

Año: 2021

Título Tesis Doctoral: Diferentes estrategias para disminuir el empleo de SO₂ en la fase prefermentativa. Influencia en la calidad de los vinos.

Doctoranda: Lourdes Marchante Cuevas

Organismo financiador del contrato pre-doctoral: Ayudas para contratos predoctorales para la formación de personal investigador en agroalimentación en centros INIA-CCAA (FPI-INIA).

Convocatoria y nº expediente: curso académico 2020/2021, número de expediente: 225009.

Duración contrato: desde: 01-12-2017 hasta: 30-04-2022

Directores de la tesis: María Consuelo Díaz-Maroto Hidalgo y Esteban García Romero.

Universidad, fecha de lectura y calificación: Universidad de Castilla-La Mancha, 17/09/2021, Sobresaliente "Cum Laude".

RESUMEN:

Actualmente, el sector enológico busca productos naturales o tecnologías emergentes que permitan ser utilizadas como alternativas al uso de SO₂ en vinificación, debido a los efectos negativos que este tiene sobre la salud y, consecuentemente, cumplir con una legislación cada vez más exigente. Además, otra de las causas por las que se persigue sustituir o disminuir la concentración de SO₂ utilizada en vinificación es para satisfacer la demanda de los consumidores, que en los últimos años se dirige hacia el consumo de alimentos y bebidas libres de conservantes, y cuya producción sea respetuosa con el medio ambiente.

Por otro lado, existe una tendencia creciente hacia la revalorización de los subproductos de la industria vitivinícola, ya que son una fuente importante de compuestos bioactivos que los hace ser materias primas de alto valor añadido, con diferentes usos en la industria alimentaria, farmacéutica o agrícola. En particular, los residuos de *Vitis vinifera* L. y *Quercus alba* se han presentado como una alternativa prometedora al uso de conservantes por su actividad antimicrobiana y antioxidante. Del mismo modo, otros productos naturales como el quitosano y la levadura seca inactiva han mostrado tener actividad antimicrobiana y/o antioxidante en diferentes matrices de alimentos.

Debido a la importancia que tiene la composición volátil y fenólica sobre la calidad del vino, uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral fue evaluar la influencia de la adición prefermentativa de diferentes alternativas naturales al SO₂ sobre los compuestos volátiles y fenólicos de los vinos. Además de su efecto en otros parámetros fisicoquímicos que influyen en la calidad del mismo, como son los parámetros del color, ácidos orgánicos y productos secundarios de fermentación. Para ello,

se realizaron diferentes vinificaciones, a las cuales se les añadió, antes de realizar la fermentación alcohólica, las sustancias antioxidantes y/o antimicrobianas (extractos acuosos liofilizados de subproductos de vid o de residuos de tonelería, quitosano, levadura seca inactiva, plata coloidal o SO_2).

El diseño experimental de las vinificaciones realizadas en esta Tesis Doctoral se realizó en base a la previa caracterización de los extractos, objeto de Tesis Doctorales anteriores o paralelas a este trabajo, además de los hallazgos publicados anteriormente en bibliografía sobre la actividad antimicrobiana y/o antioxidante de los productos comerciales: plata coloidal (colloidal silver complex, CSC), quitosano y levadura seca inactiva.

Con estas premisas, se realizaron diferentes vinificaciones con la adición prefermentativa de los productos naturales a evaluar como alternativas al SO_2 :

- (I) Vinificaciones de uva Airén, con adición prefermentativa de: SO_2 , extracto de semilla de uva y extracto de raspón. Las vinificaciones realizadas con extractos se llevaron a cabo con el extracto solo, así como en combinación con CSC.
- (II) Vinificaciones de uva Cabernet Sauvignon, con adición prefermentativa de: SO_2 , extracto de semilla de uva y extracto de madera de roble. Las vinificaciones realizadas con extractos se llevaron a cabo con el extracto solo, así como en combinación con CSC.
- (III) Vinificaciones de uva Cabernet Sauvignon, con la adición prefermentativa de: SO_2 , quitosano, levadura seca inactiva, extracto de raspón y extracto de sarmiento.

Según el objetivo perseguido en cada tipo de vinificación realizada, se utilizaron diferentes técnicas analíticas para aportar evidencia científica que ayude a esclarecer el efecto de las diferentes alternativas al SO_2 sobre la calidad del vino. Se analizaron los compuestos volátiles por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) y los principales compuestos fenólicos del vino, antocianos, flavonoles, flavan-3-oles, ácidos hidroxicinámicos y estilbenos por cromatografía líquida de alta eficacia con doble detección por espectrofotometría de diodos y espectrometría de masas con ionización electrospray (HPLC-DAD-ESI-MSn). Las características organolépticas de los diferentes vinos fueron descritas mediante el análisis sensorial.

Por otro lado, para evaluar el efecto de las alternativas al SO_2 sobre la actividad antioxidante de los vinos se llevaron a cabo diferentes ensayos “in vitro”, concretamente los métodos ABTS, DPPH y ORAC. Además, en las últimas vinificaciones realizadas, se evaluó la actividad antioxidante del vino mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR). Esta es una técnica analítica con gran aplicabilidad en el estudio de la oxidación química del vino, ya que permite la detección directa de radicales libres. Sin embargo, a día de hoy, son pocos los estudios publicados acerca de los radicales formados durante la oxidación del vino en matrices de vino real y el efecto que ejercen los diferentes antioxidantes utilizados en vinificación en la propagación de los radicales. Por ello, otro de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral fue evaluar la capacidad de diferentes sustancias naturales para inhibir uno de los radicales mayoritarios formados durante la oxidación del vino, concretamente el radical 1-hidroxietilo.

Adicionalmente, en los vinos en los que se observaron diferencias en los productos secundarios de fermentación, se analizó el contenido de aminoácidos y aminas biógenas por HPLC-DAD, así como el

análisis de carbamato de etilo por GC-MS, dada la importancia que dichos compuestos poseen en la estabilidad microbiana y salubridad del vino.

Los resultados obtenidos en la realización de la presente esta Tesis Doctoral se encuentran publicados en 5 artículos científicos de revistas internacionales de alto impacto, dando respuesta al efecto que ejercen las diferentes alternativas al SO₂ estudiadas, en la etapa prefermentativa, sobre la calidad del vino. Esta Tesis Doctoral forma parte del proyecto RTA2014-00055-C03-01, financiado por el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER). Además, se ha realizado con la ayuda para la formación de personal investigador en agroalimentación en centros de investigación agraria y alimentaria INIA-CCAA (FPI-INIA: CPD-2016-019) cofinanciada con el Fondo Social Europeo (FSE).

INFORMACIÓN CIENTÍFICA Y TÉCNICA PROPORCIONADA POR LA TESIS.

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

ARTÍCULO 1: Marchante, L., Loarce, L., Izquierdo-Cañas, P. M., Alañón, M. E., García-Romero, E., Pérez-Coello, M. S., & Díaz-Maroto, M. C. (2019). Natural extracts from grape seed and stem by-products in combination with colloidal silver as alternative preservatives to SO₂ for white wines: Effects on chemical composition and sensorial properties. *Food research international*, 125, 108594. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108594>

Categoría de la revista en el JCR: Food Science Q1, factor de impacto: 6.475 y posición relativa: 22/310 (93%).

ARTÍCULO 2: Marchante, L., Izquierdo-Cañas, P. M., Gómez-Alonso, S., Alañón, M. E., García-Romero, E., Pérez-Coello, M. S., & Díaz-Maroto, M. C. (2019). Oenological potential of extracts from winery and cooperage by-products in combination with colloidal silver as natural substitutes to sulphur dioxide. *Food chemistry*, 276, 485–493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.072>

Categoría de la revista en el JCR: Food Science Q1, factor de impacto: 7.514 y posición relativa: 8/310 (97%).

ARTÍCULO 3: Marchante, L., Márquez, K., Contreras, D., Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., & Díaz-Maroto, M. C. (2020). Impact of oenological antioxidant substances on the formation of 1-hydroxyethyl radical and phenolic composition in SO₂ free red wines. *Journal of the science of food and agriculture*, 100(8), 3401–3407. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10374>

Categoría de la revista en el JCR: Agronomy and Crop Science Q1, factor de impacto: 3.638 y posición relativa: 41/347 (88%).

ARTÍCULO 4: Marchante, L., Marquez, K., Contreras, D., Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., & Díaz-Maroto, M. C. (2020). Potential of different natural antioxidant substances to inhibit the 1-hydroxyethyl radical in SO₂-Free wines. *Journal of agricultural and food chemistry*, 68(6), 1707–1713. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b07024>

Categoría de la revista en el JCR: Agricultural and Biological Sciences Q1, factor de impacto: 5.279 y posición relativa: 13/209 (94%).

ARTÍCULO 5: Marchante, L., Mena, A., Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Pérez-Coello, M. S., & Díaz-Maroto, M. C. (2021). Effects of the pre-fermentative addition of chitosan on the nitrogenous fraction and the secondary fermentation products of SO₂-free red wines. *Journal of the science of food and agriculture*, 101(3), 1143–1149. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10725>

Categoría de la revista en el JCR: Agronomy and Crop Science Q1, factor de impacto: 3.638 y posición relativa: 41/347 (88%).

Asistencia a congresos nacionales e internacionales de reconocido prestigio:

- Comunicación oral: Influence of alternative products to SO₂ on the production of 1-hydroxyethyl radical in red wines. 42nd World Congress of Vine and Wine – OIV. OIV. 16/07/19. Autor Comunicación oral: Lourdes Marchante Cuevas.
- Póster: Use of winery by-product extracts and colloidal silver as preservatives in white winemaking. Congreso MACROWINE 2018. UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA. Zaragoza. 28/05/18 - 31/05/18. Autores Póster: L. Loarce, L. Marchante, M.E. Alañón, P.M. Izquierdo Cañas, E.García Romero, M.C Díaz Maroto; M.S Pérez Coello.
- Póster: Effect of cooperage by-product extracts on the quality of red wines. MACROWINE 2018. UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA. 29/05/18. Autores Póster: M.C. Díaz Maroto; L. Marchante; P.M. Izquierdo Cañas; E. García Romero; S. Gómez Alonso; L. Loarce; M.S. Pérez Coello; M.C. Díaz Maroto.
- Póster: Efecto del quitosano en la fracción nitrogenada de vinos tintos. GIENOL 2018. XIV CONGRESO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN ENOLÓGICA. UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA, RED GIENOL Y FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS QUÍMICAS. Autores Póster: Lourdes Marchante, Adela Mena, Pedro Miguel Izquierdo-Cañas, Esteban García-Romero, María Soledad Pérez-Coello, María Consuelo Díaz-Maroto.
- Póster: Grape Seed Extracts as an alternative to use of SO₂ in red winemaking. 40th World Congress of Vine and Wine, OIV. 29/05/17. Autores Póster: Lourdes Marchante Cuevas, Esteban García Romero, Sergio Gómez Alonso, Mónica Fernández González, María Consuelo Díaz Maroto, María Soledad Pérez Coello, Pedro Miguel Izquierdo Cañas.
- Póster: Optimization of ultrasound assisted extraction for obtaining polyphenolrich extracts from vinification by-products. 10th In Vino Analytica Scientia Symposium. IN VINO ANALYTICA SCIENTIA. 20/07/17. Autores Póster: M^a Soledad Pérez-Coello, Lourdes Marchante, Sergio Gómez-Alonso, Marina Alarcón, M. Elena Alañón-Pardo, M. Consuelo, Diaz-Maroto.

- Póster: Subproductos de vid en el control de la fermentación del vino. IX CONGRESO CyTA-CESIA. CyTA-CESIA. 16-18/05/17. Autores Póster: P. M. Izquierdo, L. Marchante, M. Fernández, L. Loarce, M.C. Díaz, E. García, M.S. Pérez.

Asistencia a jornadas y simposios:

- Comunicación Oral: "Resistance to oxidation of SO₂ free red wines elaborated with natural antioxidants", XIV Young Science Symposium, Faculty of Chemical Sciences and Technologies University of Castilla La Mancha. 09/07/20.

- Comunicación oral Valorization of by-products derived from the vine by ultrasonic extraction. X SIMPOSIO CIENCIA JOVEN. Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas, Universidad de Castilla-La Mancha. 08/06/16.

- Participación VII Jornadas Doctorales de la UCLM. Póster: "Obtención de extractos naturales ricos en polifenoles a partir de subproductos de vid mediante tecnologías limpias". Toledo. 18/10/2016.

- Participación VII Jornadas Doctorales de la UCLM. Póster: "Potencial enológico de extractos acuosos de pepitas de uva sobre el color y la composición fenólica de un vino tinto joven". Albacete. 07/11/2017.

- Participación VIII Jornadas doctorales de la UCLM. Póster: "Efecto de levadura seca inactiva en el aroma del vino Cabernet Sauvignon en ausencia de SO₂". Cuenca. 16/10/2018.

- Participación XIII SIMPOSIO DE CIENCIA JOVEN 2019 UCLM. Póster: "Potential of different oenological products to inhibit 1-hydroxyethyl radical in wine". Facultad de Ciencias y Tecnologías químicas. Ciudad Real. 05-07/06/2019.

- Participación IX Jornadas doctorales de la UCLM. Póster (Con mención al mejor premio en Ciencias de las IX Jornadas doctorales de la UCLM): "Efecto de la adición prefermentativa de extractos de raspón y sarmiento en la fracción nitrogenada de vinos tintos". Ciudad Real. 12/11/2019.