (Castilla-La Mancha). En concreto, se han seleccionado dos variedades de *Vitis vinífera*, Airén (VIVC: 157) como variedad blanca y Cencibel o Tempranillo Tinto (VIVC: 12350) como variedad tinta, por ser dos de las variedades más relevantes a nivel mundial y las principales en Castilla-La Mancha.

En cada muestreo se escogieron aleatoriamente 50 cepas de cada variedad, intentando cubrir la mayor parte de la viña y considerando la heterogeneidad del terreno. De cada cepa se podaron aproximadamente 0,5 Kg de sarmiento, haciendo un total de 25 Kg por cada variedad y viñedo. Una vez podados, se almacenaron intactos, hasta un máximo de 6 meses, en condiciones de oscuridad y a temperatura controlada (18 ± 3 °C).

Al cabo de 1, 3 y 6 meses de almacenamiento, los sarmientos se cortaron en fragmentos de distintos tamaños (*Figura 4*) dependiendo de su posterior uso. Se realizó un pre-cortado de los sarmientos usando unas tijeras neumáticas para facilitar su posterior molienda, que se llevó a cabo con un molino de martillos (LARUS Impianti, Skid Sinte 1000, Zamora, España) y tamices de distintos tamaños. En concreto, para los ensayos de caracterización química se utilizó un tamaño de partícula inferior a 10 mm, mientras que para los estudios en vinos modelo y vinos blancos y tintos, se emplearon dos formatos, *granulado* (entre 2 mm-2 cm) y *chip* (entre 2.5 cm-3.5 cm).



Figura 4. Tamaños de los distintos tipos de fragmentos de sarmientos de poda.

5.1.1. Análisis de residuos de plaguicidas.

Se estudió la trazabilidad de los plaguicidas en sarmientos de Airén y Cencibel que únicamente habían estado en contacto con plaguicidas durante los tratamientos realizados en el viñedo, entendiend o esto como “*buenas prácticas agrícolas*”. Las materias activas utilizadas habitualmente en estos tratamientos son los que quedan recogidos en la *Tabla 1*. El análisis de estos residuos de plaguicidas se realizó a los 6 meses de almacenamiento de los sarmientos y después del tostado de los mismos.

Tabla 1. Materias activas estudiadas en los sarmientos procedentes de vides cultivadas bajo buenas prácticas agrícolas.

| Fungicidas | Insecticidas |
|-----------------|-------------------|
| Trifloxistrobin | Clorpirifos |
| Kresoxim-Metil | Tebufenocida |
| Penconazol | Lambda Cihalotrin |
| Kresoxim-Metil | |

Por otro lado, para estudiar la disipación de los fungicidas más utilizados actualmente en el viñedo, se realizó una aplicación directamente en los sarmientos en dosis 10 veces superiores a las legalmente permitidas, entendiend o esto como “*críticas prácticas agrícolas*” (*Tabla 2*). En este caso, las muestras fueron analizadas desde el momento de la poda hasta trascurridos 6 meses desde su almacenamiento, y después de ser sometidos al proceso de tostado seleccionado.

Tabla 2. Características de los fungicidas comerciales y dosis aplicadas en los sarmientos tratados bajo críticas prácticas agrícolas.

| Producto Comercial | Materia Activa | Concentración | Formulación | Dosis aplicada |
|--------------------|----------------------------|---------------|-------------|----------------|
| Flint | Trifloxistrobin | 50% | WG | 13,75 g/hL |
| Collis | Boscalida + Kresoxim-Metil | 20 + 10% | SC | 40 mL/hL |
| Topas | Penconazol | 10% | EC | 35 mL/hL |



La extracción de los residuos de plaguicidas se hizo según la versión modificada del método QuEChers para el análisis de multi residuos propuesta por Payá et al. (2007), usando acetonitrilo como agente extractante, adicionando las sales correspondientes y acidificando con ácido fórmico.

Para el análisis de los residuos de fungicidas se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent 1200, equipado con un detector DAD (Agilent, Alemania) y acoplado a un sistema de espectrometría de masas (ESI-MS/MS) con triple cuádrupolo 6410B (Agilent, Alemania). Las condiciones cromatográficas quedan recogidas en la *Tabla 3* (Payá et al., 2007).

Tabla 3. Condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis de residuos de plaguicidas mediante HPLC-MS/MS.

| FASE ESTACIONARIA | | |
|---|--|------------------|
| Columna <i>Poroshell 120 EC-C18</i> | Dimensiones | 3.00 mm x 100 mm |
| | Tamaño de partícula | 2,7 μ |
| FASE MOVIL | | |
| Eluyente A | Acetonitrilo/ Acido fórmico (99:1, v/v) | |
| Eluyente B | Agua/ Ácido fórmico/Formato de amonio (98:1:1, v/v/v) | |
| Gradiente eluyente A | 0 min - 20% 10 min - 100% 12 min -20 % | |
| Flujo | 0,6 mL/min | |
| Temperatura | 40 °C | |
| DETECTOR | | |
| MS/MS | Ionización | Positiva |
| | Escaneo | 276- 409 m/z |
| | Gas nebulizador | Nitrógeno |
| | Gas de colisión | Argón |
| | Voltaje capilar | 3000V |
| | Temperatura de la fuente | 120°C |
| | Temperatura de solvatación | 350°C |



5.2. Extracción de compuestos de interés del sarmiento: Agotamiento.

Veinte gramos de sarmiento molido (tamaño < 10mm) en 100 g. de una disolución hidroalcohólica (12,5 v/v, pH 3,6), fueron extraídos mediante microondas empleando un equipo NEOS (Milestone, Italia) a una potencia y temperatura constante de 600 W y 75 °C, precalentando previamente la muestra durante 1 minuto. Para evitar la pérdida de compuestos, la extracción se hizo con reflujo.

Para determinar el tiempo de extracción, se realizó un seguimiento de la extracción del contenido fenólico de los extractos de sarmientos mediante el parámetro IPT (Índice de Polifenoles Totales). El seguimiento de la extracción se realizó cada 2 minutos hasta un máximo de 20 minutos, alcanzándose a los 12 minutos el mayor valor de IPT (*Figura 5*).

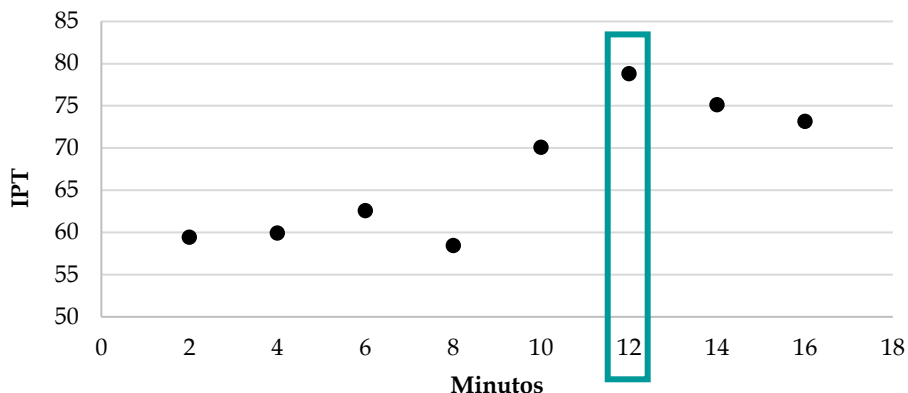
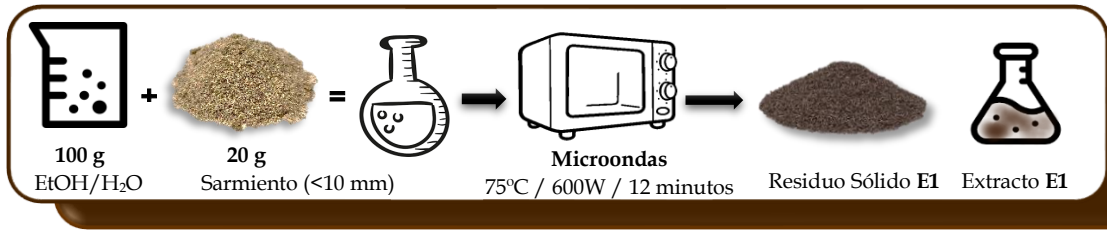


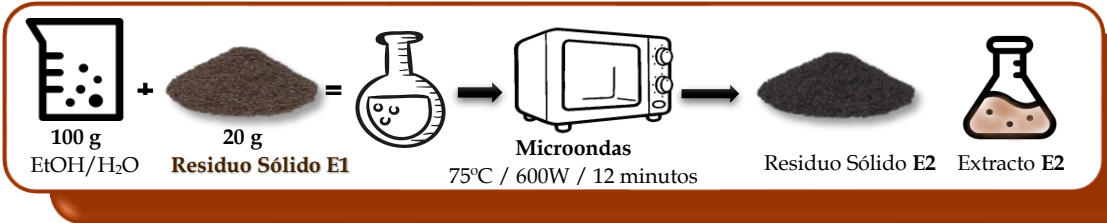
Figura 5. Evolución del Índice de Polifenoles Totales (IPT) durante una extracción de sarmientos en microondas.

Una vez determinado que el tiempo de extracción eran de 12 minutos, se estudió el número de extracciones necesarias para agotar el contenido de la muestra, repitiendo el proceso de extracción hasta un total de 5 extracciones (*Figura 6*).

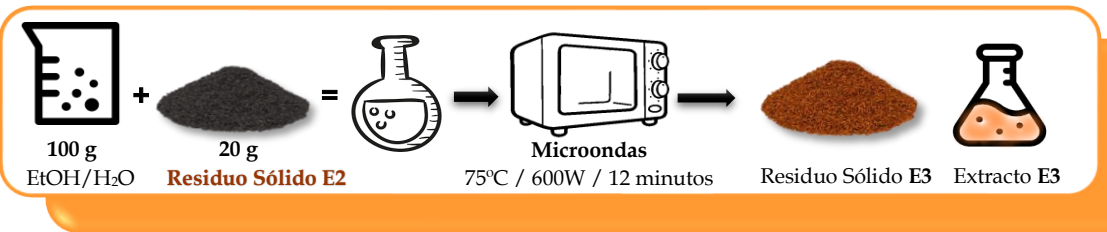
EXTRACCIÓN 1



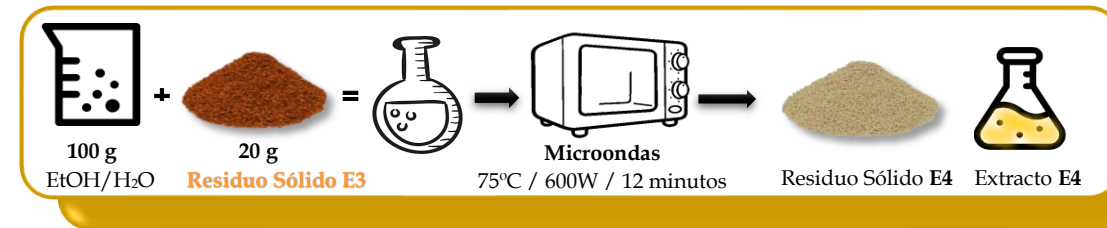
EXTRACCIÓN 2



EXTRACCIÓN 3



EXTRACCIÓN 4



EXTRACCIÓN 5

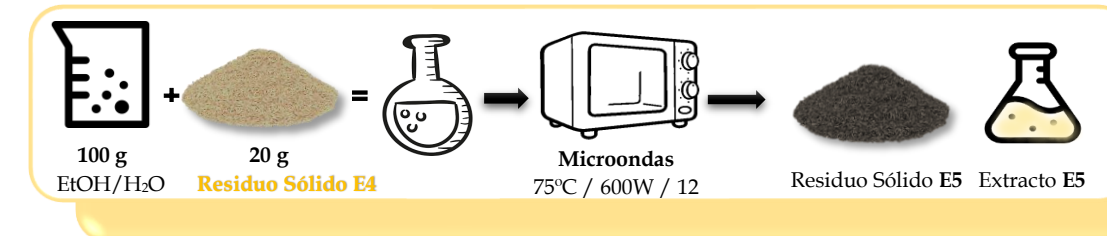


Figura 6. Etapas realizadas en el proceso de extracción para evaluar el agotamiento del sarmiento.



En la *Figura 7*, se puede ver que son necesarias 5 extracciones para obtener el total de compuestos fenólicos del sarmiento, y que con las 3 primeras ya se alcanza el 81% del total. Sin embargo, el volumen obtenido de la primera extracción fue demasiado pequeño, 18 ml, por lo que se decidió humectar el sarmiento previamente a la extracción y repetir este proceso. Para ello, se pesaron 100 g de la solución hidroalcohólica y se dejaron en contacto con 20 g de sarmiento durante 8 horas a una temperatura de 21-22°C, pasado este tiempo se repitió el proceso de extracción anterior. El volumen final de las extracciones, tanto de la primera como de las 2 siguientes, incrementó hasta valores próximos a 100 ml.

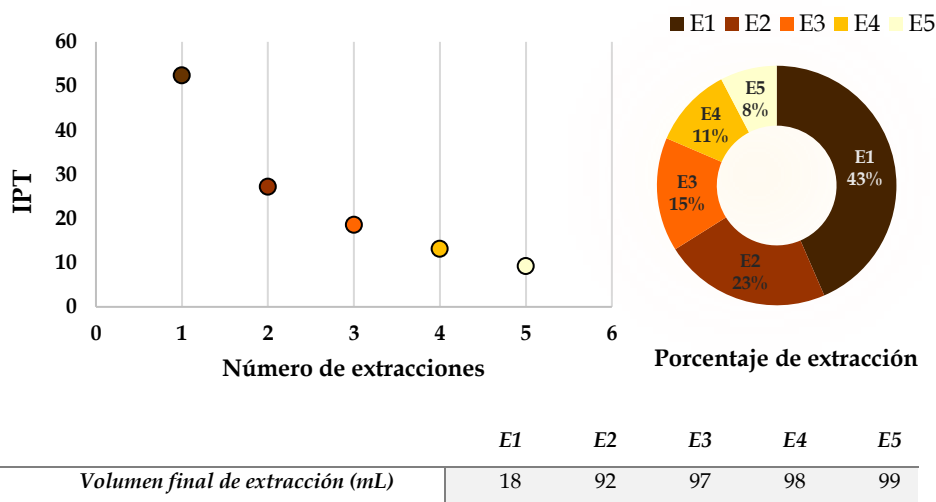


Figura 7. Evolución del Índice de Polifenoles Totales (IPT) según el número de extracciones, volumen final de extracción y porcentaje de extracción.

Por consiguiente, las condiciones de extracción de sarmiento para su caracterización fueron: 1) *Humectación de 20 g de sarmiento molido con 100 gramos de una disolución hidroalcohólica (12,5 v/v, pH 3,6) durante 8 horas.* 2) *Para la extracción con microondas, se vuelve a adicionar 100 gramos de la solución hidroalcohólica y se extrae durante 12 minutos, a temperatura constante de 75°C, 600 W de potencia y se realizan 3 extracciones consecutivas.*



5.3. Tostado del sarmiento.

5.3.1. Selección de la temperatura de tostado.

Con el fin de fijar las condiciones óptimas para el tostado de los sarmientos, se simultaneó un análisis termogravimétrico (TGA) y un análisis térmico diferencial (DTA). Estas técnicas permiten determinar, por tratamiento térmico controlado, las variaciones de masa que experimenta un material con la temperatura. Dichas variaciones pueden ser debidas a que los compuestos se van adsorbiendo, desorbiendo, descomponiendo o reaccionando, originándose un balance energético (endotérmico y/o exotérmico) que se podrían relacionar con la formación/pérdida de compuestos. En el caso del sarmiento, sus 3 fracciones principales, celulosa, hemicelulosa y lignina, tienen diferentes rangos de temperatura de descomposición, pudiéndose seleccionar aquel rango donde la liberación de compuestos sea mayor, sin que se produzca una descomposición total de la muestra.

Para realizar este análisis se pesaron 10 mg de sarmiento, se introdujeron en un equipo de análisis térmico TGA/DTA 6200 SII, (Seiko instruments, Japón) y se sometieron a un calentamiento progresivo de 5°C/min durante un intervalo de 30°C a 400 °C. Las pruebas se realizaron en una atmósfera de aire sintético con un caudal de 50 mL / min, y los datos fueron recolectados cada 0,1 segundos.

5.3.2. Proceso de tostado.

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD





5.4. Vino modelo.

El vino modelo usado, consistió en una disolución hidroalcohólica al 12,5% (v/v) preparada con 4 g/L de ácido tartárico a pH de 3,6 ajustado con NaOH 10 M. Los fragmentos de sarmientos se adicionaron al vino modelo introducidos en bolsas de infusión, a las que se añadió pequeñas bolas de cristal para evitar la flotación (*Figura 9*). Las distintas disoluciones se conservaron en oscuridad hasta su análisis, a una temperatura controlada de 16°C, como simulación de las condiciones de bodega.



Con el objetivo de evaluar la transferencia de compuestos de los sarmientos al vino se estudiaron las condiciones que se detallan en la *Tabla 4*.

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD

5.5. Elaboración de vinos blancos y tintos.

Se elaboraron vinos blancos y tintos a partir de uvas *Vitis vinífera* de las variedades blanca Airén (VIVC: 157) y tinta Cencibel (VIVC: 12350), cultivadas durante la campaña de 2017, en viñedos de la D.O. Mancha (Castilla-La Mancha). Las vinificaciones se realizaron siguiendo el método tradicional de vinificaciones en vino blanco y tinto.

Las uvas se recogieron en perfecto estado sanitario y en su momento óptimo de maduración tras realizar el seguimiento de su evolución. Los valores de °Baumé fueron 12,4 en Airén y 13,4 en Cencibel, mientras que la acidez total de las uvas el día de vendimia fue 3,01 g/L en Airén y 3,56 g/L para el caso de la Cencibel.

Para la elaboración de los vinos blancos, las uvas de la variedad Airén se despallaron y prensaron, repartiendo el mosto limpio de forma homogénea en 10 botes de cristal de 5 litros de capacidad. Para la elaboración de los vinos tintos la masa de vendimia (uvas despalladas y trituradas) se distribuyó homogéneamente en 10 botes de cristal de 5 litros de capacidad.



A continuación, los mostos o la masa de vendimia se inocularon con la levadura seca activa *Saccharomyces cerevisiae* Uvaferm HPS (Lallemand, St Simon, Francia) en una dosis de 20 g/hL. La fermentación se llevó a cabo en ambas variedades bajo condiciones controladas de temperatura, a 18 °C para Airén y 20 °C para Cencibel, dándose esta por finalizada cuando los valores de azúcares residuales estuvieron por debajo de 1,5 g/L, determinados por HPLC-RID de acuerdo con Martínez-Gil et al. (2013). Una vez finalizada la fermentación alcohólica (AF), los vinos de Cencibel se prensaron e inocularon con bacterias de la cepa *Oenococcus oeni* Lalvin VP41 (Lallemand) en una dosis de 1 g/hL, para que tuviese lugar la fermentación maloláctica (MF). Esta se desarrolló bajo condiciones controladas de temperatura y se dio por terminada cuando la concentración de ácido málico fue inferior a 0,1 g/L, determinado por HPLC-RID según Martínez-Gil et al. (2013). En la *Figura 10* y *Figura 11* se pueden observar algunos de los detalles de la elaboración de los vinos tintos de Cencibel.



Figura 10. Uvas Cencibel y válvulas de escape utilizadas en la vinificación.



Figura 11. Vinos Cencibel en contacto con los fragmentos de sarmiento.



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



5.6. Caracterización química del sarmiento y de los vinos.

La caracterización química del sarmiento se realizó en el extracto preparado según se especifica en el *apartado 5.2*. En los vinos, modelo y real (blanco y tinto), la determinación se realizó directamente en la muestra, a excepción de los taninos pormenorizados, que requirió una preparación exhaustiva de la muestra, tal y como se describe posteriormente.

5.6.1. Composición fenólica de sarmientos y vinos.

5.6.1.1. Compuestos fenólicos totales. Índice de polifenoles totales (IPT).

En el caso de los extractos de sarmiento, los compuestos fenólicos totales se determinaron mediante el índice de polifenoles totales a través de la medida de la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro UV-Vis (Perkin-Elmer Lambda 20). Se realizó una dilución 1/100. En el caso de los vinos, la medida del IPT se realizó en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR Multispec; TDI, Barcelona).

5.6.1.2. Composición fenólica pormenorizada.

La determinación de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular, se realizó mediante inyección directa en un cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent 1200 equipado con un detector DAD (Agilent G1315D). Las condiciones cromatográficas se basaron en el método de Sánchez-Gómez et al. (2014), modificadas ligeramente y según quedan recogidas en la *Tabla 5*.



Tabla 5. Condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis de compuestos fenólicos de bajo peso molecular mediante HPLC-DAD.

| SARMIENTOS | | |
|---|--|-----------------|
| FASE ESTACIONARIA | | |
| Pre-columna <i>Zorbax SB C-18</i> | Dimensiones | 2,1 mm x 30 mm |
| | Tamaño de partícula | 3,5 μ |
| Columna <i>Zorbax-Eclipse XDB-C18</i> | Dimensiones | 4,6 mm x 150 mm |
| | Tamaño de partícula | 5 μ |
| FASE MOVIL | | |
| Eluyente A | Agua/ Acido fórmico/ Acetonitrilo (97,5:1,5:1 v/v/v) | |
| Eluyente B | Acetonitrilo/ Ácido fórmico/ Eluyente A (78,5:1,5:20 v/v/v) | |
| Gradiente eluyente B | 0 min - 5% | 35 min - 20% |
| | 2 min - 10% | 50 min - 25% |
| | 4 min - 14% | 55 min - 50% |
| | 9 min - 14% | 60 min - 5% |
| | 37 min - 18,5% | 65 min - 5% |
| Flujo | 0.5 mL/min | |
| Temperatura | 30 °C | |
| VINOS | | |
| FASE ESTACIONARIA | | |
| Columna <i>ACE Excel 3 C18-PFP</i> | Dimensiones | 4,6 mm x 150 mm |
| | Tamaño de partícula | 3 μ |
| Pre- columna filtro <i>ACE Excel HPLC 1PK</i> | Tamaño de partícula | 0,5 μ |
| FASE MOVIL | | |
| Eluyente A | Agua/ Acido fórmico/ Acetonitrilo (97,5:1,5:1 v/v/v) | |
| Eluyente B | Acetonitrilo/ Ácido fórmico/ Eluyente A (78,5:1,5:20 v/v/v) | |
| Gradiente eluyente B | 0 min - 5% | 37,20 min - 32% |
| | 8,4 min - 5% | 42 min - 62%; |
| | 12,50 min - 10% | 52 min - 90% |
| | 19 min - 15% | 54 min - 100% |
| | 29 min - 16% | 56 MIN - 100% |
| | 30 min - 16,5% | 60 min - 5% |
| | 34,80 min - 18% | 65 min - 5% |
| Flujo | 1 mL/min | |
| Temperatura | 30 °C | |



La identificación de los compuestos de interés se realizó mediante un detector de diodos alineados (DAD) (Tabla 6), por comparación de sus respectivos espectros UV-Vis y por los tiempos de retención de los patrones comerciales. La cuantificación de los compuestos se llevó a cabo empleando curvas de calibración de cada uno de los patrones, para cada una de las columnas, utilizando cinco concentraciones diferentes ($R^2 = 0.92-0.99$).

Tabla 6. Compuestos fenólicos de bajo peso molecular analizados y longitudes de onda monitorizadas en el detector DAD.

| DETECTOR DAD | |
|--|---|
| 256 nm | |
| Ácido Eláxico | |
| Ácido Ferúlico | |
| Ácido Vanílico | |
| 280 nm | |
| (+)-Catequina | |
| (-)-Catequinagalato | Procianidina (B2) |
| (-)-Epigallocatequina | Ácido Protocatequico |
| (-)-Epicatequinagalato | Pirocatecol |
| (-)-Epicatequina | Pirogalol |
| Ácido Gálico | Ácido Siringico |
| 308 nm | |
| Ácido <i>trans-p</i> -Cumárico | Piceido <i>trans</i> -Resveratrol |
| Ácido <i>trans-p</i> -Cutárico | <i>trans</i> -Resveratrol |
| 324nm | |
| Ácido <i>trans</i> -Caféico | Sinapaldehído |
| Ácido <i>trans</i> -Caftárico | Piceatanol |
| Coniferaldehído | <i>trans</i> - ϵ Viniferina |
| 365nm | |
| Quercetina | |
| 520nm | |
| Cianidina 3- <i>O</i> -Glucósido | Petunidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-Glucósido |
| Kaempferol 3- <i>O</i> -Glucósido | Malvidina 3- (6- <i>t</i> -cafeoil)-Glucósido |
| Laricitrina 3- <i>O</i> -Glucósido | Cianidina 3-(6- <i>p</i> -cumaroil)-Glucósido |
| Malvidina 3- <i>O</i> -Glucósido | Malvidina 3-(6- <i>p</i> -cumaroil)-Glucósido |
| Miricetina 3- <i>O</i> -Glucósido | Petunidina-3-(6- <i>p</i> -cumaroil)-Glucósido |
| Petunidina 3- <i>O</i> -Glucósido | Laricitrina 3- <i>O</i> - Galactósido |
| Peonidina 3- <i>O</i> -Glucósido | Miricetina 3- <i>O</i> -Galactósido |
| Quercetina 3- <i>O</i> -Glucósido | Quercetina 3- <i>O</i> -Galactósido |
| Siringetina 3- <i>O</i> -Glucósido | Miricetina 3- <i>O</i> -Glucurónido |
| Malvidina 3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -acetil)-Glucósido | Quercetina 3- <i>O</i> -Glucurónido |



5.6.2. Composición tánica de sarmientos y vinos.

5.6.2.1. Taninos totales. Precipitación con metilcelulosa.

La determinación de los taninos totales en sarmientos y en vinos se realizó a partir de 2 mL de muestra y una disolución de metilcelulosa al 0,04% (p/v, en agua destilada) de acuerdo a Sarneckis et al. (2006). La concentración de taninos se calculó en función de la diferencia en la absorción a 280 nm entre la muestra sin la adición de metilcelulosa y la precipitada con metilcelulosa. El contenido de taninos totales se cuantificó como mg/L de (-)-epicatequina. En la *Figura 14*, se muestra el aspecto de la reacción de la precipitación de los taninos de los vinos tintos con metilcelulosa.

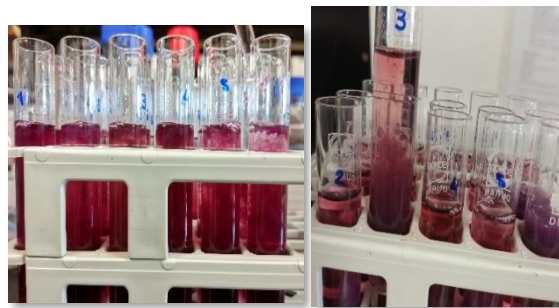


Figura 14. Reacción de precipitación con metilcelulosa de los taninos totales en vinos tintos.

5.6.2.2. Taninos pormenorizados de sarmientos.

La determinación de taninos pormenorizados en sarmientos se realizó siguiendo el método de despolimerización inducida por el pirogalol según Rebello et al. (2013). De manera resumida, 2 mL de extracto de sarmiento se eluyeron en un cartucho SPE C18 usando 15 mL de MeOH. Posteriormente el eluato fue llevado a sequedad, diluido de nuevo con 2 mL MeOH y se le hizo reaccionar con 0,30 mL de pirogalol durante 40 minutos a 30°C. Pasado este tiempo, la reacción se detuvo adicionando 1,35 mL de NaAc 67 mM.



Los taninos pormenorizados de los extractos obtenidos, antes y después de la reacción con el pirogalol, se analizaron mediante un cromatógrafo líquido de alta resolución Agilent 1200 equipado con un detector DAD (Agilent, Alemania), acoplado a un sistema de espectrometría de masas (ESI-MS/MS) de ionización por electro pulverización AB Sciex 3200 QTRAP (Applied Biosystems). Las condiciones cromatográficas son las descritas en el método de Rebello et al. (2013) y quedan recogidas en la *Tabla 7*. Se utilizaron dos tipos de exploración MS: MS mejorada (EMS) para la identificación de compuestos, y monitoreo de reacción múltiple (MRM) para la cuantificación.

Tabla 7. Condiciones cromatográficas utilizadas en el análisis de taninos condensados en sarmientos mediante HPLC-DAD-ESI- MS/MS.

| FASE ESTACIONARIA | | |
|---|--|--------------------|
| Columna <i>Ascentis Eclipse XDB-C18</i> | Dimensiones | 4,6 mm x 150 mm |
| | Tamaño de partícula | 2,7 μ |
| FASE MOVIL | | |
| Eluyente A | Metanol/ Acido fórmico/ Agua (97:2:1 v/v) | |
| Eluyente B | Metanol | |
| Gradiente eluyente A | 0 min - 95% | 55 min - 5% |
| | 2 min - 95% | 65 min - 5% |
| | 25 min -70 % | 70 min - 95% |
| | 40 min - 45 % | 80 min - 95% |
| | 50 min - 35 % | |
| Flujo | 0,3 mL/min | |
| Temperatura | 16 °C | |
| DETECTOR | | |
| DAD | Longitudes de onda monitorizadas 360 nm, 320 nm, 280 nm. | |
| MS | Ionización | Negativa |
| | Scaneo: | 230-1200 m/z |
| | Step size: | 0.03 Da |
| | Q3 barrera: | 12 V |
| | Cortina de gas: | 15.0 |
| | Gas de colisión: | Alto |
| | Voltaje de iniciación: | -4000nn V |
| | Temperatura: | 400 °C |
| | Relación de gas fuente iónica: | 1: 50 |
| | | Fuente iónica gas: |
| | Rango de escaneo: | 1000 Da/ |
| | Polaridad: | -20 V |
| | Potencial de entrada: | -10 V |
| | Energía de colisión: | -10 V |



Para la identificación y cuantificación de los flavan-3-oles se utilizaron patrones comerciales y se determinaron sus características estructurales (porcentaje molar de cada una de las subunidades de extensión y terminales; y grado medio de polimerización, mDP), por medio de las siguientes expresiones.

• **Unidades terminales:**

$$\Sigma \text{ Monómeros tras reacción con pirogalol} - \Sigma \text{ Monómeros iniciales}$$

• **Unidades de extensión:**

$$\Sigma \text{ Unidades monoméricas pirogaloiladas}$$

• **Fracción molar de cada monómero (%Mm):**

$$\%Mm = \frac{\text{Monómero Terminal (mM)} + \text{Monómero de extensión (mM)}}{\Sigma \text{ Unidades Terminales (mM)} + \Sigma \text{ Unidades de extensión (mM)}}$$

• **Grado medio de polimerización:**

$$mDP = \frac{\text{Unidades terminales (mM)} + \text{Unidades de extensión (mM)}}{\text{Unidades Terminales (mM)}}$$

• **% de Galoilación:**

$$100 \times \frac{\Sigma \text{ Galatos en unidades terminales y de extensión}}{\text{Unidades Terminales (mM)} + \text{Unidades de extensión (mM)}}$$

• **% Prodelfinidinas:**

$$100 \times \frac{\Sigma \text{ Galocat} + \text{Epigalocat} + \text{Epigalocatgalato Terminales y pirogaloiladas}}{\text{Unidades Terminales (mM)} + \text{Unidades de extensión (mM)}}$$

• **% Procianidinas:**

$$\% \text{ Procianidinas} = 100 - \% \text{ Prodelfinidinas}$$



5.6.3. Determinación de compuestos volátiles de sarmientos y vinos.

La extracción de compuestos volátiles se realizó mediante la técnica de Stir Bar Sorptive Extraction en la modalidad de espacio de cabeza (HS-SBSE) para los extractos de sarmiento y por inmersión (SBSE) para los vinos.

En el caso de los extractos se pusieron 22 mL de muestra en viales de 50 mL, donde previamente se habían pesado 2,2 g de NaCl. Posteriormente se añadieron 220 μ L del patrón 3-metil-1-pentanol, se colocaron los 'twister' dentro de un inserto y se cerraron los viales herméticamente con ayuda de una selladora. Finalmente se agitó durante 1 hora a una temperatura de 60°C y a una velocidad de 500 rpm. En la *Figura 15* se muestra un detalle de la extracción de volátiles en un extracto de sarmiento mediante HSBE.



Figura 15. Detalle del proceso de extracción con espacio de cabeza (HS-SBSE).

En el caso de los vinos, se llevaron 25 mL de vino a un matraz aforado del mismo volumen. A continuación, se añadieron 62,5 μ L del patrón 3-metil-1-pentanol, se colocó el 'twister' en el interior de matraz y se agitó durante 1 hora a temperatura ambiente y a una velocidad de 500 rpm.



Los volátiles absorbidos en el “*twister*” fueron desorbidos mediante una unidad de desorción térmica automatizada (TDU, Gerstel, Mülheim and der Ruhr, Alemania).

El análisis cromatográfico se realizó empleando un cromatógrafo de gases (Agilent 7890 A) acoplado a un detector de espectrometría de masas (MS, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) con cuadrupolo de ionización de electrones (Agilent 5975C). El gas portador fue helio, con una presión de columna constante de 20,75 psi. Las condiciones del método completo se recogen en la *Tabla 8*.

Tabla 8. Condiciones del método cromatográfico utilizado en el análisis de compuestos volátiles mediante GC-MS.

| DESORCIÓN TÉRMICA AUTOMATIZADA (TDU) | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|------------------|
| TDU | Flujo de Helio | 75 mL/min |
| | Temperatura | 40 °C a 295 °C |
| | Tiempo | 5 min |
| | Velocidad | 60 °C/min |
| | Modo | Splitless |
| CIS | Temperatura | -40°C a 260°C |
| | Tiempo | 5 min |
| | Velocidad | 12 °C/s |
| | Modo | PTV solvent vent |
| CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC) | | |
| COLUMNA BP21 (SGE) | Material | Sílice fundida |
| | Dimensiones | 30 m |
| | Tamaño de partícula | 0,25 µm |
| HORNO | Temperatura inicial | 40°C |
| | Tiempo | 2 min |
| | Rampa 1 | |
| | Velocidad | 10°C/min |
| | Temperatura | 150°C |
| | Tiempo | 5 min |
| | Rampa 2 | |
| | Velocidad | 10°C/min |
| Temperatura | 230°C | |
| Tiempo | 2 min | |
| ESPECTROMETRÍA DE MASAS (MS) | | |
| MS | Modo Scan | 27 - 300 amu |
| | Energía de ionización | 70 ev |
| | Tª línea transferencia | 230°C |



Los compuestos volátiles analizados se identificaron por comparación con sus respectivos patrones comerciales y sus tiempos de retención, además de la librería NIST. La cuantificación se realizó usando rectas de calibrado de los patrones comerciales ($R^2 = 0.92-0.99$). Los cromatogramas se recogieron en modo SCAN y se cuantificaron en modo SIM según la m/z de cada compuesto (Tabla 9).

Tabla 9. Compuestos volátiles determinados y valores de m/z utilizados para la cuantificación de los compuestos.

| m/z | Compounds | m/z | Compounds |
|-------|---|----------|--|
| 177 | β -Ionona | 98 | 2-Furanmetanol |
| 164 | Eugenol | 97 | 5- Hidroximetilfurfural |
| 151 | Acetovainillona Metil vainillato Etil vainillato Vainillina 4-Vinilguayacol | 96 | Furfural |
| 154 | Siringol | 93 | Acetato de linalilo |
| 137 | 4-Etilguayacol | 91 91 | 2-Feniletanol 4-Vinilfenol |
| 121 | β - Damascenona | 88 | Butirato de etilo |
| 110 | 5-Metilfurfural | 71 | Linalol |
| 108 | Benzil alcohol | 69 | Citronelol Farnesol Geraniol D-Limoneno Nerol Nerolidol |
| 109 | Guayacol | 67 | 3-Hexen-1-ol (Z) |
| 107 | 4-Etilfenol | 59 | α -Terpineol |
| 106 | Benzaldehído | 57 | 2-Metil- 1-Butanol 2-Hexen-1-ol (E) Nonanal 1-Octen-3-ol |
| 101 | Hexanoato de etilo Octanoato de etilo | 56 | 1-Hexanol 1-Nonanol |
| 104 | Acetato de 2-feniletilo | 55 | 3-Metil-1-Butanol |
| 99 | <i>trans/cis</i> -Whiskeylactonas | 43 | Acetato de etilo Decanoato de etilo Geranil acetona Acetato de hexilo |



5.6.4. Capacidad antioxidante en vinos.

La capacidad antioxidante se determinó a través del método del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), según Braca et al. (2001). Para ello, se tomaron 0,1 mL de vino y se mezclaron con 2 mL de DPPH en metanol (0,04 mg/mL), se incubaron durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro Hach Lange Dr. 5000. En el caso de los vinos tintos fue necesario realizar una dilución previa 1/25 (vino/agua) y se utilizó agua destilada como control del ensayo. En la *Figura 16* se muestra un detalle de la reacción del DPPH en vinos blancos.

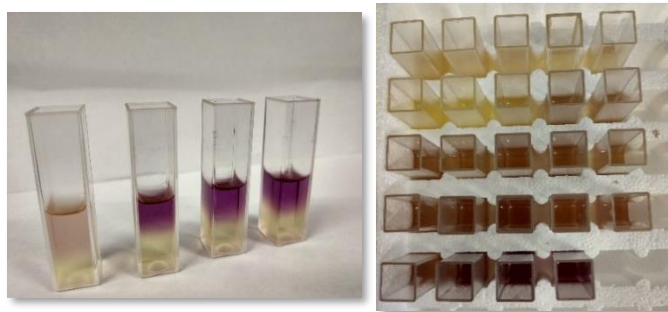


Figura 16. Aspecto de la reacción del radical libre DPPH en vinos blancos.

La reducción de DPPH se cuantificó mediante una curva de calibración utilizando Trolox como patrón. Las concentraciones utilizadas en la recta fueron desde 0,02 g/L hasta 0,16 g/L de trolox, $R^2=0.98$ (*Figura 17*).

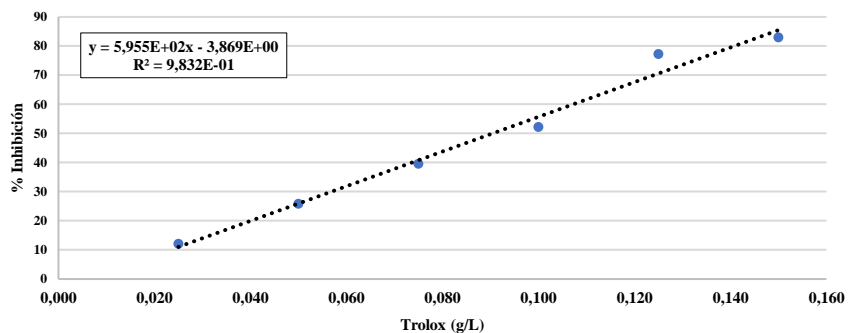


Figura 17. Recta de calibrado utilizada para el método DPPH.



5.6.5. Parámetros generales específicos de uvas y vinos.

Los parámetros generales clásicos de la uva y el vino tales como: °Baumé, pH, acidez total (g/L de ácido tartárico), grado alcohólico, acidez volátil (g/L de ácido acético), intensidad colorante, tonalidad e índice de polifenoles total (IPT), se determinaron en un espectrofotómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR Multispec; TDI, Barcelona) calibrado utilizando los métodos oficiales (ECC 1990) como referencia.

5.7. Análisis sensorial.

El análisis sensorial de los vinos, blancos y tintos, fue realizado a nivel interno por cuatro miembros del grupo de investigación. Los vinos de ambas variedades, Airén y Cencibel, se cataron en dos momentos diferentes: a vino terminado y después de 6 meses de permanencia en botella (*Figuras 12 y 13. Apartado 5.5. de Materiales y Métodos*). Estos últimos se guardaron en una vinoteca, en oscuridad y a temperatura constante de 16°C. La sesión de cata se llevó a cabo siguiendo las fichas que aparecen en las *Figuras 18 y 19*, preparadas específicamente para los vinos de esta Tesis, con descriptores concretos que tuvieran en cuenta la contribución de los sarmientos al vino.

Los descriptores evaluados en cada una de las fases de la cata fueron:

● FASE VISUAL

Intensidad Colorante: Concentración o cantidad de sustancias colorantes presentes en cada vino en la copa. Se valoró de acuerdo a 5 graduaciones: Baja (1), Media/Baja (2), Media (3), Media/Alta (4), Alta (5).

Tonalidad: Gama de colores que presenta cada uno de los vinos. Los tonos evaluados en Airén fueron: Ámbar (1), Dorado (2), Pajizo (3), Verdoso (4) y Pálido (5). Los tonos evaluados en Cencibel fueron: Marrón (1), Teja (2), Rubí (3), Granate (4) y Violáceo (5).



🍷 FASE OLFATIVA

Intensidad Aromática: Nivel de presencia aromática del vino en la copa, valorada de acuerdo a 5 graduaciones: Baja (1), Media/Baja (2), Media (3), Media/Alta (4), Alta (5).

Serie aromática frutal:

- En vinos tintos: frutos rojos (mora, grosella, fresa, frambuesa, arándano, cereza...)
- En vinos blancos: frutos cítricos (limón, corteza cítrica...), frutos tropicales (plátano, piña...) o frutos blancos (manzana, pera...)

Se evaluó únicamente la presencia (SI) o ausencia (NO) de estos descriptores señalando, en caso de respuesta afirmativa, si la fruta era fresca o, por el contrario, era fruta madura.

Serie aromática floral: Se evaluó únicamente la presencia (SI) o ausencia (NO) de aromas a flores blancas (azahar, jazmín...), flores rojas (rosa, geranio...) o flores azules (lavanda, violeta, lila...).

Serie aromática a maderas: En relación a esta serie aromática, se pidió a los catadores:

1. Señalar la presencia (SI) o ausencia (NO) de aromas a madera.
2. En caso afirmativo, identificar esta madera como *fresca* o *tostada*.
3. Finalmente, señalar si esa madera se asocia a los vinos tradicionales elaborados en contacto con madera de roble o, por el contrario, responde una madera diferente (*Vine Wood*).



❁ **FASE GUSTATIVA**

Entrada en boca: Primera impresión percibida en la boca al degustar el vino, valorada de acuerdo a 5 graduaciones: Muy Mala (1), Mala (2), Buena (3), Muy buena (4), Excelente (5).

Cuerpo: Se ha relacionado con parámetros como el alcohol y los taninos, se valoró de acuerdo a 5 graduaciones: Muy Mal (1), Mal (2), Bien (3), Muy Bien (4), Excelente (5).

Persistencia: Tiempo durante el cual la impresión táctil y aromática permanece en la boca, una vez tragado o escupido el vino, valorada de acuerdo a 5 graduaciones: Muy Corta (1), Corta (2), Media (3), Larga (4) y Muy Larga (5).



FICHA DE CATA VINOS AIRÉN

Nombre: _____

Fecha: _____

Seleccionar un valor entre 1 y 5 de menos a más y "SI" o "NO" en caso de apreciar o no los descriptores que aparecen en la ficha.



FASE VISUAL

INTENSIDAD DE COLOR:

TONALIDAD:

| VINO 1 | | | | | VINO 2 | | | | | VINO 3 | | | | | VINO 4 | | | | |
|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Ámbar | Dorado | Pajizo | Verdoso | Pálido | Ámbar | Dorado | Pajizo | Verdoso | Pálido | Ámbar | Dorado | Pajizo | Verdoso | Pálido | Ámbar | Dorado | Pajizo | Verdoso | Pálido |



FASE OLFATIVA

INTENSIDAD AROMÁTICA:

Descriptores

FRUTAS

| | | | | |
|------------------|---------|---------|---------|---------|
| FRESCA: | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |
| MADURA: | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |
| FLORALES: | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |

MADERAS

| | | | | |
|--------------|---------|---------|---------|---------|
| FRESCA: | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |
| TOSTADA: | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |
| "VINE WOOD": | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |

VALORACIÓN GENERAL:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|



DESCRIPCIÓN



FASE GUSTATIVA

ENTRADA EN BOCA:

CUERPO:

PERSISTENCIA:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

VALORACIÓN GENERAL:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|



DESCRIPCIÓN

Figura 18. Ficha de cata utilizada para vinos Airén.



FICHA DE CATA VINOS CENCIBEL

Nombre: _____

Fecha:

Seleccionar un valor entre 1 y 5 de menos a más y "SI" o "NO" en caso de apreciar o no los descriptores que aparecen en la ficha.



FASE VISUAL

INTENSIDAD DE COLOR:

TONALIDAD:

| VINO 1 | | | | | VINO 2 | | | | | VINO 3 | | | | | VINO 4 | | | | |
|--------|------|------|---------|----------|--------|------|------|---------|----------|--------|------|------|---------|----------|--------|------|------|---------|----------|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| Marrón | Teja | Rubí | Granate | Violáceo | Marrón | Teja | Rubí | Granate | Violáceo | Marrón | Teja | Rubí | Granate | Violáceo | Marrón | Teja | Rubí | Granate | Violáceo |



FASE OLFATIVA

INTENSIDAD AROMÁTICA:

Descriptores

FRUTAS

| | | | | |
|-----------|---------|---------|---------|---------|
| FRESCA: | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |
| MADURA: | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |
| FLORALES: | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |

MADERAS

| | | | | |
|--------------|---------|---------|---------|---------|
| FRESCA: | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |
| TOSTADA: | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |
| "VINE WOOD": | SI / NO | SI / NO | SI / NO | SI / NO |

VALORACIÓN GENERAL:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|



DESCRIPCIÓN



FASE GUSTATIVA

ENTRADA EN BOCA:

CUERPO:

PERSISTENCIA:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

VALORACIÓN GENERAL:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|



DESCRIPCIÓN

Figura 19. Ficha de cata utilizada para vinos Cencibel.



5.8. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el paquete SPSS en su versión 23.0 desarrollada para Windows (SPSS, Chicago, USA). Durante todo el trabajo se utilizaron tres análisis diferentes:

- Análisis de varianza (ANOVA), comparando los datos mediante el test Tukey 99,95 %.
- Análisis de varianza (ANOVA), comparando los datos mediante el coeficiente de correlación de Pearson (significación del coeficiente de correlación $p \leq 0.05$).
- Análisis factorial de correlaciones, comparando los datos mediante el test Tukey 99.95 %.



6.

PLAN DE TRABAJO

WORK PLAN

En este apartado se presenta, en forma de cuadro sinóptico, el plan de trabajo que se ha seguido a lo largo de esta Tesis Doctoral, para poder obtener una visión global de todos los estudios realizados.

Se presentan los cuatro objetivos principales y, a continuación, se hace referencia a diferentes aspectos del planteamiento y de la metodología seguida. La última columna incluye los resultados derivados de la realización de cada objetivo en donde se detallan los datos de la revista en la que se han publicado.



Caracterización química de los sarmientos de poda

| OBJETIVOS | VARIEDAD | FORMATO | POST- PODA | TOSTADO | COMPUESTOS Y PARÁMETROS ANALIZADOS | TÉCNICAS ANALÍTICAS | RESULTADOS |
|---|-------------------|--------------------|----------------|---------|---|--|---|
| Objetivo 1. Estudiar la evolución de los principales compuestos fenólicos y aromáticos de los sarmientos después de la poda. | Airén Cencibel | Molido (<10mm) | 1, 3 y 6 meses | | Composición fenólica Composición aromática Residuos de plaguicidas | HPLC-DAD HS-SBSE-GC/MS HPLC-MS/MS | Artículo I Industrial Crops & Products. 2017, 109, 730-736. Q1 |
| | Airén Cencibel | Molido (<10mm) | 1, 3 y 6 meses | | Composición tánica pormenorizada | HPLC-DAD-ESI-MS/MS | Artículo II Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2018, 66, 5556–5562. Q1 |
| Objetivo 2. Estudiar el efecto del tostado de sarmientos sobre los compuestos de interés enológico . | Airén Cencibel | Chip (2.5- 3.5 cm) | 6 meses | | Composición fenólica Composición aromática Taninos totales Residuos de plaguicidas | HPLC-DAD HS-SBSE-GC/MS Espectrofotometría UV-Vis HPLC-MS/MS | Artículo III Food Chemistry. 2018, 263, 96-103. Q1 |
| | | | | | | | Residuos de plaguicidas |

Aplicación enológica de los sarmientos de poda

| OBJETIVOS | VARIEDAD | FORMATO | POST- PODA | TOSTADO | ADICIÓN DE SARMIENTOS | TIEMPO DE CONTACTO | COMPUESTOS Y PARÁMETROS ANALIZADOS | TÉCNICAS ANALÍTICAS | RESULTADOS |
|--|-------------------|-------------------|---------------|---------|---|-----------------------|--|---|---|
| Objetivo 3. Seleccionar las mejores condiciones para la transferencia de compuestos de interés desde distintos fragmentos de sarmientos tostados, a un vino modelo. | Airén Cencibel | Granulado Chip | 6 meses | | | | Composición fenólica Composición aromática Taninos totales Actividad antioxidante | HPLC-DAD SBSE-GC/MS Espectrofotometría UV-Vis | Artículo IV Food Chemistry. 2019, 288, 86-95. Q1 |
| Objetivo 4. Evaluar el efecto de la adición de fragmentos tostados de sarmientos de poda en la composición química de vinos blancos y tintos. | Airén Cencibel | Granulado Chip | 6 meses | | CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD | | Parámetros generales Composición fenólica Composición aromática Actividad antioxidante Taninos totales Análisis sensorial | FT-IR Multispec HPLC-DAD SBSE-GC/MS Espectrofotometría UV-Vis | Artículo V Food Research International. 2019, 121, 117-126. Q1 |
| | | | | | | | | | Análisis sensorial |

Chemical characterization of vine-shoots

| OBJETIVES | VARIETY | FORMAT | POST-PRUNING | TOASTED | COMPOUNDS & ANALYZED PARAMETERS | ANALYTICAL TECHNIQUES | RESULTS |
|---|----------------|--------------------|-----------------|---------|--|---|--|
| Objective 1. Study the evolution after pruning of the main phenolic and aromatic compounds of vine-shoots. | Airén Cencibel | Powder (<10mm) | 1, 3 y 6 months | | Phenolic composition Volatile composition Pesticides residues | HPLC-DAD HS-SBSE-GC/MS HPLC-MS/MS | Paper I Industrial Crops & Products. 2017, 109, 730-736. Q1 |
| | Airén Cencibel | Powder (<10mm) | 1, 3 y 6 months | | Detailed tannic composition | HPLC-DAD-ESI-MS/MS | Paper II Journal of Agriculture and Food Chemistry. 2018, 66, 5556-5562. Q1 |
| Objective 2. Evaluate the effect of toasting vine-shoots in the high-value enological compounds. | Airén Cencibel | Chip (2.5- 3.5 cm) | 6 months | | Phenolic composition Volatile composition Total tannins Pesticides residues | HPLC-DAD HS-SBSE-GC/MS Spectrophotometry UV-Vis HPLC-MS/MS | Paper III Food Chemistry. 2018, 263, 96-103. Q1 |
| | | | | | | | Pesticides residues |

Enological application of vine-shoots

| OBJECTIVES | VARIETY | FORMAT | POST-PRUNING | TOASTED | MOMENT OF VINE-SHOOTS ADDITION | TIME OF CONTACT | COMPOUNDS AND PARAMETERS ANALYZED | ANALYTICAL TECHNIQUES | RESULTS |
|--|----------------|----------------|--------------|------------------------------|--------------------------------|-----------------|---|---|---|
| Objective 3. Select the best conditions to transfer the highest quantity of high-value enological compounds from toasted vine-shoots to a model wine. | Airén Cencibel | Granulate Chip | 6 months | ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR | | | Phenolic composition Volatile composition Total tannins Antioxidant activity | HPLC-DAD SBSE-GC/MS Spectrophotometry UV-Vis | Paper IV Food Chemistry. 2019, 288, 86-95. Q1 |
| Objective 4. Evaluate the effect in the red and white wines chemical composition of adding toasted vine-shoot fragments. | Airén Cencibel | Granulate Chip | 6 months | CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD | | | General parameters Phenolic composition Volatile composition Antioxidant activity Total tannins Sensory analysis | FT-IR Multispec HPLC-DAD SBSE-GC/MS Spectrophotometry UV-Vis | Paper V Food Research International. 2019, 121, 117-126. Q1 Sensory analysis |

7.

RESULTADOS

RESULTS

Este capítulo se divide en 2 apartados:

7.1. Caracterización química de los sarmientos de poda, que responde a los objetivos específicos 1 y 2 de esta Tesis y que está constituido por 3 artículos científicos. Además, se incluye el estudio de los residuos de plaguicidas.

7.2. Aplicación enológica de los sarmientos de poda, que responde a los objetivos específicos 3 y 4 de esta Tesis y que incluye 2 artículos científicos. Además, se incluyen los resultados derivados del análisis sensorial de los vinos.

Cada uno de estos apartados se inicia con una introducción, seguido de los artículos científicos correspondientes. Para facilitar la lectura de estos artículos científicos en inglés, se presenta previamente un breve resumen en español de cada uno de ellos mostrando sus aspectos más relevantes.

7.1. Caracterización química de los sarmientos de poda.

Objetivo 1. Estudiar la evolución de los principales compuestos fenólicos y aromáticos de los sarmientos después de la poda.

- Caracterización fenólica y aromática de los sarmientos después de un periodo de almacenamiento post-poda (**Artículo I**).
- Caracterización tánica de los sarmientos después de un periodo de almacenamiento tras la poda y ser sometidos a un proceso de tostado (**Artículo II**).

Objetivo 2. Estudiar el efecto del tostado de sarmientos sobre los compuestos de interés enológico.

- Evaluar el efecto del tostado de sarmientos en la liberación de compuestos de interés enológico (**Artículo III**).
- Estudiar la evolución de los residuos de plaguicidas en los sarmientos después del almacenamiento y el tostado.

Objective 1. Study the evolution after pruning of the main phenolic and aromatic compounds of vine-shoots.

- Chemical characterization of vine-shoots in terms phenolic and volatile compounds after post-pruning storage (**Paper I**).
- Tannin composition of vine-shoots after post-pruning storage and toasting process (**Paper II**).

Objective 2. Study the effect of vine-shoots toasting on the content of high-value enological compounds.

- Effect of toasting process in the release of high value enological compounds from vine-shoots (**Paper III**).
- Study the evolution of pesticide residues in vine-shoots after storage and toasting.

7.1.1. Introducción.

Los sarmientos son el resultado del proceso de lignificación que sufren los pámpanos verdes de la cepa durante el periodo de agostamiento. En este momento, parte del contenido de las hojas comienzan a migrar hacia estos brotes creando así una importante acumulación de reservas que la planta utilizará al año siguiente para su brotación.

Durante el invierno, mediante la poda, estos sarmientos son separados de la cepa con el objetivo de conseguir un equilibrio entre el crecimiento vegetativo y productivo de la planta y, por tanto, entre la cantidad y calidad de uva.

Se genera por tanto una importante cantidad de residuo, que dispone de un elevado contenido de compuestos que podrían ser aprovechados como materia prima en nuevos usos para los mismos.

Los trabajos existentes sobre la caracterización química del sarmiento se han centrado principalmente en la familia de los estilbenos debido a sus conocidos efectos beneficiosos sobre a salud. La concentración de estos compuestos varía mucho en función de la variedad, método de extracción, análisis, etc., pero sin lugar a dudas, es el tiempo transcurrido desde su poda el factor más influyente. Así, Gorena et al. (2014) y Houillé et al. (2015) demostraron que, si los sarmientos son almacenados intactos después de la poda, su metabolismo secundario sigue activo, y tiene lugar un incremento en el contenido total de estilbenos de hasta cinco veces. Aunque recientemente Billet et al. (2018) ha demostrado que, si los sarmientos son cortados inmediatamente después de la poda, el aumento en el contenido de estilbenos se produce en un menor periodo de tiempo.

Basándonos en esta premisa y, teniendo en cuenta la bibliografía existente sobre la composición química, volátil y no volátil, del sarmiento (Sánchez-Gómez et al. 2014, Delgado De La Torre et al. 2012), se decidió



evaluar si el tiempo de almacenamiento de los sarmientos después de su poda tiene el mismo efecto en el resto de metabolitos secundarios, ya que, en caso afirmativo, esto supondría un incremento en todos aquellos compuestos del sarmiento que podrían ser interesantes desde el punto de vista enológico. Los taninos del sarmiento no han sido objeto de estudio en ninguno de los trabajos anteriormente mencionados. Sin embargo, existen diversos estudios sobre la composición tánica de otras partes del racimo en especial piel, semillas y raspón (Bordiga et al. 2011, Trad et al. 2017, Pascual et al. 2016) y, en todos los casos estos son taninos condensados, constituidos exclusivamente por procianidinas en las semillas, mientras que la piel y el raspón incluyen también prodelfinidinas.

El tostado es un proceso imprescindible durante la preparación de los chips de roble utilizados en enología, ya que potencia los compuestos aromáticos que posteriormente pasarán al vino. Por ello, con el pensamiento siempre puesto en una posible aplicación de los sarmientos como aditivos enológicos, se planteó el tostado de los mismos tomando como referencia los trabajos previos realizados por Sánchez-Gómez et al. (2016b, 2016c), pero utilizándose un formato de sarmiento adecuado a la legislación vigente en el caso de los chips de roble para vinificación.

Es muy importante tener en cuenta que a lo largo del ciclo vegetativo de la vid se aplican diferentes productos fitosanitarios, principalmente para el control de hongos. El control de residuos de plaguicidas, su evolución y transferencia en las uvas y el vino ha sido ampliamente estudiado (Barba et al. 1991, Marín et al. 2003, Fernández et al. 2005). Sin embargo, no hemos encontrado trabajos que estudien los residuos de plaguicidas en sarmientos, por lo que se considera de extraordinaria importancia controlar y conocer la trazabilidad de residuos fitosanitarios en los sarmientos después de su almacenamiento y tostado.



Por tanto, los 3 artículos que se recogen en este apartado tratan sobre:

A) La caracterización fenólica y aromática de los sarmientos tras ser almacenados después de la poda (*Artículo I*); B) La caracterización tánica de los sarmientos después de un periodo del almacenamiento (*Artículo II*) y C) El efecto del tostado en la composición química de los sarmientos en formato chip (*Artículo III*). Además, se incluye un último apartado con los resultados no publicados relativos al estudio de los residuos de plaguicidas en los sarmientos sin tostar y tostados.



7.1.2. Artículos Publicados.

Artículo I:

Industrial Crops & Products 109 (2017) 730–736

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products




journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

Research paper

Effect of post-pruning vine-shoots storage on the evolution of high-value compounds

Cristina Cebrián, Rosario Sánchez-Gómez, M. Rosario Salinas, Gonzalo L. Alonso, Amaya Zalacain*

Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Cátedra de Química Agrícola, Avda. de España s/n, 02071, Albacete, Spain



Category name: Agricultural Engineering

Puesto SCI: 2/14 (Q1) **Índice de impacto SCI 2017:** 3.849

ISSN: 0926-6690 **DOI:** .1016/j.indcrop.2017.09.037

Artículo II:

JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

Article

Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2018, 66, 5556–5562

pubs.acs.org/JAFC

Vine-Shoot Tannins: Effect of Post-pruning Storage and Toasting Treatment

Cristina Cebrián-Tarancón,[†] Rosario Sánchez-Gómez,[†] Sergio Gómez-Alonso,^{*} Isidro Hermosín-Gutierrez,^{‡,||} Adela Mena-Morales,[§] Esteban García-Romero,[§] M. Rosario Salinas,[†] and Amaya Zalacain^{*,†,||}

[†]Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Cátedra de Química Agrícola, Avenida de España s/n, 02071 Albacete, Spain

[‡]Universidad de Castilla-La Mancha, Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Avenida Camilo José Cela s/n, 13071 Ciudad Real, Spain

[§]Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Carretera de Albacete s/n, 13700 Tomelloso, Spain

Category name: Agriculture Multidisciplinary

Puesto SCI: 2/57 (Q1) **Índice de impacto SCI 2017:** 3.412

ISSN: 0021-8561 **DOI:** 10.1021/acs.jafc.8b01540

Artículo III:

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



7.1.2.1 Resumen Artículo I.

*“Effect of post-pruning vine-shoots storage on the evolution of high-value compounds”
Industrial Crops & Products, 2017. 109, 730–736.*

En la búsqueda de usos innovadores para el sarmiento, la familia de los estilbenos ha sido la que ha despertado un mayor interés entre los investigadores debido a sus conocidas propiedades saludables, demostrándose recientemente que su contenido en el sarmiento aumenta con el tiempo de almacenamiento transcurrido después de la poda.

Sin embargo, los sarmientos poseen otros metabolitos secundarios, cuya evolución no ha sido estudiada, y que podrían abrir nuevas oportunidades de mercado. Por ello, el objetivo de este primer trabajo fue caracterizar la composición fenólica y aromática de los sarmientos de las variedades Airén y Cencibel, después de ser almacenados intactos durante 1, 3 y 6 meses, en condiciones de oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido este tiempo, los sarmientos fueron molidos hasta un tamaño de partícula de 10 mm y se sometieron a un proceso de extracción con microondas hasta agotamiento, según lo descrito en el apartado de *Materiales y Métodos* 5.2. La composición fenólica y aromática se determinó mediante HPLC-DAD y HS-SBSE-GC/MS respectivamente (*Materiales y Métodos: apartados* 5.6.1.2 y 5.6.3).

El contenido total de compuestos minoritarios fue de 2 g/Kg en Airén y 1,6 g/Kg en Cencibel, siendo la fracción fenólica la más abundante en ambas variedades (85%-95%). Se confirmó la acumulación de *trans*-resveratrol a los 6 meses de almacenamiento, tal y como se indicaba en la bibliografía, cuya concentración incremento hasta cuatro veces en la variedad Cencibel y se duplicó en Airén. Además, se observó un aumento significativo de la mayoría de los metabolitos minoritarios a los 6 meses de



la poda, destacando el aumento de la concentración de (+)-catequina, ácido elágico, trans- ϵ -viniferina y ácido ferúlico.

En relación a la composición aromática, el grupo de los benzenoides fue el más influenciado por el tiempo de almacenamiento, presentando la mayor concentración a los 6 meses. De entre ellos destacó de manera significativa la vainillina, que aumentó un 17% en Airén y un 35% en Cencibel entre el primer y el sexto mes de almacenamiento. Además, se encontró una relación directa entre la síntesis de vainillina y la disminución de ácido ferúlico, lo que confirma que ambos compuestos comparten la misma ruta metabólica. La concentración de guayacol incrementó también de forma significativa al cabo de 6 meses en la variedad Cencibel, pero no se vio afectado por el almacenamiento en Airén. Se detectó también la presencia de whiskylactonas, aunque solo en la variedad Cencibel después de 3 y 6 meses de almacenamiento.

Con estos resultados se pone de manifiesto que el metabolismo de los sarmientos sigue activo después de ser podados, aumentando la concentración de muchos de sus compuestos con el tiempo de almacenamiento, lo que amplía las posibilidades de aprovechamiento de este residuo agrícola en el sector vitivinícola.



Industrial Crops & Products 109 (2017) 730–736

Contents lists available at ScienceDirect

Industrial Crops & Products

journal homepage: www.elsevier.com/locate/indcrop

ELSEVIER



Research paper

Effect of post-pruning vine-shoots storage on the evolution of high-value compounds

Cristina Cebrián, Rosario Sánchez-Gómez, M. Rosario Salinas, Gonzalo L. Alonso, Amaya Zalacain*

Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Cátedra de Química Agrícola, Avda. de España s/n, 02071, Albacete, Spain



<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.037>



7.1.2.2 Resumen Artículo II.

"Vine-Shoot Tannins: Effect of Post-pruning Storage and Toasting Treatment"
Food Chemistry, 2018. 263, 96-103.

Aunque la composición tánica de las diferentes partes de la vid está definida por su contenido en taninos condensados, la composición lignocelulósica de los sarmientos los hace más semejantes a otros materiales vegetales, como por ejemplo la madera de roble, cuyos taninos son principalmente elágicos.

Por ello, el objetivo planteado para este segundo trabajo fue caracterizar por primera vez la composición tánica de los sarmientos y estudiar cómo se ve afectada por el tiempo de almacenamiento y su tostado.

Para ello, tomando como referencia el *Artículo I*, los sarmientos almacenados durante 1, 3 y 6 meses después de la poda, fueron analizados mediante HPLC-DAD-ESI-MS/MS (*Materiales y Métodos: apartado 5.6.2.2*). Además, también se analizaron los sarmientos almacenados durante 6 meses y sometidos a un proceso de tostado, en distintas condiciones (*Materiales y Métodos: apartado 5.2*).

Los resultados revelaron que la composición tánica del sarmiento está conformada únicamente por taninos condensados, como el resto de la vid, caracterizados por un alto contenido de proantocianidinas y con un grado medio de polimerización (mDP) cercano a 3. La mayor concentración de proantocianidinas se observó en Airén después de 6 meses y en Cencibel a los 3 meses de almacenamiento. La fracción mayoritaria fue de procianidinas (75%-95%), concretamente dímeros B1, B2 y B4, que disminuyeron con el tiempo de almacenamiento. La fracción de prodelfinidinas fue minoritaria (8%-24%), y tuvieron un comportamiento distinto a la de las procianidinas, ya que aumentaron con el tiempo. El



porcentaje de galoilación no mostró diferencias entre los distintos tiempos de almacenamiento, pero sí entre variedades, siendo mayor en Airén que en Cencibel.

Con respecto a la influencia del tostado sobre la composición tánica, se observó una disminución en el contenido total de taninos del 65% en Airén y del 45% en Cencibel, y el grado medio de polimerización se redujo a 2. Sin embargo, la proporción de procianidinas, prodelfinidinas y el porcentaje de galoilación se mantuvieron constantes.

Por tanto, los resultados de este trabajo complementan el estudio sobre la composición química del sarmiento del *Artículo I*, y sugieren, en comparación con el resto de partes de la vid, que los taninos presentes en los sarmientos deben ser astringentes, como cabe esperar por el contenido de procianidinas, pero serían más suaves, más amargos y menos astringentes que los de las pieles o semillas de la uva, debido a su estructura química.



JOURNAL OF
**AGRICULTURAL AND
FOOD CHEMISTRY**

Article
Cite This: *J. Agric. Food Chem.* 2018, 66, 5556–5562
pubs.acs.org/JAFC

Vine-Shoot Tannins: Effect of Post-pruning Storage and Toasting Treatment

Cristina Cebrián-Tarancón,[†] Rosario Sánchez-Gómez,[†] Sergio Gómez-Alonso,[‡] Isidro Hermosín-Gutiérrez,^{‡,||} Adela Mena-Morales,[§] Esteban García-Romero,[§] M. Rosario Salinas,[†] and Amaya Zalacain^{*,†,||}

[†]Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Cátedra de Química Agrícola, Avenida de España s/n, 02071 Albacete, Spain
[‡]Universidad de Castilla-La Mancha, Instituto Regional de Investigación Científica Aplicada, Avenida Camilo José Cela s/n, 13071 Ciudad Real, Spain
[§]Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, Carretera de Albacete s/n, 13700 Tomelloso, Spain

[10.1021/acs.jafc.8b01540](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b01540)



7.1.2.3 Resumen *Artículo III.*



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



7.1.3. Resultados no publicados: Residuos de plaguicidas.

En la *Tabla 10* quedan recogidas las concentraciones de residuos de plaguicidas encontradas en los sarmientos procedentes de viñedos tratados bajo “*buenas prácticas agrícolas*” (BPA) (*Materiales y métodos: apartado 5.7*). Cabe resaltar que estos productos son los más utilizados en las viñas de las zonas muestreadas, razón por la que sobre ellos se hizo el presente estudio.

Tabla 10. Concentración de residuos de plaguicidas (mg/Kg) en sarmientos de las variedades Airén y Cencibel tratados bajo buenas prácticas agrícolas.

| Materia Activa | LMR | LOQ | Airén | | Cencibel | |
|-----------------------------------|------|------|-------|-------|----------|-------|
| | | | 6m-ST | 6m-T | 6m-ST | 6m-T |
| Fungicidas | | | | | | |
| <i>Trifloxistrobin</i> | 3 | 0,01 | 0,022 | < LOQ | < LOQ | < LOQ |
| <i>Boscalida + Kresoxim-Metil</i> | 5+1 | 0,01 | < LOQ | < LOQ | < LOQ | < LOQ |
| <i>Penconazol</i> | 0,4 | 0,01 | < LOQ | < LOQ | < LOQ | < LOQ |
| Insecticidas | | | | | | |
| <i>Clorpirifos</i> | 1 | 0,01 | < LOQ | < LOQ | < LOQ | < LOQ |
| <i>Tebufenocida</i> | 3 | 0,01 | 0,022 | < LOQ | < LOQ | < LOQ |
| <i>Lambda cihalotrin</i> | 0,08 | 0,01 | < LOQ | < LOQ | < LOQ | < LOQ |

LMR: Límite máximo de residuos permitido en uvas (mg/Kg). *Éstos datos se han extraído del Reglamento (CE) no 396/2005 del Parlamento Europeo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal.*

LOQ: Límite de cuantificación según Payá et al. (2007).

6m-ST: Sarmientos almacenados durante 6 meses, sin tostar.

6m-T: Sarmientos almacenados durante 6 meses, tostados.

Como se puede ver, no se encontró ningún residuo de estas materias activas en los sarmientos de Cencibel, mientras que en los de Airén se pudo cuantificar Trifloxistrobin y Tebufenocida, pero en concentraciones muy inferiores a sus respectivos LMR. Por tanto, podemos decir que el



tratamiento habitual de plaguicidas realizado en el viñedo no supone ningún riesgo para el consumidor, si los sarmientos son almacenados, tal y como se propone en este trabajo de tesis, durante 6 meses después de su poda, y mejor aún si además los sarmientos son tostados según las condiciones seleccionadas (180°C durante 45 minutos).

EL tratamiento de plaguicidas (fungicidas), que se realizó aplicando directamente en los sarmientos concentraciones que simulan las utilizadas en viñedos bajo “*críticas prácticas agrícolas*” (CPA) (*Materiales y métodos: apartado 5.1.1*), confirma la disipación de las materias activas ensayadas por efecto del tiempo de almacenamiento y del tostado. Así, en la *Figura 18*, se muestra como en Airén una importante disminución, en comparación con el tratamiento CPA, de la concentración de las materias activas, concretamente, hasta un 84% en Boscalid, un 54 % en Kresoxim-Metil, un 62 % el Trifloxistrobin y, en el peor de los casos, hasta un 40 % en Penconazol.

En la variedad Cencibel (*Figura 19*), la disminución fue más significativa ya que se observó un descenso del 91% con Boscalid, un 77 % con Kresoxim-Metil, un 74% con Trifloxistrobin y hasta del 64% en el caso del Penconazol.

Con respecto a los LMR, únicamente el Penconazol fue cuantificado por encima de su LMR permitido en uva (0,4 mg/Kg) y, aun así, la concentración disminuyó hasta un 40%.



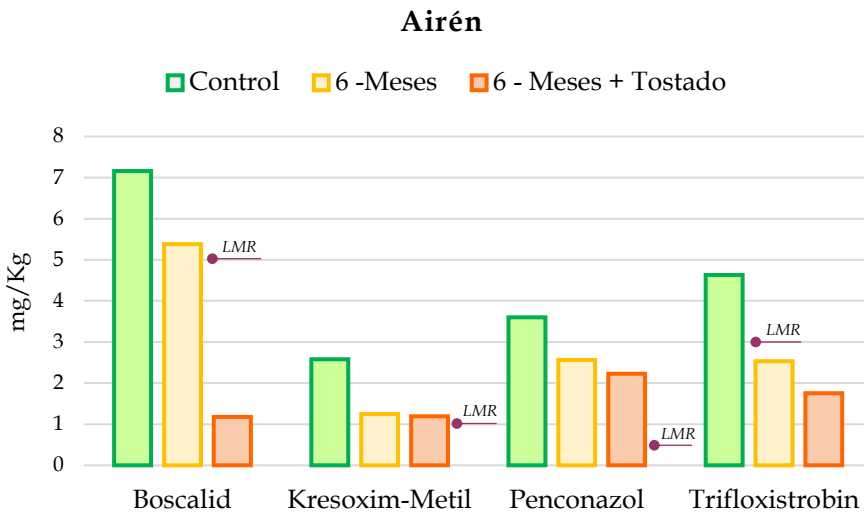


Figura 18. Evolución de las materias activas fungicidas en sarmientos de Airén.

Control: Analizados inmediatamente después del tratamiento.

6 Meses: Analizados después de 6 meses de almacenamiento tras el tratamiento.

6 Meses + Tostado: Analizados después de ser almacenados 6 meses y tostados.

LMR : Límite máximo de residuos.

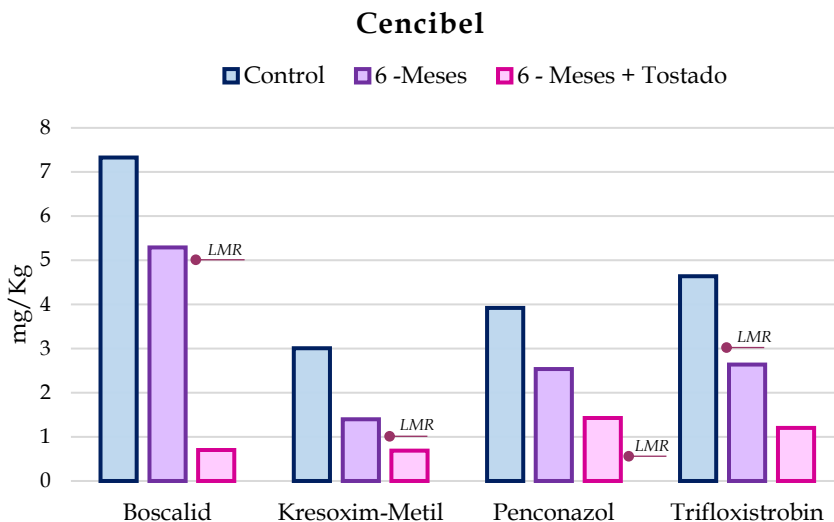


Figura 19. Evolución de las materias activas fungicidas en sarmientos de Cencibel.

Control: Analizados inmediatamente después del tratamiento.

6 Meses: Analizados después de 6 meses de almacenamiento tras el tratamiento.

6 Meses + Tostado: Analizados después de ser almacenados 6 meses y tostados.

LMR : Límite máximo de residuos.



Hay que destacar que las dosis utilizadas en el viñedo son muy inferiores a las probadas en este último ensayo, y que los últimos tratamientos con plaguicidas en la viña se alargan, como mucho, hasta 3 meses antes de la poda, lo cual aumenta considerablemente el plazo de seguridad. Si a esto añadimos los 6 meses de almacenamiento y el proceso de tostado, la presencia de residuos de plaguicidas en los sarmientos queda prácticamente descartada.



7.2. Aplicación enológica.

Objetivo 3. Seleccionar las mejores condiciones para la transferencia de compuestos de interés desde distintos fragmentos de sarmientos tostados, a un vino modelo.

- *Evaluación de los sarmientos como aditivos enológicos en vinos modelo (Artículo IV).*

Objetivo 4. Evaluar el efecto de la adición de fragmentos tostados de sarmientos de poda en la composición química de vinos blancos y tintos.

- *Vinificación con sarmientos: Modulando la composición de los vinos usando sus propios recursos (Artículo V).*
 - *Análisis sensorial de los vinos blancos y tintos elaborados con sarmientos.*
-

Objective 3. Select the best conditions to transfer the highest quantity of high-value enological compounds from toasted vine-shoots to a model wine.

- *Assessment of vine-shoots in a model wine as enological additives (Paper IV).*

Objective 4. Evaluate the effect in the red and white wines chemical composition of adding toasted vine-shoot fragments.

- *Winemaking with vine-shoots: Modulating the composition of wines by using their own resources (Paper V).*
- *Sensorial analysis of white and red wines elaborated in contact with vine-shoots.*

7.2.1. Introducción.

Una vez caracterizados los sarmientos de poda, y debido a la presencia de compuestos que podrían contribuir positivamente a la calidad del vino, se abordó el estudio de su aplicación enológica.

En la actualidad, los chips de roble son utilizados como alternativa a las barricas debido a su interesante contribución sensorial al vino, especialmente en compuestos aromáticos y fenólicos. Sin embargo, son varios los factores que influyen en la liberación de estos compuestos al vino, de entre los que cabe destacar el tamaño de los chips, la dosis o el tiempo de contacto con el vino. Así pues, diversos autores han observado una mayor concentración de compuestos tales como vainillina, guayacol o elagitaninos cuando se utilizan con chips con un menor tamaño de partícula (Le Grottaglie et al. 2015, Fernández de Simón et al. 2010, Del Álamo Sanza et al. 2004). Del mismo modo, dosis más elevadas producen un importante incremento en los aromas de “madera”, produciendo una pérdida de aromas deseables para el consumidor (Pérez-Coello et al. 2000). Las dosis de chips utilizadas oscilan entre 2 y 8 g/L, por lo que el tiempo de contacto de estos con el vino dependerá de las características finales deseadas, pudiendo variar desde algunos días, a semanas e incluso meses.

Asimismo, el momento de adición de los chips durante la vinificación también debe ser tenido en cuenta, ya que estos pueden ser agregados al mosto, o alternativamente, adicionarse en los depósitos a vino terminado.

Sin embargo, el hecho de que éste sea un proyecto de Tesis pionero en el estudio del sarmiento para su uso como aditivo enológico, hace que no existan datos sobre cómo influyen todos estos factores en la transferencia de compuestos desde los sarmientos al vino. Por tanto, los 2 artículos que se recogen en este apartado tratan sobre: A) La selección de las mejores condiciones en las que los sarmientos tostados liberan a un vino modelo



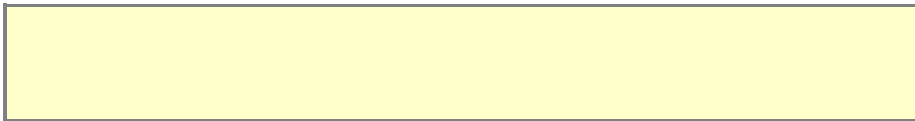
los principales compuestos de interés enológico (*Artículo IV*) y B) Evaluar el efecto de la adición de sarmientos a vinos reales en distintos momentos de su proceso de vinificación (*Artículo V*). Además, se realizó un análisis sensorial buscando la presencia de descriptores específicos del sarmiento.



7.2.2. Artículos publicados.

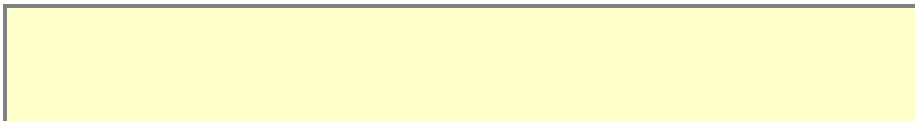
Artículo IV:

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



Artículo V:

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



7.2.2.1. Resumen *Artículo IV.*



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



7.2.2.2. Resumen *Artículo V.*



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



7.2.3. Resultados no publicados: Análisis sensorial.

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD





ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



8.

DISCUSIÓN CONJUNTA Y
PERSPECTIVAS DE FUTURO

RESULTS OVERVIEW AND
FURTHER INSIGHTS

En los últimos años, la viticultura ha intentado combinar la constante necesidad que tiene el sector de adaptar, mejorar y optimizar sus procesos, con la calidad final de sus productos, conduciendo indudablemente al sector hacia una *"Vitivinicultura Sostenible"*. Un ejemplo de tal preocupación queda reflejada en la guía de la OIV (OIV, 2008) donde se hace hincapié en la gestión de los residuos y subproductos de la viticultura, dando prioridad a aquellos sistemas que promuevan su reducción.

Los sarmientos son un residuo de difícil gestión dada su gran concentración anual en países productores de vino como, por ejemplo España, donde destaca la región de Castilla-La Mancha con casi el 50% de la superficie de cultivo dedicado a la vid. Esto, unido a la falta de una solución efectiva y de bajo coste, hace que la práctica más extendida para gestionar dichos residuos sea su quema en el campo, lo cual supone una importante problemática medioambiental. Como consecuencia, surge la necesidad de hallar una alternativa viable, desde el punto de vista económico, para la revalorización de este residuos.

En esta línea, trabajos previos demostraron que los extractos acuosos de sarmiento aplicados foliarmente al viñedo poseen un efecto *"feedback"* o de retorno al vino de muchos de los compuestos presentes en el extracto, afectando positivamente a su calidad. Por tanto, si los sarmientos poseen compuestos con interés enológico capaces de mejorar la calidad final de los vinos, *¿por qué no utilizar directamente los sarmientos en el vino?*. En la búsqueda de una respuesta a esta pregunta surgió este proyecto de Tesis Doctoral, donde se plantea como iniciativa para la reducción y revalorización de los sarmientos su uso como *aditivos enológicos*, optimizando así el ciclo agronómico del viñedo y aprovechando todo lo que este nos ofrece de una manera sostenible.

El uso de chips de roble como sistema alternativo a la barrica, ha generado en los últimos años la necesidad de buscar nuevas fuentes de



madera de calidad adecuada para la enología. La posibilidad de modular la composición química de los vinos utilizando su propia madera no es descabellada si tenemos en cuenta, tal y como se ha demostrado, la similitud que existe entre la madera de roble y la de sarmiento. Además, la gran superficie de viñedo que hay concentrada en esta región castellano-manchega, y la diversidad de variedades cultivadas que garantizaría la diversificación de productos, la convierte en un lugar ideal para desarrollar una nueva industria regional, que daría un valor añadido al sector vitivinícola.

El hecho de que el almacenamiento a temperatura ambiente de los sarmientos incremente la concentración de los compuestos con valor enológico y, por tanto, que no sea necesario tratar estos inmediatamente después de la poda, como se indicó en el *Artículo 1 y 2*, representa una importante estrategia para su gestión. Es decir, no sería necesario disponer de instalaciones especiales de almacenamiento y podrían procesarse durante un periodo de tiempo más amplio.

Además, en el *Artículo 3* se demostró que el tostado de los sarmientos potencia todos los aromas de madera que también se encuentran en el roble, pero con la diferencia de que los taninos del sarmiento son condensados y no elágicos, tal como se concluyó en el *Artículo 2*. Estas características, en una región como Castilla-La Mancha donde la gran producción de vino tinto se traduce en una feroz competencia para comercializarlos, podría dar lugar a vinos tintos con un perfil sensorial distintivo, como por ejemplo vinos jóvenes con notas de vainilla y tostados, pero con características sensoriales diferentes a los tradicionales vinos tintos envejecidos con roble.

Durante los últimos años la evolución general de la superficie de viñedo en España ha caído considerablemente. En ese tiempo, la que fue la uva más plantada del mundo, la Airén, ha descendido en aproximadamente un



30%. Esto se debe a que durante mucho tiempo y debido a la su alta productividad, se fomentó la plantación de esta variedad para ser usada en la elaboración de vinos a granel, a pesar de su bajo potencial enológico, al ser bastante plana. Sin embargo, en el *Artículo 5* de esta tesis, se ha demostrado que utilizar fragmentos de sarmientos de Airén como aditivo enológico, tanto en formato granulado como chips, produce un incremento significativo de compuestos volátiles, florales y frutales, que potencian el carácter varietal de los vinos. Pero además, se mejoran las propiedades funcionales de los mismos, ya que aumenta considerablemente el contenido del tan apreciado *trans-resveratrol*, lo cual no es posible al utilizar chips de roble.

Sin embargo, el camino para poder utilizar los sarmientos como aditivos enológicos debe pasar previamente por una aprobación regulatoria. Organismos como la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV), así como las agencias nacionales e internacionales de seguridad alimentaria legislan el uso del vino y los aditivos alimentarios. La autorización generalmente se produce después de una petición y una evaluación sobre sus condiciones de uso y de seguridad sobre la toxicología del producto. Esto último ha sido prácticamente descartado en esta Tesis Doctoral con los análisis realizados sobre la trazabilidad de los residuos de plaguicidas durante el almacenamiento y el tostado (*Apartado 7.1.3*). Por otro lado, el origen de los aditivos es un factor importante que facilita la autorización. En ese sentido, el origen natural de los sarmientos, y el hecho de que se hayan utilizado de forma tradicional como filtro en las bodegas sin tenerse constancia de problemas derivados de esta práctica, representa una perspectiva favorable para la autorización de los sarmientos como aditivo enológico.

Por tanto y teniendo en consideración todo lo anterior podemos concluir que los sarmientos pueden ser considerados como potenciales aditivos



enológicos, cuya utilización conectaría la viticultura y la enología a través del nuevo concepto de “*Vitivinicultura Circular*”.



In the last years, viticulture has tried to combine the constant need for this sector to adapt, improve and optimize their processes and the quality of their products, leading unquestionably to the sector towards a "Sustainable Vitiviniculture". An example of such concern is shown in the OIV guide (OIV, 2008) which highlights the management of waste, giving priority to those systems that promote their reduction.

Vine-shoots are a difficult waste to manage due to their high annual concentration in wine producing areas as, for example Spain, among which Castilla-La Mancha stands out with almost 50% of the cultivated area dedicated to the vine. This, together with the lack of an effective and low-cost solution, means that the most widespread practice for managing these wastes is to burn them in the field, which is an important environmental problem. Then, the need arises to find a viable alternative, from the economic point of view, for the revaluation of this waste.

With this objective, previous works showed that vine-shoot aqueous extracts applied to the vineyard have a "feedback" effect or return to the wine of the compounds present within the extract, affecting positively to the wine quality. Therefore, if vine-shoots have compounds with interest for wine and can improve its final quality, why not use vine-shoots directly in the wine? With this aim and looking for an answer to this question, this Doctoral Thesis project arose, where vine-shoots use as enological additive is proposed. Such alternative for their reduction and revalorization will optimize the vineyard's agronomic cycle, taking advantage of everything that it offers us in a sustainable way.

The use of oak chips as an alternative to barrels, has generated in the last years the need of finding new wood sources with enough quality for wines. The possibility to modulate the chemical composition of wines using their own wood is not out of one's mind if we take into account, as it has been demonstrated, the similarity between oak and vine-shoot woods. In



addition, the large areas of vineyard concentrated in this region of Castilla-La Mancha, and the diversity of varieties that would guarantee the diversity of products, makes it a suitable place to develop a new regional industry, which would give an added value to the wine sector.

The fact that the post-pruning storage at room temperature of vine-shoots increase the concentration of high-value enological compounds and, therefore, that it is not necessary to process them immediately after pruning, as it was specified in *Papers 1 and 2*, it represents an important strategy for such waste management. Since, it would not be necessary to have a special place for their storage and they could be processed for a longer period of time.

Moreover, it has been proved that vine-shoots toasting, *Paper 3*, enhances the oak like wood aromas, and that vine-shoots have condensed tannins and not ellagitannins, as it was concluded in *Paper 2*. These particular characteristics, in a region such as Castilla-La Mancha where the large production of red wine involves into a fierce competition to commercialize the wine, could lead to obtain red wines with a distinctive sensory profile, as for example, young wines with vanilla and toasted aroma notes, but with different sensorial characteristics from the traditional red wines aged in contact with oak.

In the last years, the evolution of the Spanish vineyard area has changed/decreased considerably, as the most cultivated grape in the world, Airén, has decreased their production approximately a 30%. This effect is a consequence of its long-time cultivation as it was encouraged to be used in the production of bulky wines, due to its high production, but it has a low enological potential, as it is considered a non-aromatic variety.

In *Paper 5*, it has been shown that fragments of Airén vine-shoots in contact with wines, as enological additive in granule or chip format, produced a significant increase in volatile, floral and fruit compounds, enhancing the



varietal character of the resulting wines. But in addition, the functional properties of such wines were improved, due to the high increment of *trans*-resveratrol content, which is not possible to detect when oak chips are used.

However, the way to use vine shoots as enological additives must first go through regulatory approval. Organizations such as the International Organization of Vine and Wine (OIV), as well as national and international food safety agencies could legislate the use of wine and food additives, previously to an evaluation about its use, and more important to assure the safety for consumers. This last point, safety, has been practically discarded in this Doctoral Thesis with the analyzes carried out about the pesticide residues during post-pruning storage and toasting (*Section 7.1.3*). On the other hand, the origin of the additives is an important factor to provide such approval. The natural origin of vine-shoots, and the fact that they have been used in a traditional way as a filter in the cellars without being aware of problems deriving from this practice, represents a favorable outlook for the authorization of vine-shoots as enological additives.

Therefore, and taking into account all the above, we can conclude that vine-shoots should be considered as a potential enological additives, whose use would connect viticulture and enology through the new concept of "*Circular Vitiviniculture*".



9.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

De los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral sobre la caracterización de los sarmientos, Airén y Cencibel, y su aptitud para ser utilizados como aditivos enológicos, se derivan las siguientes conclusiones:

1. La fracción minoritaria de los sarmientos, compuestos fenólicos y volátiles, sigue evolucionando después de su poda, llegando a alcanzar su máximo contenido tras 6 meses de almacenamiento, independientemente de la variedad estudiada. Destaca por su interés enológico, la acumulación de vainillina en Cencibel hasta un 35%, mientras que en Airén es de un 17%. En el caso de compuestos fenólicos destaca, por su demostrado efecto positivo en la salud, el aumento significativo de *trans*-resveratrol que multiplicó hasta 5 veces su contenido.
2. Los taninos de los sarmientos son proantocianidinas, en cuya composición predominan las procianidinas. El grado medio de polimerización es próximo a 3 y el porcentaje de galoilación está entre 8 y 10, siendo mayor en Airén que en Cencibel. El mayor contenido de taninos en los sarmientos de Airén se alcanza a los 6 meses de almacenamiento, mientras que en Cencibel es a los 3 meses.
3. ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD
4. El almacenamiento del sarmiento durante 6 meses, disminuyó la concentración de los residuos de plaguicidas más comúnmente utilizados en el viñedo hasta valores por debajo del LMRs en uvas, pudiéndose eliminar totalmente dichos residuos con el tostado.



5. ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD
6. ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD
7. ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD
8. Los sarmientos de poda almacenados durante 6 meses y posteriormente tostados, pueden ser considerados como un



potencial aditivo enológico capaz de modular el aroma de los vinos e incrementar su efecto positivo en la salud.

9. Esta revolucionaria propuesta, supone un nuevo aprovechamiento del mayor residuo que se genera en el sector vitivinícola, especialmente en Castilla-La Mancha, donde las variedades Airén y Cencibel son las mayoritarias, lo cual conecta la viticultura y la enología a través del nuevo concepto de "*Vitivinicultura Circular*".



From the studies carried out in this Doctoral Thesis, about the characterization of Airén and Cencibel vine-shoots and their potential use as enological additive, the following conclusions can be made:

1. The minor fraction of vine-shoots, phenolic and volatile compounds, increases its concentration during the post-pruning storage reaching the highest concentration after 6 months, independently of the varieties tested. It stands out for its enological interest, the accumulation of vanillin in Cencibel up to 35%, while in Airén it is 17%. In case of phenolic compounds, it is important to note the increment of *trans*-resveratrol, due to its well-known positive health effect, which increased up to fivefold its concentration.
2. Vine-shoot tannins are proanthocyanidins type. Their mean degree polymerization is close to 3 and the percentage of galloylation ranged between 8 and 10, being higher in Airén than in Cencibel. The highest content of tannins in Airén vine-shoots is reached after 6 months of storage, while in Cencibel is at 3 months of storage.
3. ELIIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD
4. Vines-shoots post-pruning storage during 6 months decreased the concentration of most pesticides commonly used in vineyard, below their LMRs in grapes, which can be completely removed with toasting.
5. ELIIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD



6. ELIIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD
7. ELIIMINADA ESTA SECCIÓN POR CONVENIO DE CONFIDENCIALIDAD
8. Vine-shoots post-pruning stored for 6 months and later toasted should be consider as a potential enological additive which can modulate the aroma of wines and increase their positive effect on health.
9. This revolutionary proposal involves a new use of the largest waste generated within the wine sector, especially in Castilla-La Mancha where Airén and Cencibel varieties are the most significant, connecting viticulture and enology with a new concept of "*Circular Vitiviniculture*".



10.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAPHY

A

- Alañón, M. E., Pérez-Coello, M. S., Díaz-Maroto, I. J., Martín-Alvarez, P. J., Vila-Lameiro, P., Díaz-Maroto, M. C. Influence of geographical location, site and silvicultural parameters, on volatile composition of *Quercus pyrenaica* Willd. wood used in wine aging. *Forest Ecology and Management*. **2011**, 262, 124-130.
- Alañón, M. E., Schumacher, R., Castro-Vázquez, L., Díaz-Maroto, M. C., Hermosín-Gutiérrez, I., Pérez-Coello, M. S. Enological potential of chestnut wood for aging Tempranillo wines Part II: Phenolic compounds and chromatic characteristics. *Food Research International*. **2013**, 51, 536-543.
- Alañón, M. E., Marchante, L., M. Alarcón, Díaz-Maroto, I. J., Pérez-Coello, S., M. C. Díaz-Maroto Fingerprints of acacia aging treatments by barrels or chips based on volatile profile, sensorial properties, and multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2018**, 98, 5795-5806.
- Arapitsas, P., Antonopoulos, A., Stefanou, E., Dourtoglou, V. G. Artificial aging of wines using oak chips. *Food Chemistry*. **2004**, 86, 563-570.
- Azuara, M., Sáiz E., Manso, J. A., García-Ramos, F. J., Manyà, J. J. Study on the effects of using a carbon dioxide atmosphere on the properties of vine shoots-derived biochar. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, **2017**, 124, 719-725.

B

- Barba, A., Camara, M. A., Garcia, S. N., Sanchez-Fresneda, C., de Hierro, N. L., Acebes, A. Disappearance of bromopropylate residues in artichokes, strawberries and beans. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. **1991**, 26, 323-332.
- Barroso-Bogeat, A., Alexandre-Franco, M., Fernández-González, C., Macías-García, A., Gómez-Serrano, V. Temperature dependence of the electrical conductivity of activated carbons prepared from vine shoots by physical and chemical activation methods. *Microporous and Mesoporous Materials*. **2015**, 209, 90-98.
- Billard, C., Izard, J. C., Roman, V., Kern, C., Mathiot, C., Mentz, F., Kolb, J. P. Comparative antiproliferative and apoptotic effects of resveratrol, ϵ -viniferin and vine-shots derived polyphenols



- (Vineatrols) on chronic B lymphocytic leukemia cells and normal human lymphocytes. *Leukemia and Lymphoma*. **2002**, 43, 1991-2002.
- Billet, K., Houillé, B., Besseau, S., Mélin, C., Oudin, A., Papon, N., Courdavault, V., Clastre, M., Giglioli-Guivarch, N., Lanoue, A. Mechanical stress rapidly induces E-resveratrol and E-piceatannol biosynthesis in grape canes stored as a freshly-pruned byproduct. *Food Chemistry*, **2018**, 240, 1022-1027.
- Boidron, J. N., Chatonnet, P., Pons, M. Influence du bois sur certaines substances odorantes des vins. *Conn Vigne Vine*. **1988**, 22, 275-294.
- Bordiga, M., Travaglia, F., Locatelli, M., Coïsson, J. D., Arlorio, M.. Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chemistry*. **2011**, 127, 180-187.
- Braca, A., De Tommasi, N., Di Bari, L., Pizza, C., Politi, M., Morelli, I. Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products*. **2001**, 64, 892-895.
- Brebu, M. & C. Vasile Thermal degradation of lignin - A review. *Cellulose Chemistry and Technology*. **2010**, 44, 353-363.
- Briones, R., Torres, L., Saravia, Y., Serrano, L., Labidi, J. Liquefied agricultural residues for film elaboration. *Industrial Crops and Products*. **2015**, 78, 19-28.
- Brizuela, L., Dayon, A., Doumerc, N., Ader, I., Golzio, M., Izard, J. C., Hara, Y., Malavaud, B., Cuvillier, O. The sphingosine kinase-1 survival pathway is a molecular target for the tumor-suppressive tea and wine polyphenols in prostate cancer. *FASEB Journal*. **2010**, 24, 3882-3894.

C

- Cadahía, E., Fernández de Simón, B., Jalocha, J. Volatile compounds in Spanish, French, and American oak woods after natural seasoning and toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 5923-5932.
- Cadahía, E., Varea, S., Muñoz, L., Fernández de Simón, B., García-Vallejo, M. C. Evolution of ellagitannins in Spanish, French, and American oak woods during natural seasoning and toasting. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2001**, 49, 3677-3684.



- Canas, S., Leandro, M. C., Spranger, M. I., Belchior, A. P. Influence of botanical species and geographical origin on the content of low molecular weight phenolic compounds of woods used in Portuguese cooperage. *Holzforschung*. **2000**, 54, 255-261.
- Cardoso, J. A. S. B., Šljukić, B., Erdem, M., Sequeira, C. A. C., Santos, D. M. F. Vine shoots and grape stalks as carbon sources for hydrogen evolution reaction electrocatalyst supports. *Catalysts*. **2018**, 8.
- Chatonnet, P., Cutzach, I., Pons, M., Dubourdieu, D. Monitoring toasting intensity of barrels by chromatographic analysis of volatile compounds from toasted oak wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1999**, 47 (10), 4310-4318
- Chinnici, F., Natali, A. Bellachioma, N., Versari, A., Riponi, C. Changes in phenolic composition of red wines aged in cherry wood. *LWT - Food Science and Technology*. **2015**, 60, 977-984.
- Chira, K., Teissedre, P.-L. Relation between Volatile composition, ellagitannin content and sensory perception of oak wood chips representing different toasting processes. *European Food Research and Technology*. **2013**, 236 (4), pp. 735-746.
- Corcho-Corral, B., Olivares-Marín, M., Valdes-Sánchez, E., Fernández-González, C., Macías-García, A., Gómez-Serrano, V. Development of activated carbon using vine shoots (*Vitis Vinifera*) and its use for wine treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, 644-650.
- Cruz, S., Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Gonzalo-Diago, A., Moreno-Rojas, J. M., Cantos-Villar, E. Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in white wine. *Food Packaging and Shelf Life*. **2018**, 18, 164-172.
- Çetin, E. S., Altinöz, D., Tarçan, E., Göktürk Baydar, N. Chemical composition of grape canes. *Industrial Crops and Products*. **2011**, 34, 994-998.

D

- Del Álamo-Sanza, M., Escudero, J. A. F., De Castro Torío, R., Changes in phenolic compounds and colour parameters of red wine aged with oak chips and in oak barrels. *Food Science and Technology International*, **2004**, 10, 233-241.



- Del Álamo-Sanza, M., Laurie, V. F., Nevares, I. Wine evolution and spatial distribution of oxygen during storage in high-density polyethylene tanks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2015**, 95, 1313-1320.
- Delgado De La Torre, M. P., Priego-Capote, F., Luque De Castro, M. D. Evaluation of the composition of vine shoots and oak chips for oenological purposes by superheated liquid extraction and high-resolution liquid chromatography-time-of-flight/mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 3409-3417.
- Delgado De La Torre, M. P., Priego-Capote, F., M. D. Luque De Castro. Comparison of the volatile profile of vine-shoots and oak chips by headspace-gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS). *Analytical Methods*. **2015**, 7, 1758-1769.
- Delgado-Torre, M. P., Ferreiro-Vera, C., Priego-Capote, F., Pérez-Juan, P. M., Luque De Castro, M. D. Comparison of accelerated methods for the extraction of phenolic compounds from different vine-shoot cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 3051-3060.
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J. L., Barral, M. T., Cruz, J. M., Moldes, A. B. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*. **2011**, 31, 2327-2335.
- Díaz-Gerevini, G. T., Repposi, G., Dain, A., Tarres, M. C., Das, U. N., Eynard, A. R. Beneficial action of resveratrol: How and why? *Nutrition*. **2016**, 32, 174-178.
- Domínguez, I. N., Del Álamo Sanza, M. Wine aging technologies. In *Recent Advances in Wine Stabilization and Conservation Technologies*. **2016**, 209-245.
- Dávila, I., Gordobil, O., Labidi, J., Gullón, P. Assessment of suitability of vine shoots for hemicellulosic oligosaccharides production through aqueous processing. *Bioresource Technology*. **2016**, 211, 636-644.
- Dávila, I., Gullón, B., Alonso, J. L., Labidi, J., Gullón, P. Vine shoots as new source for the manufacture of prebiotic oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **2019**, 207, 34-43.
- Díaz-Maroto, M. C., Guchu, E., Castro-Vázquez, L., de Torres, C., Pérez-Coello, M. S. Aroma-active compounds of American, French,



Hungarian and Russian oak woods, studied by GC-MS and GC-O. *Flavour and Fragrance Journal*. **2008**, 23, 93-98.

E

ECC. **1990**. Commission regulation VO 2676/90 concerning the establishment of common analytical methods in the sector of wine. *Official Journal of the European Union*.

ECC. **2006**. Commission Regulation (EC) No 1507/2006 amending Regulations (EC) No 884/2001 and (EC) No 753/2002 concerning certain detailed rules implementing Regulation (EC) No 1493/1999 on the common organization of the market in wine, as regards the use of pieces of oak wood in winemaking and the designation and presentation of wine so treated, 9-11. *Official Journal of the European Union*.

Ewald, P., Delker, U., Winterhalter, P. Quantification of stilbenoids in grapevine canes and grape cluster stems with a focus on long-term storage effects on stilbenoid concentration in grapevine canes. *Food Research International*, **2017**, 100, 326-331.

F

Fernández de Simón, B., Hernández, T., Cadahía, E., Dueñas, M., Estrella, I. Phenolic compounds in a Spanish red wine aged in barrels made of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*. **2003**, 216, 150-156.

Fernández De Simón, B., Cadahía, E., Conde, E., García-Vallejo, M. C. Low molecular weight phenolic compounds in Spanish oak woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **1996**, 44, 1507-1511.

Fernández de Simón, B., Cadahía, E., del Álamo, M., Nevares, I. Effect of size, seasoning and toasting in the volatile compounds in toasted oak wood and in a red wine treated with them. *Analytica Chimica Acta*. **2010**, 660, 211-220.

Fernández de Simón, B., Martínez, J., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A. M. Volatile compounds and sensorial characterisation of red wine aged in cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood barrels. *Food Chemistry*. **2014a**, 147, 346-356.

Fernández de Simón, B., Sanz, M., Cadahía, E., Martínez, J., Esteruelas, E., A. M. Muñoz Polyphenolic compounds as chemical markers of



wine aging in contact with cherry, chestnut, false acacia, ash and oak wood. *Food Chemistry*. **2014b**, 143, 66-76.

Fernández De Simón, B., Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A. M. Nontargeted GC-MS approach for volatile profile of toasting in cherry, chestnut, false acacia, and ash wood. *Journal of Mass Spectrometry*, **2014c**, 49, 353-370.

Fernández, M. J., Oliva, J., Barba, A., Cámara, M. A. Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration step. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2005**, 53, 804-811.

Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., Cantos-Villar, E. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*. **2012**, 130, 797-813.

Ferreira, V., López, R., Cacho, J. F. Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2000**, 80(11), 1659-1667.

G

Gabaston, J., Cantos-Villar, E., Biais, B., Waffo-Teguo, P., Renouf, E., Corio-Costet, M. F., Richard, T., Mérillon, J. M. Stilbenes from *Vitis vinifera* L. Waste: A Sustainable Tool for Controlling *Plasmopara Viticola*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2017**, 65, 2711-2718.

Gambini, J., Inglés, M., Olaso, G., Lopez-Grueso, R., Bonet-Costa, V., Gimeno-Mallench, L., Mas-Bargues, C., Abdelaziz, K. M., Gomez-Cabrera, M. C., Vina, J., Borrás, C. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2015**.

García-Estévez, I., Alcalde-Eon, C., Puente, V., Escribano-Bailón, M.T. Enological tannin effect on red wine color and pigment composition and relevance of the yeast fermentation products. *Molecules*. **2017**, 22, 2046,

Gañán, J., Al-Kassir Abdulla, A., Cuerda Correa, E. M., Macías-García, A. Energetic exploitation of vine shoot by gasification processes. A preliminary study. *Fuel Processing Technology*, **2006**, 87, 891-897.



- Gorena, T., Saez, V., Mardones, C., Vergara, C., Winterhalter, P., Von Baer, D. Influence of post-pruning storage on stilbenoid levels in *Vitis vinifera* L. canes. *Food Chemistry*. **2014**, 155, 256-263.
- Guchu, E., Díaz-Maroto, M. C., Díaz-Maroto, I. J., Vila-Lameiro, P., Pérez-Coello, M. S. Influence of the species and geographical location on volatile composition of spanish oak wood (*Quercus petraea* Liebl. and *Quercus robur* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 3062-3066.
- Guerrero, R. F., Biais, B., Richard, T., Puertas, B., Waffo-Teguo, P., Merillon, J. M., Cantos-Villar, E. Grapevine cane's waste is a source of bioactive stilbenes. *Industrial Crops and Products*. **2016**, 94, 884-892.
- Gupta, Y. K., Briyal, S. Protective effect of vineatrol against kainic acid induced seizures, oxidative stress and on the expression of heat shock proteins in rats. *European Neuropsychopharmacology*. **2006**, 16, 85-91.

H

- Hernández, T., Estrella, I., Dueñas, M., De Simón, B. F., Cadahía, E.. Influence of wood origin in the polyphenolic composition of a Spanish red wine aging in bottle, after storage in barrels of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*. **2007**, 224, 695-705.
- Houillé, B., Besseau, S., Courdavault, V., Oudin, A., Glévarec, G., Delanoue, G., Guérin, L., Simkin, A. J., Papon, N., Clastre, M., Giglioli-Guivarch, N., Lanoue, A. Biosynthetic origin of *E*-resveratrol accumulation in grape canes during postharvest storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2015a**, 63, 1631-1638.
- Houillé, B., S. Besseau, G. Delanoue, A. Oudin, N. Papon, M. Clastre, A. J. Simkin, L. Guérin, V. Courdavault, N. Giglioli-Guivarc'H & A. Lanoue Composition and Tissue-Specific Distribution of Stilbenoids in Grape Canes Are Affected by Downy Mildew Pressure in the Vineyard. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2015b**, 63, 8472-8477.



K

Klumpers, J., Scalbert, A., Janin, G. Ellagitannins in European oak wood: Polymerization during wood aging. *Phytochemistry*. **1994**, 36, 1249-1252.

Kyraleou, M., Teissedre, P.L., Tzanakouli, E., Kotseridis, Y., Proxenia, N., Chira, K., Ligas, I., Kallithraka, S. Addition of wood chips in red wine during and after alcoholic fermentation: Differences in color parameters, phenolic content and volatile composition. **2016**, *Oeno One*, 50, 4, 209-222.

L

Lambert, C., Richard, T., Renouf, E., Bisson, J., Waffo-Téguo, P., Bordenave, L., Ollat, N., Mérillon, J. M., Cluzet, S. Comparative analyses of stilbenoids in canes of major *Vitis vinifera* L. cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2013**, 61, 11392-11399.

Laqui-Estaña, J., López-Solís, R., Peña-Neira, Á., Medel-Marabolí, M., Obreque-Slier, E. Wines in contact with oak wood: the impact of the variety (Carménère and Cabernet Sauvignon), format (barrels, chips and staves), and aging time on the phenolic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2019**, 99, 436-448.

Le Grottaglie, L., García-Estévez, I., Romano, R., Manzo, N., Rivas-Gonzalo, J. C., Alcalde-Eon, C., Escribano-Bailón, M. T. Effect of size and toasting degree of oak chips used for winemaking on the ellagitannin content and on the acutissimin formation. *LWT - Food Science and Technology*. **2015**, 60, 934-940.

Ludin, D., Burg, P., Krakowiak-Bal, A., Višacki, V. The possibilities of using marc for manufacturing pellets for energy purposes. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*. **2016**, 64, 841-846.

M

MacKe, S., Jerz, G., Empl, M. T., Steinberg, P., Winterhalter, P. Activity-guided isolation of resveratrol oligomers from a grapevine-shoot extract using countercurrent chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 11919-11927.



- Manyà, J. J., Azuara M., Manso, J. A. Biochar production through slow pyrolysis of different biomass materials: Seeking the best operating conditions. *Biomass and Bioenergy*. **2018**, 117, 115-123.
- Marques, F. Z., Markus, M. A., Morris, B. J. Resveratrol: Cellular actions of a potent natural chemical that confers a diversity of health benefits. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. **2009**, 41, 2125-2128.
- Martínez-Gil, A., Cadahía, E., Fernández de Simón, B., Gutiérrez-Gamboa, G., Nevares, I., Del Álamo-Sanza, M. Phenolic and volatile compounds in *Quercus humboldtii* Bonpl. wood: effect of toasting with respect to oaks traditionally used in cooperage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2019**, 99, 315-324.
- Martínez-Gil, A. M., Pardo-García, A. I., Zalacain, A., Alonso, G. L., Salinas, M. R. Lavandin hydrolat applications to Petit Verdot vineyards and their impact on their wine aroma compounds. *Food Research International*. **2013**, 53, 391-402.
- Marín, A., Oliva, J., Garcia, C., Navarro, S., Barba, A. Dissipation rates of cyprodinil and fludioxonil in lettuce and table grape in the field and under cold storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 4708-4711.
- Mendivil, M. A., Muñoz, P., Morales, M. P., Juárez, M. C., García-Escudero, E. Chemical characterization of pruned vine shoots from la Rioja (Spain) for obtaining solid bio-fuels. *Journal of Renewable and Sustainable Energy*, **2013**, 5.
- Moldes, A. B., Vecino, X., Devesa-Rey, R., Cruz, J. M. Advances for environmental protection: Biosurfactants produced by lactobacilluspentosus from trimming vine shoots as alternative to chemical surfactants. In *IMETI 2011 - 4th International Multi-Conference on Engineering and Technological Innovation, Proceedings*. **2011**, 66-69.
- Mondini, C., Fornasier, F., Sinicco, T., Sivilotti, P., Gaiotti, F., D. Mosetti Organic amendment effectively recovers soil functionality in degraded vineyards. *European Journal of Agronomy*. **2018**, 101, 210-221.
- Morales, A. B., Bustamante, M. A., Marhuenda-Egea, F. C., Moral, R., Ros, M., Pascual, J. A. Agri-food sludge management using different co-



composting strategies: Study of the added value of the composts obtained. *Journal of Cleaner Production*. **2016**, 121, 186-197.

Mourão, P.A. M., Laginhas, C., Custódio, F., Nabais, J. M. V., Carrott, P. J. M., Carrott, M. M.L.R. Influence of oxidation process on the adsorption capacity of activated carbons from lignocellulosic precursors. *Fuel Processing Technology*. **2011**, 92, 241-246.

Müller, C., Ullmann, K., Wilkens, A., Winterhalter, P., Toyokuni, S., Steinberg, P. Potent antioxidative activity of vineatrol@30 grapevine-shoot extract. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. **2009**, 73, 1831-1836.

N

Nonier, M. F., Vivas, N., Vivas de Gaulejac, N., Absalon, C., Soulié, P., Fouquet, E. Pyrolysis-gas chromatography/mass spectrometry of *Quercus* sp. wood: Application to structural elucidation of macromolecules and aromatic profiles of different species. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. **2006**, 75, 181-193.

O

Obrenovich, M. E., Nair, N. G., Beyaz, A., Aliev, G., Reddy, V. P. The role of polyphenolic antioxidants in health, disease, and aging. *Rejuvenation Research*. **2010**, 13, 631-643.

OIV, *International Organisation of Vine and Wine*. **2008**. Guide of the OIV for a sustainable vitiviniculture: production, transformation and conditioning of the products. Resolution CST 1/2008.

P

Pascual, O., González-Royo, E., Gil, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Canals, J. M., Hermosín-Gutiérrez, I., Zamora F., Influence of Grape Seeds and Stems on Wine Composition and Astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2016**, 64, 6555-6566.

Payá, P., Anastassiades, M., MacK, D., Sigalova, I., Tasdelen, B., Oliva, J., Barba, A. Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2007**, 389 (6), 1697-1714.



- Peralbo-Molina, T., Luque de Castro, M. D. Potential of residues from the Mediterranean agriculture and agrifood industry. *Trends in Food Science and Technology*. **2013**, 32, 16-24.
- Pezzuto, J. M. Grapes and human health: A perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56. **2008**, 6777-6784.
- Poulose, S. M., Thangthaeng, N., Miller, M. G., Shukitt-Hal, B. Effects of pterostilbene and resveratrol on brain and behavior. *Neurochemistry International*. **2015**, 89, 227-233.
- Prida, A., Puech, J. L., Influence of geographical origin and botanical species on the content of extractives in American, French, and East European oak woods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2006**, 54, 8115-8126.
- Pérez-Coello, M. S., González-Viñas, M. A., García-Romero, E., Cabezudo, M. D., Sanz, J. Chemical and sensory changes in white wines fermented in the presence of oak chips. *International Journal of Food Science and Technology*. **2000**, 35, 23-32.
- Pérez-Rodríguez, N., García-Bernet, D., Domíngue, J. M. Effects of enzymatic hydrolysis and ultrasounds pretreatments on corn cob and vine trimming shoots for biogas production. *Bioresource Technology*. **2016**, 221, 130-138.

R

- Ralph, J., Lundquist, K., Brunow, G., Lu, F., Kim, H., Schatz, P. F., Marita, J. M., Hatfield, R. D., Ralph, S. A., Christensen, J. H., Boerjan, W. Lignins: Natural polymers from oxidative coupling of 4-hydroxyphenyl-propanoids. *Phytochemistry Reviews*. **2004**, 3, 29-60.
- Raposo, R., Ruiz-Moreno, M. J., Garde-Cerdán, T., Puertas, B., Moreno-Rojas, J. M., Gonzalo-Diago, A., Guerrero, R., Ortíz, V., Cantos-Villar, E. Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in red wine. *Food Chemistry*. **2016**, 197, 1102-1111.
- Rebello, L. P. G., Lago-Vanzela, E. S., Barcia, M. T., Ramos, A. M., Stringheta, P. C., Da-Silva, R., Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I. Phenolic composition of the berry parts of hybrid grape cultivar BRS Violeta (BRS Rubea×IAC 1398-21) using HPLC-DAD-ESI-MS/MS. *Food Research International*. **2013**, 54, 354-366.



- Rodríguez-Pazo, N., Salgado J. M., Cortés-Diéguez S., Domínguez, J. M. Biotechnological production of Phenylactic Acid and biosurfactants from Trimming Vine Shoot Hydrolyzates by Microbial Coculture fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **2013**, 169, 2175-2188.
- Romero, E., Delgado-Moreno, L., Nogales, R. Pesticide Dissipation and Enzyme Activities in Ungrassed and Grassed Biomixtures, Composed of Winery Wastes, Used in Biobed Bioremediation Systems. *Water, Air, and Soil Pollution*. **2019**, 230.
- Rubio-Bretón, P., Garde-Cerdán, T., Martínez, J. Use of Oak Fragments during the Aging of Red Wines. Effect on the Phenolic, Aromatic, and Sensory Composition of Wines as a Function of the Contact Time with the Wood. *Beverages*.**2018**, 4.
- Ruiz-Moreno, M. J., Raposo, R., Puertas, B., Cuevas, F. J., Chinnici, F., Moreno-Rojas, J. M., Cantos-Villar, E. Effect of a grapevine-shoot waste extract on red wine aromatic properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2018**, 98, 5606-5615.

S

- Santos, F., Correia, A. C., Ortega-Heras, M., García-Lomillo, J., González-SanJosé, M. L., Jordão, A. M., Ricardo-da-Silva, J. M. Acacia, cherry and oak wood chips used for a short aging period of rosé wines: effects on general phenolic parameters, volatile composition and sensory profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **2019**
- Sanz, M., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, Á. M., Fernández De Simón, B., Hernández, T., Estrella, I., Phenolic compounds in chestnut (*Castanea sativa* Mill.) heartwood. Effect of toasting at cooperage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2010**, 58, 9631-9640.
- Sanz, M., Fernández De Simón, B., Esteruelas, E., Muñoz, A. M., Cadahía, E., Hernández, T., Estrella, I., Pinto, E. Effect of Toasting Intensity at Cooperage on Phenolic Compounds in Acacia (*Robinia pseudoacacia*) Heartwood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2011**, 59, 3135-3145.
- Sanz, M., B. Fernández de Simón, Esteruelas, E., Muñoz, Á. M., Cadahía, E., Hernández, M. T., Estrella, I. Martínez, J. Polyphenols in red wine aged in acacia (*Robinia pseudoacacia*) and oak (*Quercus petraea*) wood barrels. *Analytica Chimica Acta*. **2012a**, 732, 83-90.



- Sanz, M., De Simón, B.F., Cadahía, E., Esteruelas, E., Muñoz, A.M., Hernández, T., Estrella, I., Pinto, E. LC-DAD/ESI-MS/MS study of phenolic compounds in ash (*Fraxinus excelsior* L. and *F. americana* L.) heartwood. Effect of toasting intensity at cooperage. *Journal of Mass Spectrometry*. **2012b**, 47 (7), 905-918.
- Sarneckis, C. J., Damberg, R. G., Jones, P., Mercurio, M., Herderich, M. J., Smith, P. A. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: Development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. **2006**, 12, 39-49.
- Singh, C. K., Ndiaye, M. A., Ahmad, N. Resveratrol and cancer: Challenges for clinical translation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. **2015**, 1852, 1178-1185.
- Sáez, V., Pastene, E., Vergara, C., Mardones, C., Hermosín-Gutiérrez, I., Gómez-Alonso, S., Gómez, M. V., Theoduloz, C., Riquelme, S., Von Baer, D. Oligostilbenoids in *Vitis vinifera* L. Pinot Noir grape cane extract: Isolation, characterization, in vitro antioxidant capacity and anti-proliferative effect on cancer cells. *Food Chemistry*. **2018**, 265, 101-110.
- Sánchez, A., Ysunza, F., Beltran-García, M. J., Esqueda, M. Biodegradation of viticulture wastes by *Pleurotus*: A source of microbial and human food and its potential use in animal feeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2002**, 50, 2537-2542.
- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., M. R. Salinas. Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: Phenolic, volatile, and mineral compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2014**, 62, 10861-10872.
- Sánchez-Gómez, R., Garde-Cerdán, T., Zalacain, A., Garcia, R., Cabrita, M. J., Salinas, M. R. Vine-shoot waste aqueous extract applied as foliar fertilizer to grapevines: Effect on amino acids and fermentative volatile content. *Food Chemistry*. **2016a**, 197, 132-140.
- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., M. R. Salinas. Effect of toasting on non-volatile and volatile vine-shoots low molecular weight phenolic compounds. *Food Chemistry*. **2016b**, 204, 499-505.



Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L., M. R. Salinas. Effect of vine-shoots toasting on the generation of high added value volatiles. *Flavour and Fragrance Journal*. **2016c**, 31, 293-301.

Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Pardo, F., Alonso, G. L., Salinas, M. R. An innovative use of vine-shoots residues and their “feedback” effect on wine quality. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. **2016d**, 37, 18-26.

Sánchez-Gómez, R. New strategy for the exploitation of vine-shoots: use of their extracts in the vineyard and effect on wine quality. *Doctoral thesis*. University of Castilla - La Mancha. **2017**.

Sánchez-Gómez, R., Sánchez-Vioque, R., Santana-Méridas, O., Martín-Bejerano, M., Alonso, G. L., Salinas, M. R., Zalacain, A. A potential use of vine-shoot wastes: The antioxidant, antifeedant and phytotoxic activities of their aqueous extracts. *Industrial Crops and Products*. **2017a**, 97, 120-127.

Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Pardo, F., Alonso, G. L., Salinas, M. R. Moscatel vine-shoot extracts as a grapevine biostimulant to enhance wine quality. *Food Research International*. **2017b**, 98, 40-49.

T

Teissedre, P. L. Wine and health. In *The Biochemistry of the Grape Berry*. **2012**, 269-285.

Terrett, O. M., Dupree, P. Covalent interactions between lignin and hemicelluloses in plant secondary cell walls. *Current Opinion in Biotechnology*. **2019**, 56, 97-104.

Trad, M., Le Bourvellec, C., Hamda, H. B., Renard, C. M. G. C., Harbi, M. Flavan-3-ols and procyanidins in grape seeds: biodiversity and relationships among wild and cultivated vines. *Euphytica*. **2017**, 213.

V

Vergara, C., Von Baer, D., Mardones, C., Wilkens, A., Wernekinck, K., Damm, A., MacKe, S., Gorena, T., Winterhalter, P. Stilbene levels in grape cane of different cultivars in southern Chile: Determination by HPLC-DAD-MS/MS method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2012**, 60, 929-933.



W

Wang, W., Tang, K., Yang, H.R., Wen, P.F., Zhang, P., Wang, H.L., Huang, W.D. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiology and Biochemistry*. **2010**, 48, 142-152.

Y

Yahya, M. A., Al-Qodah, Z., Ngah, C. W. Z. Agricultural bio-waste materials as potential sustainable precursors used for activated carbon production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **2015**, 46, 218-235.

Z

Zhang, B., Cai, J., Duan, C. Q., Reeves, M. J., He, F. A review of polyphenolics in oak woods. *International Journal of Molecular Sciences*. **2015**, 16, 6978-7014.



11.

OTRAS CONTRIBUCIONES

OTHER CONTRIBUTIONS

COMUNICACIONES A CONGRESOS

1. Congreso Nacional: **XVII Congreso Nacional de Enólogos**
Lugar y fecha: Mérida (España), mayo 2016.
Título: **Aprovechamiento de los sarmientos para ser usados como una nueva fuente de aditivos enológicos.**
2. Congreso Internacional: **In Vino Analytica Scientia**
Lugar y fecha: Salamanca (España), julio 2017.
Título: **Post-pruning accumulation of bioactive compounds, aroma and phenolic, in vine-shoots.**
3. Congreso Internacional: **In Vino Analytica Scientia**
Lugar y fecha: Salamanca (España), julio 2017.
Título: **Making ready a new enological additive by toasting vine-shoot wastes.**
4. Congreso Internacional: **In Vino Analytica Scientia**
Lugar y fecha: Salamanca (España), julio 2017.
Título: **Development of an analytical method form the determination of seven pesticides in vine-shoots using HPLC-Triple Quadrupole Tandem Mass Specrometry.**
5. Congreso Internacional: **In Vino Analytica Scientia**
Lugar y fecha: Salamanca (España), julio 2017
Título: **Dissapearance study of fungicide residues on treated vine-shoots.**
6. Congreso Internacional: **The Vine**
Lugar y fecha: Ámsterdam (Holanda), noviembre 2017.
Título: **Vine-shoot chips: a new possibility to improve the wines quality by “googling” into their origin.**
7. Congreso Nacional: **VII Jornadas Doctorales de la UCLM**
Lugar y fecha: Albacete (España), noviembre 2017.
Título: **Extracción de vainillina en vinos modelo en contacto con chips de sarmiento.**



8. Congreso Internacional: **Macrowine**
Lugar y fecha: Zaragoza (España), mayo 2018.
Título: **Extraction of volatile compounds in model wine in contact with vine-shoot chips.**
9. Congreso Internacional: **Macrowine**
Lugar y fecha: Zaragoza (España), mayo 2018.
Título: **Phenolic composition of wines elaborated in contact with vine-shoot chips.**
10. Congreso Nacional: **Gienol**
Lugar y fecha: Ciudad Real (España), junio 2018.
Título: **Eficacia de los sarmientos como chips enológicos empleando un vino modelo.**
11. Congreso Nacional: VIII Jornadas Doctorales de la UCLM
Lugar y fecha: Cuenca (España), octubre 2018.
Título: **Mejora de la calidad de los vinos utilizando sus propios recursos: chips de sarmiento.**
12. Congreso Internacional: **International Congress on Grapevine and Wine Science**
Lugar y fecha: Logroño (España), noviembre 2018.
Título: **Vine-shoot chips improve the wine quality.**
13. Congreso Internacinal: **In Vino Analytica Scientia**
Lugar y fecha: Burdeos (Francia), junio 2019.
Título: **Toasted vine-shoots used as oenological additives increase the vanillin and trans-resveratrol content of wines.**

PUBLICACIONES EN REVISTAS NACIONALES

1. Revista: La Semana Vitivinícola
Título: **Aprovechamiento de los sarmientos de poda como chips para el vino.**
Nº 3522, pp. 1094 - 1101. ISSN 0037-184X. 2018





APROVECHAMIENTO DE LOS SARMIENTOS PARA SER USADOS COMO NUEVA FUENTE DE ADITIVOS ENOLÓGICOS (PROYECTO SAGROVID)



Sánchez-Gómez, R.¹; Zalacain, A.¹; Cebrián, C.¹; Oliva, J.²; Alonso, G. L.¹; Salinas, M. R.^{1*}

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

²Universidad de Murcia. Dpto. Química Agrícola, Geología y Edafología, Campus de Espinardo s/n, 30100, Murcia

Los sarmientos de poda constituyen el más abundante residuo de la viña, estimándose su producción media cercana a 1,5 toneladas por hectárea al año.

La Unión Europea en su Directiva 2008/98/CE declara que la prioridad en la gestión de residuos debe ser su reutilización y reciclado con preferencia a su valorización energética

| USOS MÁS HABITUALES | NUEVOS USOS BASADOS EN SUS COMPONENTES BIOACTIVOS |
|---|---|
| <p style="text-align: center;">NO TIENEN EN CUENTA SUS COMPUESTOS BIOACTIVOS</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="width: 45%;"> <p>Su valor económico actual es tan bajo que normalmente se abandonan en la zona o se queman</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>Liberación de compuestos tóxicos derivados de la combustión de la lignina o de los tratamientos fitosanitarios que se realizan en las viñas: CONTAMINACIÓN AMBIENTAL</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="width: 45%;"> <p>En gastronomía se usan sin procesar para preparar arroz, salsas y verduras.</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>Se usan en forma de pellets para calefacción por su alto poder calórico</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="width: 45%;"> <p>Trituración y aplicación al suelo para favorecer el drenaje</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>Uno de sus principales usos es como compost</p> </div> </div> | <p style="text-align: center;">COMPONENTES DE EXTRACTOS ACUOSOS DE SARMIENTOS [3]</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="width: 30%; text-align: center;"> <p>BIOPLAGUICIDAS [2]</p> <p>Inhiben el apetito de <i>Lopánotaxa decemlineata</i></p> <p>Inhiben la germinación de <i>Lactuca perennis</i></p> <p>Estimulan la elongación radicular de <i>Lactuca sativa</i></p> </div> <div style="width: 30%; text-align: center;"> <p>FUENTES DE ESTILBENOS: Resveratrol</p> <p>Los sarmientos son una fuente muy importante de estilbenos como el resveratrol</p> <p>El resveratrol se usa por su potente acción antioxidante, anticarcinogénica, cardioprotectora y neuroprotectora</p> </div> <div style="width: 30%; text-align: center;"> <p>BIOESTIMULANTES DE LA VID [1]</p> <p>Aplicados a las hojas de la vid producen un efecto «feedback» mejorando la calidad del vino</p> <p>Los vinos resultantes de las cepas tratadas con estos extractos de sarmiento tienen mejor color y aroma</p> </div> </div> |
| <p>OTROS USOS PROPUESTOS</p> <ul style="list-style-type: none"> ■ BIOFUEL ■ CARBONES ACTIVOS PARA LA INDUSTRIA ENOLÓGICA ■ OBTENCIÓN DE ÁCIDO LÁCTICO, COLORANTES, ETC | |



NUEVA APLICACIÓN COMO ADITIVOS ENOLÓGICOS

» LOS SARMIENTOS POSEEN SIMILITUDES CON LA MADERA DE ROBLE [3]

» TIENEN COMPUESTOS DEL AROMA QUE FORMAN PARTE DE LA COMPONENTE VARIETAL DEL AROMA DEL VINO [3,4,5]

» LOS TRATAMIENTOS FITOSANITARIOS DEL VIÑEDO HACEN QUE LOS SARMIENTOS SEAN POTENCIALES ACUMULADORES DE PLAGUICIDAS DE SÍNTESIS

» EL TOSTADO DE LOS SARMIENTOS GENERA COMPUESTOS AROMÁTICOS DE GRAN INTERÉS ENOLÓGICO [4,5]

Comparación de algunos compuestos aromáticos en sarmiento sin tostar y tostado [4,5]

| Compuesto | Sarmiento sin tostar (µg/kg) | Sarmiento tostado (µg/kg) |
|------------------------|------------------------------|---------------------------|
| Furánicos (mg/kg) | ~10 | ~150 |
| Eugenol (µg/kg) | ~5 | ~10 |
| Guayacol (µg/kg) | ~5 | ~10 |
| Terpenoles (µg/kg) | ~5 | ~10 |
| Whiskylactonas (µg/kg) | ~5 | ~10 |
| Vainillina XS (µg/kg) | ~5 | ~10 |

PRETENDEMOS:
EVALUAR LA CAPACIDAD DE LOS SARMIENTOS DE PODA PARA USARLOS COMO UNA NUEVA FUENTE DE ADITIVOS ENOLÓGICOS, DEL MISMO MODO QUE SE UTILIZAN LOS CHIPS DE ROBLE, Y ELIMINANDO DE ESTOS LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación del MINECO, en colaboración con fondos FEDER, tanto del proyecto de ref. AGL2012-33132 como al reclutamiento concedido de ref. AGL2015-65133-C2-3-R. R. S-G. también desea agradecer a la Universidad de Castilla-La Mancha el contrato predoctoral PREDUCLM17.

REFERENCIAS

- [1] Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso G.L., Salinas, M.R. An innovative use of vine-shoots residues and their "feedback" effect on wine quality. Under review.
- [2] Sánchez-Gómez, R., Sánchez-Vioque, R.; Santana-Méridas, O.; Martín-Bejerano, M.; Alonso, G.L.; Salinas, M.R., Zalacain, A. A potential use of vine-shoot wastes: the antioxidant, antifungal and phytotoxic activities of their aqueous extracts. Under review.
- [3] Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G.L., Salinas, M.R. Vine-shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: Phenolic, volatile, and mineral compounds. J. Agric. Food Chem. 2014, 62, 10861-10872.
- [4] Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso G.L., Salinas, M.R. Effect of vine-shoots toasting on the generation of high added value volatiles. Flavor. Frag. J. 2016. DOI: 10.1002/FF.3313
- [5] Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso G.L., Salinas, M.R. Effect of toasting intensity on Alirén and Moscatel vine-shoots low molecular weight phenolic compounds. Food Chem. 2016. 204, 499-505





POST-PRUNING ACCUMULATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS, AROMA AND PHENOLICS, IN VINE-SHOOTS



Cebrián, Cristina; Sánchez-Gómez, Rosario; Zalacain, Amaya; Alonso, Gonzalo L.; Salinas, M. Rosario*

Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Cátedra de Química Agrícola, Avda. de España s/n, 02071 Albacete, Spain.

*Rosario.Salinas@uclm.es

INTRODUCTION

- The EU states that the priority in waste management should be their reuse and recycle better than their energy recovery.
- Vine-shoots are a valuable source of bioactive compounds, that make them interesting for applications different than the current ones.
- Recent studies in relation to stilbenes have shown an accumulation of these compounds after some post-pruning time [1]. That suggests that the secondary metabolism persist in harvested vine-shoots, involving biosynthesis of many other minority compounds, which may be of a great importance for their possible innovative uses. However...

...what about the other minor compounds after post-pruning storage?

SAGROID PROJECT

"USE OF VINE-SHOOTS AS A NEW SOURCE OF OENOLOGICAL ADDITIVES AND NATURAL AGROCHEMICALS WITH BIOSTIMULANT AND PHYTOSANITARY PROPERTIES FOR THE VINEYARD"

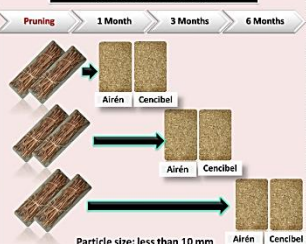


OBJECTIVE

TO DETERMINE THE EVOLUTION OF TWO ORGANIC VINE-SHOOTS, AIRÉN AND CENCIBEL, BIOACTIVE COMPOUNDS AFTER ONE, THREE AND SIX MONTHS OF THEIR PRUNING

MATERIALS AND METHODS

POST-PRUNING SAMPLING



VINE-SHOOT EXTRACTS

Microwave (NEOS) extraction: 75°C (600W) for 12 minutes with reflux to prevent dryness



Vine-shoots extracts were carried out for each variety and sampling time

- AVS-1M: Airén vine-shoots at 1 month.
- AVS-3M: Airén vine-shoots at 3 months.
- AVS-6M: Airén vine-shoots at 6 months.

- CVS-1M: Cencibel vine-shoots at 1 month.
- CVS-3M: Cencibel vine-shoots at 3 months.
- CVS-6M: Cencibel vine-shoots at 6 months.

CHEMICAL COMPOUNDS

Bioactive compounds analysis was carried out by:

- HPLC-DAD-MS for phenolic compounds [2]

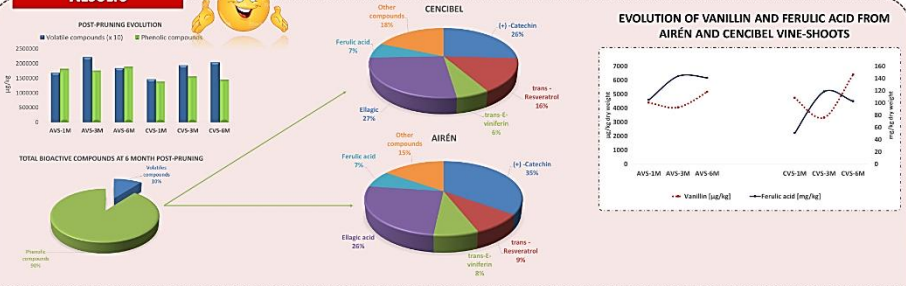
- HS-SPSE-GC-MS for volatile compounds [2]



- HS-SPSE-GC-MS for volatile compounds [2]



RESULTS



CONCLUSIONS



- Vine-shoots post-pruning storage have a direct impact on the final concentration of minor compounds, non-volatile phenolic and volatiles compounds, independently of the cultivars.
- Phenolics were the most important chemical family: 2 g/kg and 1.6 g/kg of dry matter in Airén and Cencibel respectively.
- A significant accumulation of (+)-catechin, ellagic acid, trans-resveratrol (as reported in other papers), trans-ε-viniferin and ferulic acid was observed at 6 months post-pruning storage.
- Vanillin concentration increment was related to the decrement of ferulic acid with the time, reporting levels higher than those found until now in vine-shoots.

VINE-SHOOTS WITH 6 MONTHS OF POST-PRUNING STORAGE COULD BE A PROMISING BIORESOURCE OF BIOACTIVE COMPOUNDS WITH INNOVATIVE POTENTIAL APPLICATIONS SUCH A FLAVOURING SOURCE IN WINES!!

REFERENCES

- Houllé, B., Bessiau, S., Courtois, V., Ouellet, A., Ghanem, G., Delmas, G., Guerin, L., Simko, A., Papan, N., Destrie, M., Sighele-Guivarch, N., Lenoir, A. (2015). Biosynthetic origin of ε-resveratrol accumulation in grape canes during postharvest storage. *J. Agric. Food Chem.* 63 (5), 1633-1638.
- Sánchez-Gómez, R., Zalacain, A., Alonso, G. L. & Salinas, M. R. (2014). Vine shoot waste aqueous extracts for re-use in agriculture obtained by different extraction techniques: Phenolic, volatile and mineral compounds. *J. Agric. Food Chem.* 62, 10861-10872.

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Ministry of Economy and Competitiveness-FEDER of the Spanish Government to the Project AGL2015-65133-C2-3-R, S.C. to her predoctoral contract (PREDOCUM7) from UCLM To Manuel Márquez (Viticultural Service Company) for supplying the vine-shoots.



3

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD





DEVELOPMENT OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF SEVEN PESTICIDES IN VINE-SHOOTS USING HPLC-TRIPLE QUADRUPOLE TÁNDEM MASS SPECTROMETRY



Cámara, Miguel Ángel^a; Oliva, José^b; Cebrián, Cristina^b; Sánchez-Gómez, Rosario^b; Zalacain, Amaya^b; Salinas, M. Rosario^{b*}

^a Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología, Facultad de Química, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100, Murcia (Spain).

^b Grupo de Química Agrícola, E.T.S. de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. España s/n. 02071, Albacete (Spain). Rosario.Salinas@uclm.es

INTRODUCTION

- Demand for good agricultural practices and consumer concern about pesticide traces in plant food, has obligated governments to establish analytical methodologies to ensure the hygiene of these food.
- Many applications of pesticide are made in the vineyards during the development of the grape.
- The analytical control of pesticide residues on grape has been widely studied, after application on grapevines. However...

... There isn't any study to determine the pesticides residues in any viticulture waste, such as vine-shoots.

SAGROVID PROJECT

"USE OF VINE-SHOOTS AS A NEW SOURCE OF OENOLOGICAL ADDITIVES AND NATURAL AGROCHEMICALS WITH BIOSTIMULANT AND PHYTOSANITARY PROPERTIES FOR THE VINEYARD"

OBJECTIVE DEVELOPMENT IN VINE-SHOOTS MATRIX FOR THE ANALYSIS OF SEVEN PESTICIDES WIDELY USED IN VINEYARDS

MATERIALS AND METHODS

PESTICIDES IN VINEYARDS

FUNGICIDES

- Boscalid
- Kresoxim-methyl
- Penconazole
- Tryfloxistrobin

INSECTICIDES

- Cyhalothrin
- Chlorpiriphos
- Tebufenozide

LOQ 0,01 mg/kg

EXTRACTION PROCEDURES

Modified version of QLECHERS

VINE-SHOOTS → SAMPLES SPIKED WITH PESTICIDES → Homogenized in a food mixer K 35 Dito Sama. → LC/MS/MS ANALYSIS

Extraction of the matrix with ACN. Addition of the corresponding salts [1].

Acidified extract with formic acid

VALIDATION STUDY

- Linearity: 5 points calibration 5, 10, 25, 50 and 100 µg/l
- Correlations coefficients ≥ 0.999
- Relative standard calibration (RSD) < 7%
- Limit of precision: LOQ and 10LOQ
- Ten replicates in repeatability and reproducibility conditions.

RESULTS

- Chromatogram of vine-shoots spiked at 0.01 mg/kg of pesticides

| Pesticide | Precursor ion | Quantifier ion | Qualifier ion | t _r (min.) |
|-----------------|---------------------------------------|----------------|---------------|-----------------------|
| Boscalid | [M+H] ⁺ 343 | 343 → 307 | 343 → 140 | 7,57 |
| Penconazole | [M+H] ⁺ 284 | 284 → 70 | 284 → 159 | 7,95 |
| Tebufenozide | [M+H] ⁺ 353,2 | 353,2 → 297,2 | 353,2 → 133,1 | 8,34 |
| Kresoxim-methyl | [M+H] ⁺ 314,1 | 314,1 → 206,1 | 314,1 → 267 | 8,53 |
| Tryfloxistrobin | [M+H] ⁺ 409 | 409 → 186 | 409 → 206 | 9,43 |
| Chlorpiriphos | [M+H] ⁺ 352,0 | 352,0 → 200,0 | 352,0 → 97,0 | 10,24 |
| Cyhalothrin | [M+NH ₄] ⁺ 467 | 467 → 225 | 467 → 141 | 11,05 |

| Compound | RT | Response | Conc |
|-----------------|--------|----------|---------|
| Boscalid | 7.580 | 2061 | 10.0457 |
| Penconazole | 7.951 | 7159 | 10.4728 |
| Tebufenozide | 8.356 | 20487 | 10.1440 |
| Kresoxim-methyl | 8.553 | 2816 | 10.4845 |
| Trifloxistrobin | 9.528 | 34580 | 10.3139 |
| Chlorpiriphos | 10.342 | 1570 | 11.0535 |
| Cyhalothrin | 11.113 | 144 | 10.8756 |

| Pesticide | Range (0,005-0,1 mg/kg) | Calibration curve | RSD (%) | r |
|-----------------|--|-------------------|---------|---|
| Boscalid | y = 0,297617x + 0,020851 | 8,59 | 0,9990 | |
| Penconazole | y = 1,155187x + 0,020041 | 5,37 | 0,9999 | |
| Tebufenozide | y = 2,874921x + 0,052448 | 3,70 | 0,9998 | |
| Kresoxim-methyl | y = 0,354249x + 0,008726 | 10,43 | 0,9998 | |
| Trifloxistrobin | y = 5,497684x + 0,065746 | 5,65 | 0,9999 | |
| Chlorpiriphos | y = 0,242439x + 0,002897 | 8,10 | 0,9997 | |
| Cyhalothrin | y = 0,021152x + 8,04 x10 ⁻² | 6,35 | 0,9998 | |

CONCLUSIONS

- In all cases, the results from the test were acceptable, according to the validation and quality control criteria established.
- Relative standard deviation: 0.9990 – 0,9999
- Recovery for repeatability and for reproducibility: 96.3 – 117.7 %.
- Relative standard deviation (RSD) ≤ 9%

IT IS CONFIRMED THAT THE METHOD PROPOSED IS SUFFICIENTLY RELIABLE FOR PESTICIDES DETERMINATION IN VINE-SHOOTS

REFERENCES

[1] Martínez, G., Morales, A., Maestro, A., Carro, S., Oliva, J., Barba, A. Determination of nine fungicides in grape and wine using QLECHERS extraction and LC/MS/MS analysis (2015) Journal of AOAC International, 98(6), pp. 1745-1751

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Ministry of Economy and Competitiveness-FEDER of the Spanish Government to the Project AGL2015-65139-C2-2-R. R. S-G to her predoctoral contract (PREDOC2017) from UCLM. To Manuel Marañez (Viticultural Service Company) for supplying the vine-shoots.



DISAPPEARANCE STUDY OF FUNGICIDE RESIDUES ON TREATED VINE-SHOOTS



Oliva, José^a; Cámara, Miguel Ángel^b; Cebrián, Cristina^b; Sánchez-Gómez, Rosario^b; Zalacain, Amaya^b; Salinas, M. Rosario^b

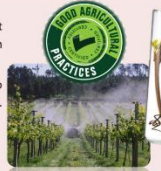
^a Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología, Facultad de Química, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo s/n, 30100, Murcia (Spain).

^b Grupo de Química Agrícola, E.T.S. de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. España s/n. 02071, Albacete (Spain). * Rosario.Salinas@uclm.es

INTRODUCTION

- Grapevines are treated with different fungicides, which are the most important pesticides used in vineyards, for this reason the elimination of such residues in grapes and wine has been extensively studied.
- Vine-shoots are in contact with these fungicides so, if these wastes are going to be used on future oenological practises, an exhaustive control is mandatory. However...

... no studies have been carried out on the persistence of these residues in post-pruning vine-shoots.



SAGROVID PROJECT

"USE OF VINE SHOOTS AS A NEW SOURCE OF OENOLOGICAL ADDITIVES AND NATURAL AGROCHEMICALS WITH BIOSTIMULANT AND PHYTOSANITARY PROPERTIES FOR THE VINEYARD"

OBJECTIVE

TO STUDY THE DISAPPEARANCE OF FOUR OF THE MOST USED FUNGICIDES IN VINEYARDS DURING SIX MONTHS OF POST-PRUNING VINE-SHOOTS

MATERIALS AND METHODS

VINE-SHOOTS SPIKED WITH FUNGICIDES

FUNGICIDES

- Boscalid
- Kresoxim-methyl
- Penconazole
- Tryfloxistrobim

Fungicides were applied under critical agricultural practices

FOTO APLICACIONES

POST-PRUNING SAMPLING

Pruning → 0 Month → 1 Month → 3 Months → 6 Months

EXTRACTION PROCEDURE

Weigh 10 g of sample in a 50 mL centrifuge tube

↓

Add 10 mL of ACN

↓

Shake vigorously for 1 min

↓

Add 4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g Na₂ citrate dihydrate, 0.5 g Na₂H citrate sesquihydrate

↓

Shake vigorously for 1 min

↓

Centrifuge 5 min at > 3000 U/min

↓

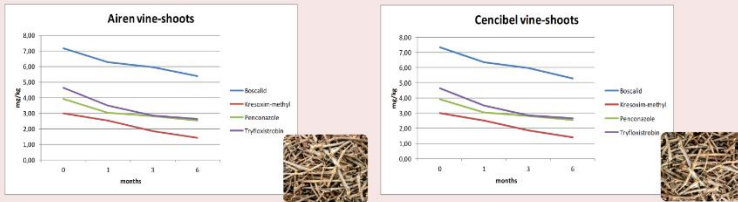
1 mL of the extract was transferred to a vial and acidified with 10 µL of ACN containing 5% formic acid.

↓

LCMS/MS

RESULTS

Evolution of fungicide residues for each vine-shoots variety.



CONCLUSIONS

- Both vine-shoots varieties showed a similar evolution of the residues.
- The maximum residual value found was 7.33 ppm for Boscalid in Cencibel variety.
- After 6 months, the contents of Kresoxim-Methyl and Tryfloxistrobim decreased 50%, Penconazole 43% and Boscalid 30%.

IT IS IMPORTANT THE APPLICATION OF FUNGICIDES UNDER GOOD AGRICULTURAL PRACTICES TO AVOID FUTURE PESTICIDES CONTAMINATION IN FUTURE APPLICATIONS WHERE THE TOXICITY CAN BE A SIGNIFICANT PROBLEM TO REJECT A PRODUCT

REFERENCES

ACKNOWLEDGEMENTS

To the Ministry of Economy and Competitiveness-FEDER of the Spanish Government to the Project AGL2015-65329-C2-3-R. R. S-G. to her predoctoral contract (PREDOCUM21) from UCLM. To Manuel Miróquez (Viticultural Service Company) for supplying the vine-shoots.



6

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



7

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



8

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



9

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



10

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



11

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



12

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



Publicación en revista nacional

ELIMINADA ESTA SECCIÓN POR
CONVENIO DE
CONFIDENCIALIDAD



