

# Estilbenos como una alternativa sostenible al anhídrido sulfuroso en vinos

## Stilbenes as a sustainable alternative to sulfur dioxide in wines

Rocío Gutiérrez-Escobar<sup>1</sup>, Belén Puertas<sup>1</sup>, María Jesús Jiménez Hierro<sup>1</sup>, María José Aliaño-González<sup>1</sup>, Concepción Medrano-Padial<sup>2</sup>, Silvia Pichardo<sup>2</sup>, Tristan Richard<sup>3</sup> y Emma Cantos-Villar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IFAPA Centro Rancho de la Merced. Ctra. Cañada de la Loba PK 3,1, 11471 Jerez de la Frontera (Cádiz), España

<sup>2</sup>Área de toxicología, Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla. C/ Profesor García González nº2, 41012, Sevilla, España

<sup>3</sup>Univ. Bordeaux, Bordeaux Sciences Agro, Bordeaux INP, INRAE, OENO, UMR 1366, ISVV, 33140 Villenave d'Ornon, France

**Resumen.** El anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>) es el conservante más empleado en la industria agroalimentaria y enológica por sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Sin embargo, también es un alérgeno que puede provocar problemas de salud en personas sensibles a él. Por otra parte, la madera de poda procedente de los viñedos es uno de los principales subproductos de la industria vitivinícola, con un volumen estimado entre 2 y 4 toneladas por hectárea y año. Este subproducto vitícola contiene polifenoles, entre otros estilbenos bioactivos con propiedades saludables. En el presente trabajo se ha elaborado y caracterizado un extracto puro de estilbenos obtenido a partir de madera de poda de la vid, para utilizarlo como alternativa sostenible al SO<sub>2</sub> en la elaboración de vinos blancos y rosados. Se evaluó el impacto del extracto sobre la calidad de los vinos (parámetros enológicos, color, compuestos fenólicos y perfil sensorial) tanto en el embotellado y a los doce meses del embotellado. En paralelo se evaluó la posible toxicidad del extracto. Los resultados obtenidos concluyen que el extracto puro de estilbenos, obtenido a partir de madera de poda de la vid, puede proponerse como alternativa natural y sostenible al empleo de SO<sub>2</sub> en la vinificación de vinos blancos y rosados. Además, el extracto no mostró toxicidad ni in vitro ni in vivo.

**Abstract.** Sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>) is the most widely used preservative in the food and wine industry due to its antioxidant and antimicrobial properties. However, it is also an allergen that can cause health problems in sensitive people to it. On the other hand, pruning wood from vineyards is one of the main by-products of the wine industry, with an estimated volume of between 2 and 4 tons per hectare per year. This viticultural by-product contains polyphenols, mainly bioactive stilbenes with healthy properties. In the current work, a pure extract of stilbenes obtained from vine pruning wood was elaborated and characterized, to be used as a sustainable alternative to SO<sub>2</sub> in the production of both white and rosé wines. The impact of the extract on the quality of the wines (oenological parameters, color, phenolic compounds and sensory profile) was evaluated both at bottling and after twelve months bottle. The results conclude that the extract rich in stilbenes obtained from vine pruning wood can be proposed as a natural and sustainable alternative to the use of SO<sub>2</sub> for white and rosé wines, since the produced wines accomplish with the quality and food safety criteria. Moreover, the extract did not show toxicity in vitro or in vivo.

## 1 introducción

El anhídrido sulfuroso (SO<sub>2</sub>) es el conservante más utilizado en la industria agroalimentaria y vitivinícola por las numerosas propiedades que presenta. Tiene efecto antioxidante [1], antioxidásico [2], antiséptico frente a levaduras y bacterias que deterioran la calidad del vino [3], extractante, aumentando la concentración de compuesto en la maceración de los vinos rosados y tintos, y floculante o clarificante [4].

Sin embargo, el SO<sub>2</sub> presenta serios inconvenientes que son limitantes a la hora de su uso: i) su actividad y

eficiencia depende del pH del vino [5], ii) dosis altas de SO<sub>2</sub> libre pueden neutralizar los aromas varietales deseados y producir la formación de compuestos con olores defectuosos a “reducción” como el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) [2, 6] y iii) es un alérgeno que puede producir reacciones alérgicas tales como dermatitis, urticaria, angioedema, diarrea, dolor abdominal, broncoconstricción y anafilaxia, en personas sensibles a él. Además, su efecto es acumulativo en el organismo [7, 8].

En 2016, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) realizó un estudio acerca de la

exposición del consumidor al dióxido de azufre-sulfitos (E220-228), por su uso como aditivo agroalimentario, en 6 grupos de población (bebés, niños pequeños, niños, adolescentes, adultos y personas de más de 65 años). Tras este estudio la EFSA estableció una Ingesta Diaria Admisibles (IDA) de 0,7 mg/de SO<sub>2</sub>/kg de peso corporal y día en todos los grupos de población [9]. Actualmente estamos a la espera de nuevos datos que concluyan sobre la seguridad del consumo de sulfitos según una noticia publicada en la página web de la EFSA el pasado 24 de noviembre de 2022.

Debido a los problemas de salud que ocasiona el consumo de productos que contienen SO<sub>2</sub>, su empleo en la industria agroalimentaria y enológica está regulado y la tendencia actual es disminuir su concentración. Según el Reglamento de la Comisión Europea (CE) N° 606/2009 de la Comisión del 10 de julio, los límites del contenido total de SO<sub>2</sub> en los vinos, no podrán exceder de 150 mg/L para los vinos tintos y 200 mg/L para los vinos blancos y rosados. Al mismo tiempo, la dosis máxima recomendada por la OIV es de 150 a 400 mg/L de SO<sub>2</sub> total dependiendo del tipo de vino y de su contenido de azúcares residuales [10]. En el caso de los vinos ecológicos, el contenido máximo de SO<sub>2</sub> se reduce a 100 mg/L para los vinos tintos y 150 mg/L para los vinos blancos y rosados (Diario Oficial de la Unión Europea, Reglamento 203/2012 de 8 de marzo).

Por otra parte, la normativa europea (Reglamento n° 1991/2004) obliga desde el 19 de noviembre de 2004 a los productores, a incluir en el etiquetado de los vinos “contiene sulfitos”, “contiene anhídrido sulfuroso” o “contiene dióxido de azufre”, cuando el nivel de SO<sub>2</sub> total exceda de los 10 mg/L.

Debido principalmente a los problemas que ocasiona el SO<sub>2</sub> sobre la salud, en la última década y en la actualidad, las investigaciones se han centrado en la búsqueda exhaustiva de otros conservantes y tecnologías innovadoras, inocuas para la salud, que puedan reemplazar o sustituir, al menos en parte, los niveles de SO<sub>2</sub> en el vino, garantizando su estabilidad microbiana y protegiéndolo de la oxidación sin mermar la calidad del vino. Se han estudiado alternativas físicas, químicas y bioquímicas, la mayoría con efecto antimicrobiano en los vinos pero con ningún o escaso efecto antioxidante como: el campo eléctrico pulsado (PEF) [11], la técnica de ultrasonidos [12], la alta presión hidrostática (APH) [13] y la luz ultravioleta [14], los complejos de plata [15], el dicarbonato de dimetilo (DMDC) [16], el quitosano [17], las bacteriocinas [18], las levaduras no-*Sacharomyces* [19] y la lisozima [20].

El glutatión también ha sido propuesto como alternativa al SO<sub>2</sub> por sus propiedades antioxidantes. En 2015, la OIV aprobó el empleo de glutatión (GSH) con una concentración máxima de 20 mg/L (Resolución OIV-OENO 445-2015 [21]).

Los compuestos fenólicos de origen vegetal han atraído de forma considerable la atención como posibles alternativas al SO<sub>2</sub>, debido a sus propiedades antioxidantes y antimicrobianas, además de sus efectos protectores sobre la salud. En las últimas dos décadas, se han estudiado las propiedades antioxidantes y antimicrobianas de extractos fenólicos de diferentes

orígenes vegetales: de piel de almendra y hoja eucalipto [22] de rábano negro [23], de taninos enológicos [24], de hidoxitiroso [25] y de raspones de uvas [26]. Sin embargo, la mayoría de estos extractos afectaron al análisis sensorial de los vinos.

Los estilbenos son compuestos polifenólicos que se encuentran de forma natural y en diferentes concentraciones en las uvas, mostos y vinos (0-5 mg/L) [27]. A estos compuestos, principalmente al *E-Resveratrol* se le atribuyen propiedades cardioprotectoras, anticancerígenas, antienvjecimiento, neuroprotectoras y antiobesidad [27, 28]. Estos compuestos bioactivos se encuentran en todas las partes de la vid, y en mayor concentración en la madera de poda.

Anualmente, en el viñedo se generan entre 2 y 4 toneladas por hectárea de madera procedente de la poda de la vid, dependiendo de la variedad, densidad de plantación, vigor de las plantas y las condiciones climáticas [29]. Este subproducto, rico en compuestos bioactivos, y actualmente sin valor económico, se elimina de los viñedos i) mediante la quema en el propio viñedo, o ii) realizando enmiendas orgánicas en el propio viñedo, aunque con los problemas actuales de hongos de madera hacen poco recomendable esta práctica [29].

Estudios previos con un extracto comercial elaborado a partir de madera de poda (*Vineatrol*®, Actichem, Francia) que contenía un 29% de riqueza en estilbenos, protegía a los vinos de oxidaciones y posibles contaminaciones microbianas con la misma eficiencia que lo hacía el SO<sub>2</sub>. Sin embargo, y especialmente en el caso de los vinos blancos, la adición del extracto modificó las propiedades organolépticas, así como el perfil olfatómico de los vinos [30, 31]. Dichos trabajos concluyen que era necesario aumentar la riqueza en estilbenos del extracto con el fin de aumentar las propiedades conservantes de este, y así i) poder disminuir la dosis de extracto necesaria a añadir en el vino, ii) disminuir y/o eliminar los efectos negativos del extracto sobre la calidad del vino.

El **objetivo** de este trabajo fue elaborar y caracterizar un extracto rico en estilbenos a partir de madera de poda de la vid, para utilizarlo como una alternativa sostenible al SO<sub>2</sub> en la elaboración de vinos blancos y rosados.

## 2 Materiales y métodos

### 2.1 Obtención y caracterización de extractos ricos en estilbenos

El extracto de estilbenos se elaboró a partir de madera de poda de la vid, en colaboración con el Laboratorio MIB de la Unidad de Investigación en Enología (UMR OENO 1336, Univ. Bordeaux), que pertenece al Institut des Sciences de la Vigne et du Vin (ISVV) de la Universidad de Burdeos, siguiendo el protocolo de [32] con algunas modificaciones. La identificación y cuantificación de compuestos de cada fracción obtenida (F1-F6) mediante CPC se realizó por UHPLC-ESI-MS/MS, mientras que la identificación y cuantificación de los estilbenos de las fracciones obtenidas se realizó mediante HPLC-DAD según la metodología descrita por Guerrero et al., 2010.

## 2.2 Caracterización del extracto ST99

La caracterización química del extracto ST99 se realizó mediante HPLC-DAD siguiendo el protocolo descrito por [34]. La composición volátil del extracto se realizó siguiendo el protocolo descrito [35].

El efecto antimicrobiano del extracto se realizó siguiendo el protocolo descrito [36]. Para inhibir el crecimiento de las levaduras se emplearon dosis de extracto de 30 a 500 mg/L, mientras que para las bacterias las dosis utilizadas fueron de 30 a 900 mg/L. La inhibición del crecimiento microbiano se evaluó mediante el parámetro IC<sub>50</sub>, el cual nos indica la concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento microbiano.

## 2.3 Toxicidad del extracto ST99

La toxicidad del extracto ST99 se evaluó siguiendo las recomendaciones de la EFSA [37] y las guías de la OCDE, según el protocolo descrito por los autores [39, 40].

## 2.4 Elaboración de vinos blancos

Los vinos blancos se elaboraron con la variedad Verdejo según el procedimiento descrito por los autores [41].

A los mostos se les aplicaron los siguientes tratamientos por triplicado: CT: sin conservantes, SO<sub>2</sub>: se añadió 80 mg/L de SO<sub>2</sub>, GSH: se añadió 20 mg/L de GSH, ST99: se añadió 40 mg/L de extracto ST99, ST99-GSH: se añadió 40 mg/L de ST99 y 20 mg/L de GSH.

Los parámetros enológicos (Abs 470 nm, ácidos orgánicos y acetaldehído) se determinaron en el embotellado y a los doce meses del embotellado según los métodos oficiales [41].

El análisis sensorial de los vinos se realizó en copas negras en el embotellado y a los doce meses con un panel de catadores formado por 12 jueces (7 mujeres y 5 hombres) con edades comprendidas entre los 35 y 65 años según la metodología descrita por los autores [40].

## 2.5 Elaboración de vinos rosados

Los vinos rosados se elaboraron con la variedad Syrah según el procedimiento descrito por los autores [42].

A los mostos se les aplicaron los siguientes tratamientos por triplicado: CT: sin conservante, SO<sub>2</sub>: se añadió 80 mg/L de SO<sub>2</sub>, GSH: se añadió 20 mg/L de GSH, ST99: Se añadió 60 mg/L de extracto ST99, ST99-GSH: se añadió 60 mg/L de ST99 y 20 mg/L de GSH.

Los parámetros enológicos se determinaron en el embotellado y a los doce meses del embotellado según los métodos oficiales [41].

La identificación y cuantificación de los polifenoles en el vino rosado se realizó mediante HPLC-DAD en el embotellado y a los doce meses del embotellado siguiendo el protocolo descrito por Guerrero et al. (2009) con algunas modificaciones.

La identificación y cuantificación en el embotellado y a los doce meses del embotellado del glutatión (GSH), el producto de reacción de la uva (GRP) y los ácidos hidroxicinámicos se realizó mediante UPLC-MS según el método descrito [44].

A los doce meses del embotellado se realizó un análisis metabolómico de los vinos rosados mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) con un espectrómetro Avance III (Bruker, Francia) siguiendo la metodología descrita por los autores [45, 46].

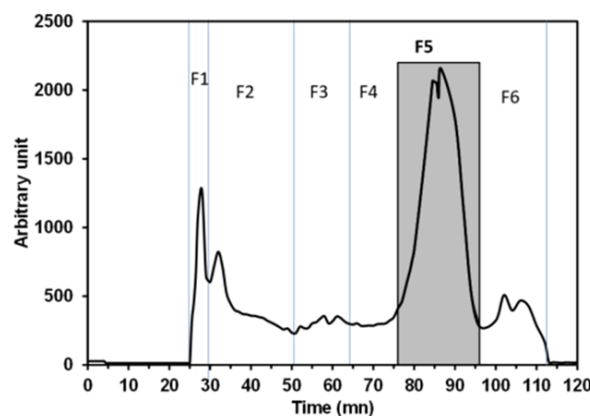
## 2.6 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software Statistix versión 9.0 (Analytical Software, Tallahassee, FL, EUA). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y utilizó la prueba de Tukey para comparar todas las muestras analizadas cuando se observaron diferencias significativas por ANOVA ( $p \leq 0,05$ ). Los datos de la análisis metabolómico fueron procesados siguiendo el protocolo descrito por los autores [45, 46].

## 3 Resultados y Discusión

### 3.1 Obtención y caracterización de extractos ricos en estilbenos

A partir de los sarmientos de vid, y tras su extracción y fraccionamiento, se obtuvieron un total de 6 fracciones denominadas F1, F2, F3, F4, F5 y F6 (Fig. 1).



**Figura 1.** Identificación de las fracciones obtenidas por CPC.

Los estilbenos mayoritarios identificados en cada fracción y el porcentaje total de estilbenos de cada fracción se muestran en la tabla 1.

La fracción F1 se desechó por haber detectado estilbenos a muy baja concentración (trazas).

Se decidió seleccionar la Fracción F5, renombrada como ST99 para emplearla como alternativa al SO<sub>2</sub> en la elaboración de vinos blancos y rosados, por presentar una mayor riqueza en estilbenos (99%) y por ser el extracto con *E-resveratrol*, estilbeno ampliamente estudiado al que se le atribuye alta capacidad antioxidante y antimicrobiana [47]. Además, se ha descrito que la

*E-ε*-viniferina, dímero del resveratrol, presenta una capacidad antioxidante mayor que la del resveratrol [32].

**Tabla 1.** Identificación de los estilbenos mayoritarios en cada fracción por UHPLC-ESI-MS/MS.

Fracción	Estilbenos mayoritarios	% Total estilbenos
F1	-	trazas
F2	Ampelopsina A	29
	Palidol	
F3	Miyabenol C	36
	Piceatanol	
	r2-Viniferina	
F4	Miyabenol C	55
	Piceatanol	
	r2-Viniferina	
F5	<b><i>E-ε</i>-Viniferina</b>	<b>99</b>
	<b><i>E</i>-Resveratrol</b>	
F6	δ-Viniferina	6
	<i>E-ε</i> -Viniferina	

El rendimiento del proceso de extracción de los estilbenos a partir de la madera de poda de la vid fue del 5,5%.

### 3.2 Caracterización del extracto ST99

#### 3.2.1 Composición química de ST99

El extracto ST99 presentó como estilbenos mayoritarios *E-ε*-viniferina (70%) y *E*-resveratrol (18%) y en menor concentración presentó ω-viniferina, r-viniferina, miyabenol C, Z-ε-viniferina y Z-resveratrol. La riqueza final del extracto fue del 99%.

#### 3.2.1 Composición volátil de ST99

No se observaron compuestos volátiles en el extracto ST99 tras el análisis del extracto mediante GC-MS Solo se detectaron trazas de formaldehído, ácido acético y etanol, disolventes empleados en el análisis. Por tanto, el perfil aromático del extracto ST99 no afectará a la composición de los compuestos volátiles de los vinos.

#### 3.2.1 Efecto antimicrobiano del extracto ST99 frente a levaduras y bacterias

Las propiedades antimicrobianas del extracto ST99 son clave para evaluar su eficiencia como alternativa al SO<sub>2</sub> en el vino [8]. Se evaluó el efecto inhibitorio del extracto ST99 frente a levaduras y bacterias que frecuentemente participan en la vinificación y deterioro del vino. La inhibición del crecimiento microbiano se evaluó mediante el parámetro IC<sub>50</sub> (Tabla 2).

En cuanto a las levaduras, el extracto ST99 no tuvo efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 2), y por tanto no retrasaría el inicio de la fermentación alcohólica (FA), como es deseable.

Además, el extracto presentó frente a *Brettanomyces bruxellensis*, un porcentaje de inhibición de crecimiento mayor al 50% a la dosis más baja probada (30 mg/L). Para el resto de las levaduras, fueron necesarias dosis más elevadas de extracto para inhibir su crecimiento.

**Tabla 2.** Datos de la IC<sub>50</sub> (mg/L) en vino del extracto ST99 frente a levaduras y bacterias de interés enológico.

Levaduras	dosis: 30 a 500 mg/L	IC <sub>50</sub> (mg/L)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 1		n.e.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 2		n.e.
<b><i>Brettanomyces bruxellensis</i></b>		**
<i>Hanseniaspora uvarum</i>		135,89
<i>Zygosaccharomyces bailli</i>		105
<i>Candida zemplinina</i>		254,46
Bacterias	dosis: 30 a 900 mg/L	IC <sub>50</sub> (mg/L)
<i>Lactobacillus hilgardii</i>		265,3
<i>Pediococcus pentasaceus</i>		665,7
<i>Oenococcus oeni</i>		624,7
<i>Acetobacter aceti</i>		n.e.

n.e., no tiene efecto, cuando la inhibición del crecimiento microbiano fue < 25 % a la máxima concentración probada (500 mg/L en las levaduras y 900 mg/L en las bacterias). \*\*, Cuando la inhibición del crecimiento microbiano fue > 50% con la mínima concentración probada (30 mg/L).

En cuanto al efecto inhibitorio del ST99 sobre bacterias, en general, se necesitaron concentraciones más altas de ST99 para inhibir el crecimiento de las bacterias que para las levaduras (Tabla 2). Cabe destacar que ST99 no tuvo efecto inhibitorio frente *Acetobacter aceti*, al menos hasta la concentración máxima ensayada (900 mg/L) (Tabla 2). Se han descrito diferencias en la resistencia al SO<sub>2</sub> según las cepas de *Acetobacter* [48], por tanto, en la actualidad inhibir el crecimiento de *A. aceti* en los vinos sigue siendo un reto.

### 3.3 Toxicidad del extracto

El estudio de la toxicidad del ST99 es fundamental para garantizar la seguridad de los consumidores. Por ello, se realizaron los estudios genotóxicos recomendados por la EFSA [37]: el test de Ames OCDE 471, [49] y el ensayo de micronúcleos (MN) OCDE 487, [50]. Los resultados obtenidos fueron contradictorios ya que en el test de Ames, el ST99 no mostró indicios de mutagenicidad, mientras que en el ensayo de MN sí se observaron efectos genotóxicos a la concentración más alta ensayada (60 µg/mL) en presencia de enzimas hepáticas [38]. Considerando esta disparidad en los resultados, se procedió al estudio de la genotoxicidad *in vivo* del ST99. Aunque se observaron leves daños histopatológicos, la combinación del ensayo de MN en médula ósea y el ensayo cometa en hígado, estómago y sangre OECD 474 y 489, [51, 52] concluyó que el extracto no produce daños genotóxicos en estos órganos. La presencia de estilbenos en los órganos diana se confirmó por UPLC-HESI-MS, demostrando así la exposición a los compuestos y confirmando por tanto la ausencia de genotoxicidad [39].



### 3.4 Elaboración de vinos blancos

#### 3.4.1 Parámetros enológicos

El color es un parámetro clave en la calidad en los vinos, especialmente en los vinos blancos. De hecho, la oxidación se detecta fácilmente por el cambio de color de verde y amarillo claro a tonos marrones y oscuros.

En el momento del embotellado, los vinos con valores más elevados de la absorbancia a 470 nm, coloración amarillo-marróncea, fueron los tratados con el extracto ST99, solo o en combinación con GSH, seguidos de los vinos GSH, los vinos CT y finalmente los vinos con SO<sub>2</sub> (Tabla 3). El extracto ST99 es de color marrón claro y eso afectó desde su adicción al color del vino.

En el momento del embotellado, ninguno de los vinos tratados había hecho la fermentación maloláctica (FML), como es deseable en los vinos blancos. Sin embargo, a los doce meses del embotellado los vinos CT y GSH habían realizado la FML de forma espontánea, mientras que los vinos tratados con ST99 (solo o en combinación con GSH) y con SO<sub>2</sub> inhibieron la FML (Tabla 3). Resultados similares han sido descritos en vinos blancos tratados con un 100% CO<sub>2</sub> y sin SO<sub>2</sub> también realizaron la FML de forma espontánea [53].

La mayor concentración de acetaldehído se encontró en los vinos tratados con SO<sub>2</sub> tanto en el embotellado como a los doce meses del embotellado (Tabla 3), debido a que el SO<sub>2</sub> se une de forma estable con este compuesto activando la síntesis de acetaldehído por la levadura para poder utilizarlo en su metabolismo [54].

**Tabla 3.** Parámetros enológicos analizados a los vinos de Verdejo.

	Embotellado					
	CT	SO <sub>2</sub>	GSH	ST99	ST99-GSH	LS
Abs 470 nm	0,052 <sup>c</sup>	0,030 <sup>d</sup>	0,058 <sup>b</sup>	0,070 <sup>a</sup>	0,068 <sup>a</sup>	***
Acidez volátil (g/L AcH)	0,41	0,44	0,42	0,42	0,37	ns
Ácido acético (g/L)	0,4	0,41	0,43	0,44	0,41	ns
Ácido cítrico (g/L)	0,21	0,21	0,2	0,22	0,21	ns
Ácido málico (g/L)	1,6	1,59	1,6	1,62	1,61	ns
Ácido láctico (g/L)	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	ns
Ácido tartárico (g/L)	2,17 <sup>c</sup>	2,47 <sup>b</sup>	2,53 <sup>b</sup>	2,70 <sup>a</sup>	2,69 <sup>a</sup>	***
Acetaldehído (mg/L)	15,05 <sup>bc</sup>	31,56 <sup>a</sup>	14,19 <sup>cd</sup>	12,85 <sup>d</sup>	15,99 <sup>b</sup>	***
	12 meses del embotellado					
	CT	SO <sub>2</sub>	GSH	ST99	ST99-GSH	LS
Abs 470 nm	0,068 <sup>c</sup>	0,040 <sup>d</sup>	0,075 <sup>b</sup>	0,077 <sup>ab</sup>	0,079 <sup>a</sup>	***
Acidez volátil (g/L AcH)	0,55	0,45	0,49	0,59	0,59	ns
Ácido acético (g/L)	0,57 <sup>ab</sup>	0,40 <sup>c</sup>	0,60 <sup>a</sup>	0,48 <sup>bc</sup>	0,49 <sup>bc</sup>	**
Ácido cítrico (g/L)	0,05 <sup>b</sup>	0,28 <sup>a</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,24 <sup>a</sup>	0,20 <sup>a</sup>	**
Ácido málico (g/L)	0,04 <sup>b</sup>	1,44 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	1,48 <sup>a</sup>	1,46 <sup>a</sup>	***
Ácido láctico (g/L)	0,98 <sup>a</sup>	0,01 <sup>b</sup>	0,94 <sup>a</sup>	0,02 <sup>b</sup>	0,02 <sup>b</sup>	***
Ácido tartárico (g/L)	2,46 <sup>b</sup>	2,24 <sup>c</sup>	2,57 <sup>ab</sup>	2,71 <sup>a</sup>	2,68 <sup>a</sup>	***
Acetaldehído (mg/L)	1,59 <sup>c</sup>	36,62 <sup>a</sup>	nd	11,70 <sup>b</sup>	13,14 <sup>b</sup>	***

CT, vino sin conservante; SO<sub>2</sub>, vino con 80 mg/L de anhídrido sulfuroso; GSH, vino con 20 mg/L de glutatión; ST99, vino con 40 mg/L de extracto ST99; ST99-GSH, vino con 40 mg/L de extracto ST99 y 20 mg/L de glutatión. Diferentes letras en superíndice (a, b o c) para el mismo parámetro denotan diferencias significativas (p < 0,05). Análisis de la varianza, nivel de significación (LS): \* (p < 0,05), \*\* (p < 0,01), \*\*\* (p < 0,001); ns: no significativo.

#### 3.4.2 Análisis sensorial

En el momento del embotellado los vinos fueron afrutados, con pocas diferencias significativas entre tratamientos. La puntuación más alta en los atributos de fruta tropical y fruta de hueso la obtuvieron los vinos con SO<sub>2</sub> y GSH, mientras que los vinos ST99 obtuvieron la puntuación más alta en frutas maduras, aunque en este caso sin diferencias significativas (Fig. 2a). Todos los vinos mostraron buenas puntuaciones en equilibrio, persistencia, complejidad y bajo amargor, sin diferencias significativas entre ellos (Fig. 2a), cumpliendo con los estándares de calidad de los vinos de Verdejo.

Después de doce meses de embotellado, los vinos tratados con ST99 y ST99-GSH evolucionaron más que los demás, especialmente en fruta madura, lo que puede estar relacionado con la oxidación [55]. En cambio, las puntuaciones de fruta tropical y de hueso disminuyeron significativamente (Fig. 2b). Además, algunos catadores describieron atributos de olor desagradable (sucio, oxidado y matices químicos) en los vinos ST99 y ST99-GSH. Cabe destacar que los vinos tratados con SO<sub>2</sub> obtuvieron las puntuaciones más altas en los atributos equilibrio y complejidad.

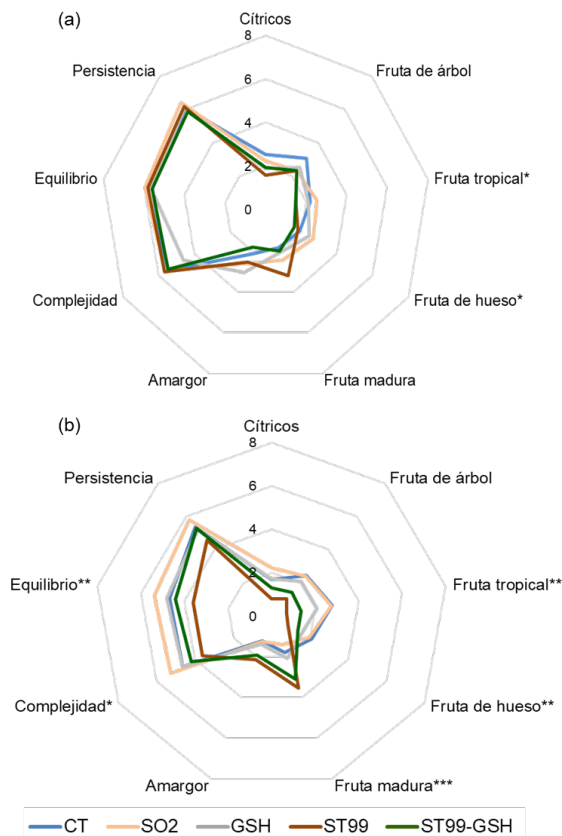
### 3.5 Elaboración de vinos rosados

#### 3.5.1 Compuestos polifenólicos y derivados de la glutatión

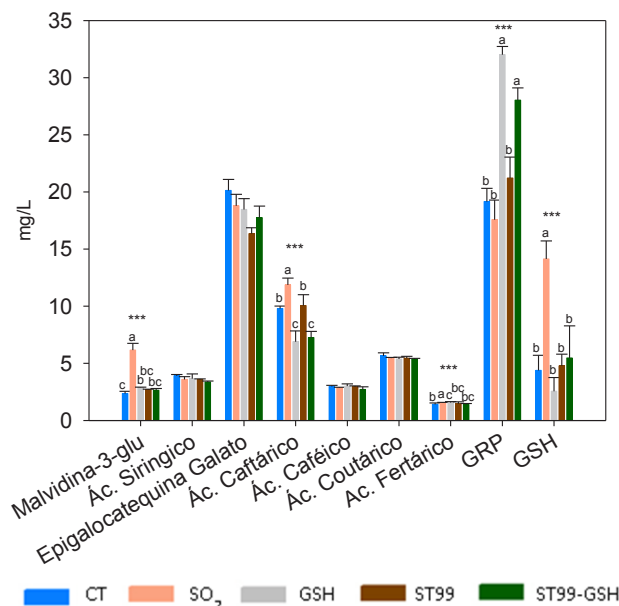
Como componentes clave relacionados con la calidad de los vinos rosados, se determinaron los polifenoles en los vinos tratados. En cuanto a las antocianinas, la malvidina 3-glucósido fue la única detectable en cantidad suficiente para ser cuantificada en los vinos rosados, con una concentración en torno a los 3 mg/L, mientras que los vinos con SO<sub>2</sub>, mostraron una concentración significativamente mayor (Fig. 3). Sin embargo, a los doce meses del embotellado, la malvidina 3-glucósido solo se detectó en los vinos con SO<sub>2</sub>, estando por debajo del nivel de detección en los demás vinos (Fig. 4).

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en los ácidos siríngico (ácido hidroxibenzoico) y epicatequina-galato (flavanol). Además, ambos compuestos presentaron concentraciones similares en el embotellado y a los doce meses (Figs. 3 y 4) según lo descrito [56].

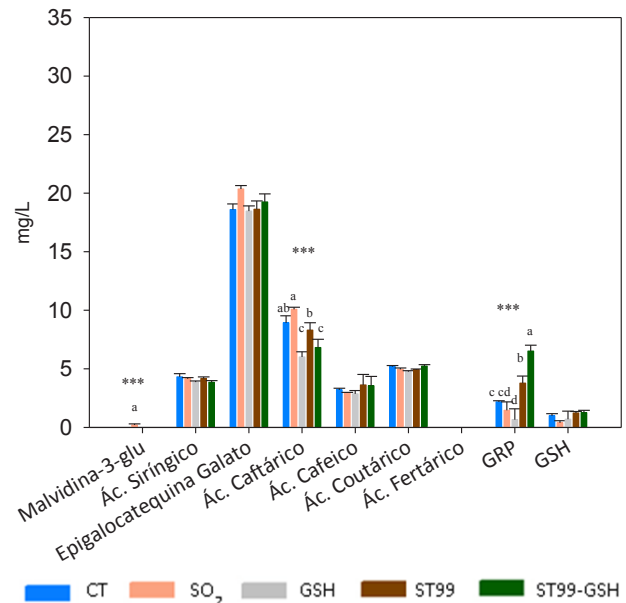
Los ácidos hidroxicinámicos mayoritarios fueron el ácido caftárico, ácido cafeico, ácido coutárico y ácido fertárico. La concentración de ácido caftárico, fue mayor en el momento del embotellado (Fig. 3) que a los doce meses en todos los tratamientos (Fig. 4). En el momento del embotellado, la concentración de ácido caftárico fue significativamente más alta en los vinos con SO<sub>2</sub> (11,86 mg/L), seguido de los vinos CT y ST99 (9,79 y 10,05 mg/L), y finalmente los vinos con GSH y ST99-GSH (6,89 y 7,25 mg/L) (Fig. 3). Estos datos concuerdan con el rango descrito para los vinos rosados [44]. Esta tendencia se mantuvo a los doce meses del embotellado (Fig. 4), disminuyendo las concentraciones en todos los vinos tratados [56, 57].



**Figura 2.** Análisis sensorial de los vinos de Verdejo en el embotellado (a) y a los doce meses del embotellado (b).



**Figura 3.** Principales compuestos polifenólicos en los vinos de Syrah en el embotellado.



**Figura 4.** Principales compuestos polifenólicos en los vinos de Syrah a los doce meses del embotellado.

No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en los ácidos cafeicos, coutárico ni en el momento del embotellado (Fig. 3) ni a los doce meses del embotellado, momento en el que las concentraciones fueron en torno a 3 y 5 mg/L respectivamente (Fig. 4) [56].

El ácido fertárico solo se detectó en el embotellado, con concentraciones en torno a 1,5 mg/L, inferiores a las descritas para otros vinos rosados [44]. Los vinos con SO<sub>2</sub> presentaron una concentración leve pero significativamente mayor de este ácido (Fig. 3). Sin embargo, a los doce del embotellado, meses la evolución de los vinos hizo que las concentraciones estuvieran por debajo del límite de detección (Fig. 4).

El GRP (producto de reacción de la uva, ácido 2-S-glutacionil-cafeoil-tartárico) resulta de la adición nucleofílica del glutatión a la quinona del ácido caftárico. El contenido más alto de GRP se encontró en los vinos con GSH, seguido de los vinos ST99-GSH (Fig. 3), de acuerdo con la concentración más baja descrita previamente en el ácido caftárico. Parece que el ácido caftárico combinado con glutatión en los vinos con GSH (GSH y ST99-GSH), formó una mayor concentración de GRP. Esto explica que los vinos con adición de GSH no tuvieran una mayor concentración de GSH, en contraste con los vinos con SO<sub>2</sub> que mostraron el mayor contenido de GSH. El SO<sub>2</sub> protege la combinación y oxidación del GSH de acuerdo con lo descrito [58]. Sin embargo, después de doce meses del embotellado las diferencias entre tratamientos desaparecieron (Fig. 3). La concentración de GSH disminuyó en todos los vinos tratados [59], pero principalmente en los vinos SO<sub>2</sub> (Figura 4), lo que probablemente esté relacionado con la desaparición del SO<sub>2</sub> libre en el vino en este punto (datos no mostrados).

### 3.5.2 Análisis de los vinos mediante Resonancia Magnética Nuclear

Tras doce meses del embotellado se realizó un análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) a los cinco tipos de vino rosado (CT, SO<sub>2</sub>, GSH, ST99 y ST99-GSH) para discriminar entre las cinco modalidades.

Para obtener una visión general del conjunto, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). La Fig. 5, muestra el resultado de la PCA realizado a las 45 muestras de vino ( $R^2X = 0,685$  y  $Q^2 = 0,398$ ). Se observó una clara diferenciación en el eje t[1] entre CT y GSH por un lado, y por otro, SO<sub>2</sub>, ST99 y ST99-GSH.

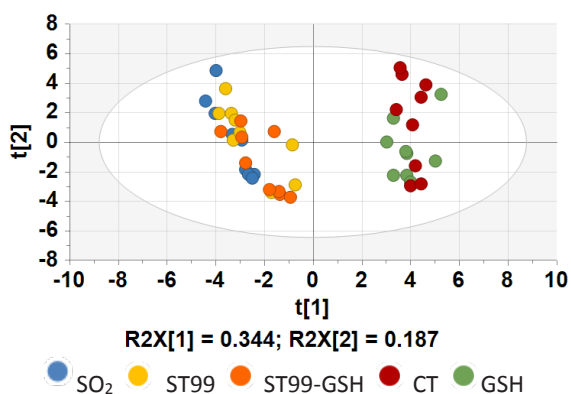


Figura 5. Análisis PCA de los vinos rosados de Syrah.

Para mejorar la separación de las muestras y comprender mejor las variables involucradas en la separación, se realizó un análisis discriminante de proyección ortogonal sobre estructuras latentes (OPLS-DA). Al realizar este análisis, los vinos se clasificaron en dos grupos según los resultados obtenidos en la PCA: vinos que habían realizado la FML (grupo FML) CT y GSH; vinos que no habían realizado la FML (grupo no FML): SO<sub>2</sub>, ST99 y ST99-GSH.

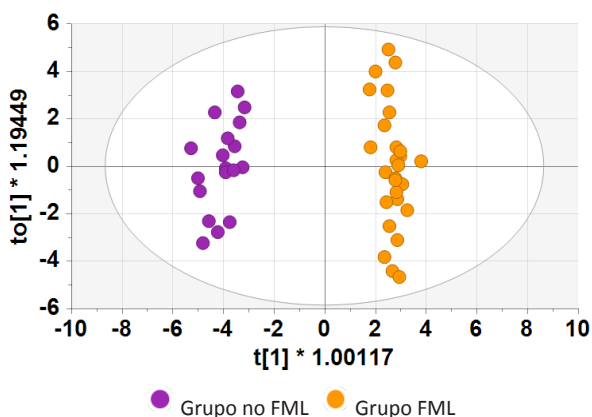


Figura 6. Análisis OPLS-DA de los vinos rosados.

El gráfico OPLS-DA (Fig. 6), junto con los procedimientos de validación y permutación según la metodología descrita [60], confirma la posibilidad de separar los vinos en dos grupos. Todas las muestras de vino están incluidas en la elipse T2 de Hotelling al 95%.

Tabla 4. Resultados y validación de los modelos PCA y OPLS-DA.

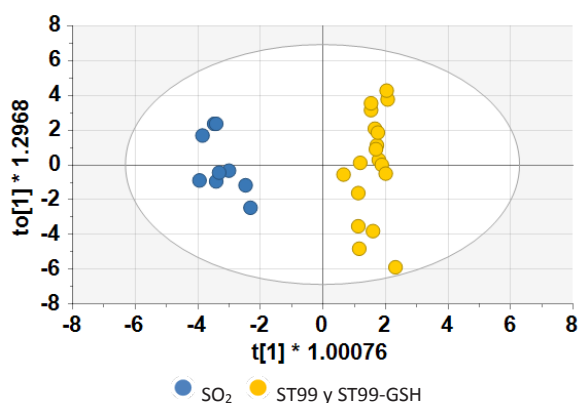
Parámetros modelos	Todos los datos	Vinos No-FML	Vinos ST
	FML vs no-FML	SO <sub>2</sub> vs ST	ST99 vs ST99-GSH
Nº de observaciones	45	27	18
Nº de variables	34	34	34
R <sup>2</sup> X(cum)	0,593	0,541	0,615
R <sup>2</sup> Y	0,986	0,962	0,973
Q <sup>2</sup> (cum)	0,973	0,904	0,717
NC <sup>a</sup>	1+2+0	1+2+0	1+3+0
Permutacion tests (R <sup>2</sup> ; Q <sup>2</sup> )	0,338; -0,537	0,533; -0,852	0,881; -0,830
CV-ANOVA	< 0,05	< 0,05	< 0,05
ROC <sup>b</sup>	1,0	1,0	1,0
Fisher's probabilidad	5,8×10 <sup>-13</sup>	2,1×10 <sup>-7</sup>	2,1×10 <sup>-5</sup>
CCR (%) <sup>c</sup>	100%	100%	100%

<sup>a</sup> NC: Número de componentes; <sup>b</sup> ROC: Área bajo la curva; <sup>c</sup> CCR: Ratio de clasificación correcta.

Los valores de R<sup>2</sup>X, R<sup>2</sup>Y y Q<sup>2</sup>, representan la bondad del ajuste, la proporción de varianza explicada por el modelo y la bondad de predicción, (0,593, 0,986 y 0,973, respectivamente) (Tabla 4). El valor *p* de la prueba CV-ANOVA, los resultados de la prueba de permutación, la tasa de clasificación y el valor de las áreas bajo la curva (AUC) se muestran en la Tabla 4. Los principales metabolitos discriminatorios se identificaron en función de los valores de VIP y *p* (> 1 y 0,5, respectivamente) obtenidos del análisis estadístico OPLS-DA y confirmados mediante por análisis de varianza clásicas [60]. Se identificaron un total de catorce compuestos que diferencian entre los vinos, incluidos seis ácidos orgánicos (acético, cítrico, fumárico, láctico, málico y succínico), dos ésteres (lactato de etilo y acetato de etilo), dos alcoholes (2,3-butanodiol e isobutanol), dos azúcares (glucosa y xilosa), acetoína y colina.

En el grupo FML de color naranja (vinos CT y GSH) (Figura 6) presentaron contenidos significativamente más altos en ácido láctico, lactato de etilo, ácido acético, acetato de etilo, succínico, acetoína, 2,3-butanodiol y isobutanol, y contenidos más bajos en ácido málico, ácido cítrico, ácido fumárico, xilosa, glucosa y colina (datos no mostrados). Estos resultados, indican que los vinos CT y GSH realizaron la FML, a los doce meses del embotellado. Como primer resultado, estos hallazgos, basados en la metabolómica de <sup>1</sup>H-RMN, sugieren que los tratamientos con SO<sub>2</sub>, ST99 y ST99-GSH impidieron la FML igual que ocurría en los vinos blancos de Verdejo. La inhibición de la FML podría deberse a la capacidad antimicrobiana descrita frente a bacterias lácticas del extracto ST99 [34] y del SO<sub>2</sub> [61].

Para completar estos primeros resultados, se realizó un análisis estadístico multivariante a ambos subgrupos (vinos FML y no FML). El análisis PCA y OPLS-DA aplicados al grupo de muestras FML (vinos CT y GSH) no permitió separar de forma significativa los dos tratamientos (datos no mostrados). En cuanto al grupo que no realizó la FML (vinos SO<sub>2</sub>, ST99 y ST99-GSH), el gráfico PCA mostró una separación entre los vinos SO<sub>2</sub> y los vinos que contenían extracto de estilbenos (ST99 y ST99-GSH) ( $R^2X = 0,661$  y  $Q^2 = 0,208$ ).



**Figura 7.** Análisis OPLS-DA del grupo de vinos que no realizó la FML.

El análisis estadístico OPLS-DA (Fig. 7) asociado a los procedimientos de validación, confirma la separación de los vinos con SO<sub>2</sub> de los vinos con ST99 (ST99 y ST99-GSH) proporcionando un modelo predictivo y estadísticamente significativo ( $R^2X = 0,541$ ,  $R^2Y = 0,962$  y  $Q^2 = 0,904$ ). El rendimiento y los parámetros de validación del modelo se presentan en la Tabla 4. Destacaron diez compuestos del vino como metabolitos discriminatorios: tres ácidos orgánicos (fumárico, acético y tartárico), tres aminoácidos (alanina, histidina y leucina), dos alcoholes (alcohol fenético y 2,3-butanodiol), galactosa y acetoina. Los vinos con SO<sub>2</sub> contienen más ácido fumárico, alanina, histidina, leucina y alcohol fenético, y menos ácido acético, ácido tartárico, 2,3-butanodiol, galactosa y acetoina. Como se observa en el análisis clásico, los vinos con SO<sub>2</sub> presentaron mayor contenido de aminoácidos a los doce meses del embotellado.

## 4 Conclusiones

A partir de la madera de poda de la vid, principal subproducto del viñedo se elaboró un extracto con una riqueza en estilbenos bioactivos del 99% (ST99). La obtención de extractos ricos en estilbenos le da un valor añadido a este subproducto, a la vez que se contribuye a la economía circular y se favorece a la sostenibilidad ambiental. ST99 se puede proponer como conservante para su utilización en la elaboración de vinos como alternativa al SO<sub>2</sub> ya que i) presenta una buena actividad antimicrobiana, especialmente frente a levaduras indeseables, ii) no afecta a la composición volátil de los vinos y iii) no es tóxico.

Los vinos blancos y rosados elaborados con ST99, cumplieron los criterios de calidad y seguridad alimentaria. Además, en ambas elaboraciones los vinos con ST99, tanto solo como combinado con GSH, inhibieron la FML a los doce meses del del embotellado igual que los vinos con SO<sub>2</sub>. Sin embargo, el color del vino blanco en los vinos con ST99 se vio afectado desde la adición del extracto teniendo tonalidades marronáceas sin llegar a ser defectuoso.

La adición de los conservantes afectó al perfil polifenólico y otros constituyentes de los vinos rosados, sin mermar la calidad.

## Referencias

- 1 C.M. Oliveira , A.C. Ferreira, V. De Freitas, et al. Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Res Int* **44**, 1115–1126 (2011)
- 2 P. Ribereau-Gayon, Y. Glories, A. Maujean, et al. *Handbook of enology: the chemistry of wine stabilization and treatments (2<sup>o</sup> Edición, Vol. 2)* (2006)
- 3 P. Ribereau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Doneche , et al. *Handbook of Enology Volume 1 The Microbiology of Wine and Vinifications 2nd Edition.* (2006)
- 4 S. Giacosa, A. Río Segade, E. Cagnasso, et al. SO<sub>2</sub> in wines: rational use and possible alternatives. In: *Red Wine Technology*, 309–321 (2018)
- 5 K. Prabhakar, E.N.Mallika. Preservatives: Permitted Preservatives - Sulfur Dioxide. *Encycl Food Microbiol Second Ed.* **3**, 108–112 (2014)
- 6 T. Garde-Cerdán, A.R. Marsellés-Fontanet, M. Arias-Gil et al. Influence of SO<sub>2</sub> on the evolution of volatile compounds through alcoholic fermentation of must stabilized by pulsed electric fields. *Eur Food Res Technol* **227**, 401–408 (2008)
- 7 H. Vally, N.L.-A. Misso, V. Madan. Clinical effects of sulphite additives. *Clin Exp Allergy* **39**, 1643–1651 (2009)
- 8 R.F Guerrero & E. Cantos-Villar. Demonstrating the efficiency of sulphur dioxide replacements in wine: a parameter review. *Trends Food Sci Technology* **42**, 27–43 (2015)
- 9 EFSA. Scientific Opinion on the re- evaluation of sulfur dioxide (E 220), sodium sulfite (E 221), sodium bisulfite (E 222), sodium metabisulfite (E 223), potassium metabisulfite (E 224), calcium sulfite (E 226), calcium bisulfite (E 227) and potassium bisulfite. *EFSA J* **14**, 4438 (2016)
- 10 OIV. *International code of oenological practices.* Paris (2021)
- 11 S. Van Wyk, F.V.M. Silva. *Nonthermal Preservation of Wine.* Elsevier Inc. Epub ahead of print. DOI: 10.1016/B978-0-12-816685-7.00007-0 (2019)
- 12 L. Gracin, A.R. Jambrak Juretic, H. Juretic et al. Influence of high power ultrasound on *Brettanomyces* and lactic acid bacteria in wine in continuous flow treatment. *Appl Acoust* **103**, 143–147 (2015)



- 13 E. Silva., High pressure processing effect on microorganisms in fruit and vegetable products. In: CRC Press: Boca Raton, FL U (ed) *High Pressure Processing of Fruit and Vegetable Juices*. London, UK; New York, NY, USA, 3–37 (2018)
- 14 V. Falguera, M. Forns, A. Ibarz. UV - vis irradiation: an alternative to reduce SO<sub>2</sub> in white wines? *LWT - Food Sci Technol* **51**, 59–64 (2013)
- 15 P.M. Izquierdo-Cañas, E. García-Romero, B. Huertas-Nebreda et al. Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control* **23**, 73–81 (2012)
- 16 M.C. Santos, C. Nunes, J.A. Saraiva et al. Chemical and physical methodologies for the replacement/reduction of sulfur dioxide use during winemaking: review of their potentialities and limitations. *Eur Food Res Technol* **234**, 1–12 (2012)
- 17 L. Marchante, A. Mena, P.M. Izquierdo-Cañas et al. Effects of the pre-fermentative addition of chitosan on the nitrogenous fraction and the secondary fermentation products of SO<sub>2</sub>-free red wines. *J Sci Food Agric* **101**, 1143–1149 (2021)
- 18 B. Rojo-Bezares, Y. Sáenz, M. Zarazaga et al. Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *Int J Food Microbiol* **116**, 32–36 (2007)
- 19 S. Windholtz, P. Redon, S. Lacampagne et al. Non-*Saccharomyces* yeasts as bioprotection in the composition of red wine and in the reduction of sulfur dioxide. *LWT - Food Sci Technol* **149**, 111781 (2021)
- 20 I. López, P. Santamaría, C. Tenorio et al. Evaluation of lysozyme to control vinification process and histamine production in Rioja wines. *J Microbiol Biotechnol* **19**, 1005–1012 (2009)
- 21 OIV. Resolución OIV-OENO 445-2015 Tratamientos de los mostos con glutatión. *OENO* (2015)
- 22 E.M. González-Rompinelli, J.J. Rodríguez-Bencomo, A. García-Ruiz et al. A winery-scale trial of the use of antimicrobial plant phenolic extracts as preservatives during wine ageing in barrels. *Food Control* **33**, 440–447 (2013)
- 23 M.I. Salaha, S. Kallithraka, I. Marmaras et al. A natural alternative to sulphur dioxide for red wine production: Influence on colour, antioxidant activity and anthocyanin content. *J Food Compos Anal* **21**, 660–666 (2008)
- 24 M.J. Cejudo-Bastante, F. Sonni, F. Chinnici et al. Fermentation of sulphite-free white musts with added lysozyme and oenological tannins: Nitrogen consumption and biogenic amines composition of final wines. *LWT - Food Sci Technol*. **43**, 1501–1507 (2010)
- 25 M.J. Ruiz-Moreno, R. Raposo, J.M. Moreno-Rojas et al. Efficacy of olive oil mill extract in replacing sulfur dioxide in wine model. *LWT - Food Sci Technol* **61**, 117–123 (2015)
- 26 F.J. Barba, Z. Zhu, M. Koubaa et al. Green alternative methods for the extraction of antioxidant bioactive compounds from winery wastes and by-products: A review. *Trends Food Sci Technol* **49**, 96–109 (2016)
- 27 M.I. Fernández-Marín, R. Mateos, M.C. García-Parrilla et al. Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chem* **130**, 797–813 (2012)
- 28 F. Visioli, S.A. Panaite, J. Tomé-Carneiro. Wine's phenolic compounds and health: a pythagorean view. *Molecules* **25**, 4105 (2020)
- 29 J. Armengol Fortí. Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Una visión general del problema. *Enovicultura* **46**, 6–15 (2017)
- 30 S. Cruz, R. Raposo, M.J. Ruiz-Moreno et al. Grapevine-shoot stilbene extract as a preservative in white wine. *Food Packag Shelf Life* **18**, 164–172 (2018)
- 31 R. Raposo, M.J. Ruiz-Moreno, T. Garde-Cerdán et al. Replacement of sulfur dioxide by hydroxytyrosol in white wine: Influence on both quality parameters and sensory. *LWT - Food Sci Technol*. **65**, 214–221(2016)
- 32 B. Biais, S. Krisa, S. Cluzet et al. Antioxidant and cytoprotective activities of grapevine stilbenes. *J Agric Food Chem* **65**, 4952–4960 (2017)
- 33 R.F. Guerrero, B. Puertas, M.I. Fernández et al. Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innov Food Sci Emerg Technol* **11**, 231–238 (2010)
- 34 R. Gutiérrez-Escobar, M.I. Fernández-Marín, T. Richard et al. Development and characterization of a pure stilbene extract from grapevine shoots for use as a preservative in wine. *Food Control*. **121**, 107684 (2021)
- 35 C. Cebrián-Tarancón, R. Sánchez-Gómez, J.C. Carot, A. Zalacain, L.A. Gonzalo. Assessment of vine-shoots in a model wines as enological additives. *Food Chem* **288**, 86–95 (2019)
- 36 A. García-Ruiz, C. Cueva, E.M. González-Rompinelli et al. Antimicrobial phenolic extracts able to inhibit lactic acid bacteria growth and wine malolactic fermentation. *Food Control* **28**, 212–219 (2012)
- 37 EFSA. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment. *EFSA J*. **9**, 2379,69 (2011)
- 38 C. Medrano-Padial, A.I. Prieto, M. Puerto et al. In vitro assessment of the mutagenic and genotoxic potential of a pure stilbene extract. *Food Chem Toxicol* (2021) **150**, 112065 (2021)
- 39 C. Medrano-Padial, M. Puerto, A.I. Prieto et al. In vivo genotoxicity evaluation of a stilbene extract prior to its use as a natural additive: a combination of the micronucleus Test and The Comet Assay. *Foods* **10**, 439 (2021)
- 40 R. Gutiérrez-Escobar, M.J. Aliaño-González, A. Marrufo-Curtido et al. Sulfur dioxide-free Verdejo wines through the use of a pure stilbene extract: exploring possible synergistic effect with glutathione. *J Sci Food Agric*. **103**, 1152–1160 (2022)
- 41 OIV. *Compendium of international methods of wine and must analysis*. Paris (2021)

- 42 R. Gutiérrez-Escobar, J.M. Aliaño, I. Le Mao, et al. Grapevine shoots extract as an alternative to SO<sub>2</sub> in rosé wines. A double approach: classical measurements and <sup>1</sup>H-NMR metabolomics. *Food Control*. **152**, 109681 (2023)
- 43 R.F. Guerrero, A. Liazid, M. Palma et al. Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chem.* **112**, 949–955 (2009)
- 44 A.Vallverdú-Queralt, A.Verbaere, E. Meudec et al. Straightforward method to quantify GSH, GSSG, GRP, and hydroxycinnamic acids in wines by UPLC-MRM-MS. *J Agric Food Chem* **63**, 142–149 (2015)
- 45 I. Le Mao, J. Martin-Pernier, C. Bautista et al. <sup>1</sup>H-NMR Metabolomics as a Tool for Winemaking Monitoring. *Molecules* **26**, 1–13 (2021)
- 46 I. Le Mao, G. Da Costa, C. Bautista et al. Application of <sup>1</sup>H NMR metabolomics to French sparkling wines. *Food Control* **145**, 109423 (2023)
- 47 V. Filip, M. Plocková, J. Šmidrkal et al. Resveratrol and its antioxidant and antimicrobial effectiveness. *Food Chem.* **83**, 585–593 (2003)
- 48 M. Du Toit, I.S. Pretorius. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons from nature's own arsenal -a Review. *South African J Enol Vitic.* **21**, 74–96 (2000)
- 49 OCDE. Guideline for the Testing of Chemicals 471: Bacterial Reverse Mutation Test. 1–23 (2020)
- 50 OCDE. Guideline for the Testing of Chemicals 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. 1–23 (2016)
- 51 OCDE. Guideline for the Testing of Chemical 474: Mammalian erythrocyte micronucleus test. 1–21 (2014)
- 52 OCDE. Guideline for the Testing of Chemical 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay. 1–27 (2016)
- 53 Izquierdo-Cañas PM, Mena-Morales A, Pérez-Navarro J, et al. Saturation of grape musts with CO<sub>2</sub>: A technique to reduce the use of SO<sub>2</sub> in white wines. *LWT - Food Sci Technol.***152**, 112318 (2021)
- 54 J.N. Jackowetz, S. Dierschke, R.M. De Orduña. Multifactorial analysis of acetaldehyde kinetics during alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res Int.* **44**, 310–316 (2011)
- 55 M.E. Alañón, M.C. Díaz-Maroto, M.S. Pérez-Coello MS. New strategies to improve sensorial quality of white wines by wood contact. *Beverages* **4**, 1–11 (2018)
- 56 M.S. García-Falcón, C. Pérez-Lamela, E. Martínez-Carballo et al. Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chem* **105**, 248–259 (2007)
- 57 S. Kallithraka, M.I. Salacha, I. Tzourou. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chem.* **113**, 500–505 (2009)
- 58 X. Lyu, D.R. Prado, L.D Araujo et al. Effect of glutathione addition at harvest on Sauvignon Blanc wines. *Aust J ofGrape Wine Res.* **27**, 431–441 (2021)
- 59 V. Webber, S. Valduga, F. Rodrigues et al. Effect of glutathione during bottle storage of sparkling wine. *Food Chem.* **216**, 254–259 (2017)
- 60 I. Le Mao, G. Da Costa, T. Richard. <sup>1</sup>H-NMR metabolomics for wine screening and analysis. *OENOOne* **57**, 15–31 (2023)
- 61 A. Lonvaud. Bacterias lácticas y fermentación maloláctica (FML). *Wine Internet Tech J.* **5**, 1–7 (2002)