



# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## FACULTAD DE QUÍMICA

Biodisponibilidad In Vitro de Residuos de Fungicidas  
en Vinos. Influencia de su Presencia en la Capacidad  
Antioxidante y Biodisponibilidad de Compuestos Fenólicos

**Dña. Gracia Martínez Orenes**  
**2016**



Dr. José Oliva Ortiz, Profesor Titular del Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología de la Universidad de Murcia y Dr. Miguel Ángel Cámara Botía, Profesor Titular del Departamento de Química Agrícola, Geología y Edafología de la Universidad de Murcia, como directores de la Tesis Doctoral titulada “BIODISPONIBILIDAD IN VITRO DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN VINOS. INFLUENCIA DE SU PRESENCIA EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS.” realizada por D<sup>a</sup> Gracia Martínez Orenes.

**AUTORIZAN:**

La presentación a trámite de la citada Tesis dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa ante el tribunal que se designe.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmamos la presente en Murcia a dieciocho de enero de dos mil dieciséis.

Fdo.: Dr. José Oliva Ortiz

Fdo.: Dr. Miguel Ángel Cámara Botía

Nadie me dijo que fuera fácil llegar a convertir un deseo en un logro, pero sí que merecería la pena hacerlo. Para mi esta Tesis es un logro, un objetivo conseguido, que me ha ayudado a incrementar mis conocimientos científicos y humanos. Y ello se lo debo en gran parte, a todas aquellas personas que me han rodeado en estos años. A todos esos amigos, compañeros y familiares que cuando las fuerzas decaían, y la calma desaparecía, me hacían recordar por qué empecé con este proyecto.

A mis directores de Tesis los Drs., D. José Oliva Ortiz y D. Miguel Ángel Cámara Botía, por aceptarme para realizar esta tesis doctoral bajo su dirección. Tengo que agradecerles sus comentarios, direcciones, sugerencias y las correcciones con las que he podido elaborar una adecuada memoria de todo el trabajo realizado durante estos últimos años. Su confianza y apoyo en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas han sido de gran valor, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigadora.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Dr. Alberto Barba Navarro por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis. Debo destacar sobre todo, su paciencia y diligencia que me han beneficiado tanto a nivel científico como personal.

Debo de agradecer a esta Tesis el haberme dado la oportunidad de conocer a una gran compañera y mejor amiga, Sandra Cermeño Olmos, con la que he compartido largas conversaciones sobre la ciencia y la vida, que me han sido de gran valor.

A todos mis amigos y amigas (que por suerte son muchos para enumerarlos) que han compartido conmigo todos estos años de esfuerzo, dándome en todo momento su apoyo incondicional.

También quiero expresar mi agradecimiento a toda mi familia. Sin ellos no habría podido llegar a este punto. Mis padres, Rosalía y Joaquín, han sido los cimientos sobre los que se apoya toda mi formación académica, gracias a sus "inversiones en educación" y a sus continuos correos electrónicos animándome a continuar. A mi hermano Jesús, que siempre ha estado a mi lado de una manera incondicional. Y, por supuesto, mi agradecimiento más sentido a Ginés, del cual he necesitado su cariño, comprensión y sostén, a veces en unas dosis extraordinariamente elevadas.

En memoria de mi hermano "Nano".

***Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor,  
la electricidad y la energía atómica: la voluntad.***

Albert Einstein

Trabajo financiado por el proyecto de investigación AGL2011-30378-C03-03.  
Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación.  
Secretaría General de Ciencia, Tecnología e Innovación.  
Ministerio de Economía y Competitividad.



## ÍNDICE



<b>1. OBJETO Y SÍNTESIS.</b>	1
<b>2. INTRODUCCIÓN.</b>	7
2.1. Orígenes de la vid y el vino	9
2.1.1. El vino en Egipto	12
2.1.2. Grecia y el vino	12
2.1.3. Imperio Romano y el vino	13
2.1.4. Orígenes de la vid en la Península Ibérica	14
2.2. Panorama vitivinícola actual	14
2.2.1. Situación del mercado mundial	15
2.2.1.1. Viñedo	15
2.2.1.2. Producción mundial de vino	16
2.2.1.3. Producción de vino en la Unión Europea	17
2.2.1.4. Consumo mundial de vino	18
2.2.2. Situación del sector en España	19
2.2.2.1. Viñedo	19
2.2.2.1.1. Superficie cultivada	19
2.2.2.1.2. Producción de vino	21
2.2.3. Exportación de vino	21
2.3. Variedades de uva de vinificación	23
2.3.1. <i>Vitis vinifera</i> var. Monastrell	24
2.3.2. <i>Vitis vinifera</i> var. Tempranillo	26
2.3.3. <i>Vitis vinifera</i> var. Graciano	27
2.4. Vinificación tradicional en tinto	28
2.5. Características organolépticas de los vinos	30
2.6. Composición fenólica de la uva y del vino	33
2.6.1. Compuestos no flavonoides	35
2.6.1.1. Ácidos fenoles	35
2.6.1.2. Estilbenos	37
2.6.2. Flavonoides	37
2.6.2.1. Antocianos	38
2.6.2.2. Flavanos 3-oles (3-flavonoles)	38
2.6.2.3. Flavonoles	39
2.7. Principales enfermedades fúngicas de la vid	40
2.7.1. Podredumbre gris o Botritis ( <i>Botrytis cinerea</i> )	40
2.7.2. Mildiu ( <i>Plasmopara viticola</i> )	41
2.7.3. Oídio ( <i>Uncinula necator</i> )	43
2.8. Plaguicidas y vitivinicultura	44
2.8.1. Conceptos generales	44
2.8.2. Fungicidas empleados en el viñedo	45
2.9. Efectos derivados de la utilización de plaguicidas en viticultura	47
2.9.1. Residuos en uva, mosto y vino	47
2.9.2. Efectos de los residuos de fungicidas sobre la actividad de levaduras y bacterias lácticas	51
2.9.3. Influencia de los residuos de fungicidas en la composición fenólica de los vinos...	53

2.9.4. Contaminación ambiental .....	55
2.9.5. Efecto toxicológico sobre el consumidor .....	56
2.10. Medidas legislativas sobre el uso sostenible de productos fitosanitarios .....	58
2.11. Determinación de la exposición a los plaguicidas .....	62
2.11.1. Concepto de riesgo .....	62
2.11.2. Evaluación del riesgo .....	63
2.11.3. Biodisponibilidad de los residuos de plaguicidas en alimentos .....	64
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	
.....	69
3.1. Materiales .....	71
3.1.1. Fungicidas estudiados.....	71
3.1.1.1. Kresoxim-metil.....	71
3.1.1.2. Mepanipirim.....	73
3.1.1.3. Metrafenona .....	74
3.1.1.4. Ciazofamida.....	75
3.1.1.5. Boscalid .....	76
3.1.1.6. Fenhexamida .....	77
3.1.2. Formulados comerciales.....	78
3.1.3. Material vegetal estudiado .....	79
3.1.3.1. Uvas tintas de vinificación.....	79
3.1.3.1.1. <i>Vitis vinifera</i> var. Monastrell .....	79
3.1.3.1.2. <i>Vitis vinifera</i> var. Tempranillo .....	79
3.1.3.1.3. <i>Vitis vinifera</i> var. Graciano .....	79
3.1.4. Reactivos y disolventes .....	80
3.1.5. Aparatos e instrumentación .....	81
3.2. Métodos.....	82
3.2.1. Aplicaciones en campo .....	82
3.2.2. Vinificación .....	84
3.2.3. Análisis de residuos de plaguicidas.....	86
3.2.3.1. Extracción (QuEChERS) en uva y vino .....	86
3.2.3.2. Determinación por CL-MS/MS.....	87
3.2.4. Validación del método analítico de residuos de plaguicidas.....	88
3.2.4.1. Identificación, confirmación y cuantificación .....	88
3.2.4.2. Linealidad de respuesta del detector .....	88
3.2.4.3. Límites de detección y de cuantificación .....	89
3.2.4.4. Precisión y exactitud.....	89
3.2.4.5. Control de calidad .....	90
3.2.5. Determinación de la actividad antioxidante .....	90
3.2.6. Determinación de compuestos fenólicos en vino .....	91
3.2.6.1. Polifenoles totales .....	91
3.2.6.2. Compuestos fenólicos .....	92
3.2.7. Estudio de biodisponibilidad <i>in vitro</i> .....	93
<b>4. RESULTADOS.</b>	
.....	95
4.1. Residuos de fungicidas .....	97
4.1.1. Validación del método analítico de residuos de fungicidas .....	97
4.1.2. Determinación de residuos en vino .....	101
4.2. Determinación de actividad antioxidante y compuestos fenólicos .....	104
4.2.1. Actividad antioxidante .....	104
4.2.2. Polifenoles totales .....	109
4.2.3. Compuestos fenólicos .....	114
4.3. Biodisponibilidad .....	135
4.3.1. Biodisponibilidad de fungicidas .....	135
4.3.1.1. Efecto de la matriz y de la concentración.....	135
4.3.1.2. Estudio de la biodisponibilidad de los fungicidas en vino .....	139
4.3.2. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos.....	143

4.3.2.1. Biodisponibilidad de la actividad antioxidante.....	143
4.3.2.2. Biodisponibilidad de polifenoles totales.....	146
4.3.2.3. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos.....	150
<b>5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.</b> .....	157
<b>6. BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	167
<b>7. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.</b> .....	211
<b>8. SIGLAS.</b> .....	219



## **1. OBJETO Y SÍNTESIS.**

En el cultivo de la vid, los ataques de hongos son una de las principales causas de pérdidas de cosecha y de calidad de la uva; por esta razón el uso de fungicidas es un medio indispensable para evitar las enfermedades que producen. Por tanto la utilización de fungicidas y su posible presencia en los vinos derivados de las uvas tratadas, debe constituir una preocupación, tanto para el vitivinicultor desde el punto de vista de la calidad del vino, como para el consumidor por el posible efecto de sus residuos en el producto final.

Los compuestos fenólicos y su concentración en los vinos son los responsables de gran parte de su calidad y de su actividad antioxidante, característica ésta de gran importancia en sus propiedades beneficiosas. Como productos endógenos de la uva, se pueden ver influidos por la presencia de otros productos químicos exógenos que provengan de tratamientos a los cultivos, como es el caso de los fungicidas.

En este sentido, en la presente Memoria se pretende estudiar la influencia de la presencia de residuos de algunos fungicidas (antioidio, antimildiu y antibotritis), seleccionados por sus características de novedad de uso y por su toxicidad, en los contenidos de actividad antioxidante y compuestos fenólicos de vinos obtenidos de uvas Tempranillo y Graciano (características de la D.O. Rioja), tratadas en campo bajo condiciones de buenas y críticas prácticas agrícolas (BPA y CPA); así como de los obtenidos después de añadirlos en bodega y antes de la vinificación.

También se han realizado estudios de su biodisponibilidad *in vitro* tanto de los fungicidas estudiados, como de la fracción fenólica.

Con el trabajo desarrollado, se ha pretendido alcanzar los siguientes objetivos generales:

1. Conocer los residuos de los fungicidas seleccionados en los vinos elaborados con uvas Tempranillo y Graciano, tratadas en campo con las correspondientes formulaciones comerciales en condiciones de buenas prácticas agrícolas o BPA (respetando dosis y plazos de seguridad) y prácticas críticas o CPA (aplicados el mismo día de la vendimia); así como de las materias activas añadidas a las uvas estrujadas en la bodega y antes de la vinificación.

2. Determinar los parámetros más característicos relacionados con la fracción fenólica (actividad antioxidante, polifenoles totales y concentración de compuestos fenólicos) en todos los vinos elaborados y correlacionar la influencia de la presencia o no de residuos de los fungicidas utilizados.

3. Estudiar el proceso de biodisponibilidad *in vitro*, tanto de los fungicidas como de los compuestos fenólicos, en los vinos obtenidos de las uvas tratadas y no tratadas.

Objetivos generales que incluirían los siguientes objetivos específicos:

1.1. Validación de la metodología analítica (extracción y análisis) necesaria para la determinación de los fungicidas: boscalid, kresoxim-metil, metrafenona, fenhexamida, mepanipirim y ciazofamida.

1.2. Determinación de los residuos presentes en los vinos obtenidos de uvas Tempranillo y Graciano, tratadas en campo y fortificadas en bodega con los mencionados fungicidas.

2.1. Determinación de la actividad antioxidante de los vinos elaborados con las uvas tratadas y correlación de estos valores con la presencia o ausencia de residuos de los fungicidas utilizados.

2.2. Determinación de polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) de los mismos vinos y su correlación con los fungicidas.

2.3. Valoración de los contenidos en compuestos fenólicos, agrupados en las familias antocianos, flavonoles, compuestos hidroxicinámicos y estilbenos, y su correlación con los residuos presentes por comparación a los vinos testigo.

3.1. Estudio de la influencia de la concentración de los residuos de los fungicidas y de la matriz en el proceso de biodisponibilidad *in vitro*, comparando el proceso en disoluciones patrón, uva y vino.

3.2. Valoración de la biodisponibilidad *in vitro* de los residuos de los fungicidas estudiados en los vinos elaborados.

3.3. Valoración de la biodisponibilidad *in vitro* de las familias de compuestos fenólicos y su comparación con los vinos testigo.

Todo el trabajo realizado para alcanzar dichos objetivos, se puede resumir en el esquema de trabajo representado en la Figura 1.1.

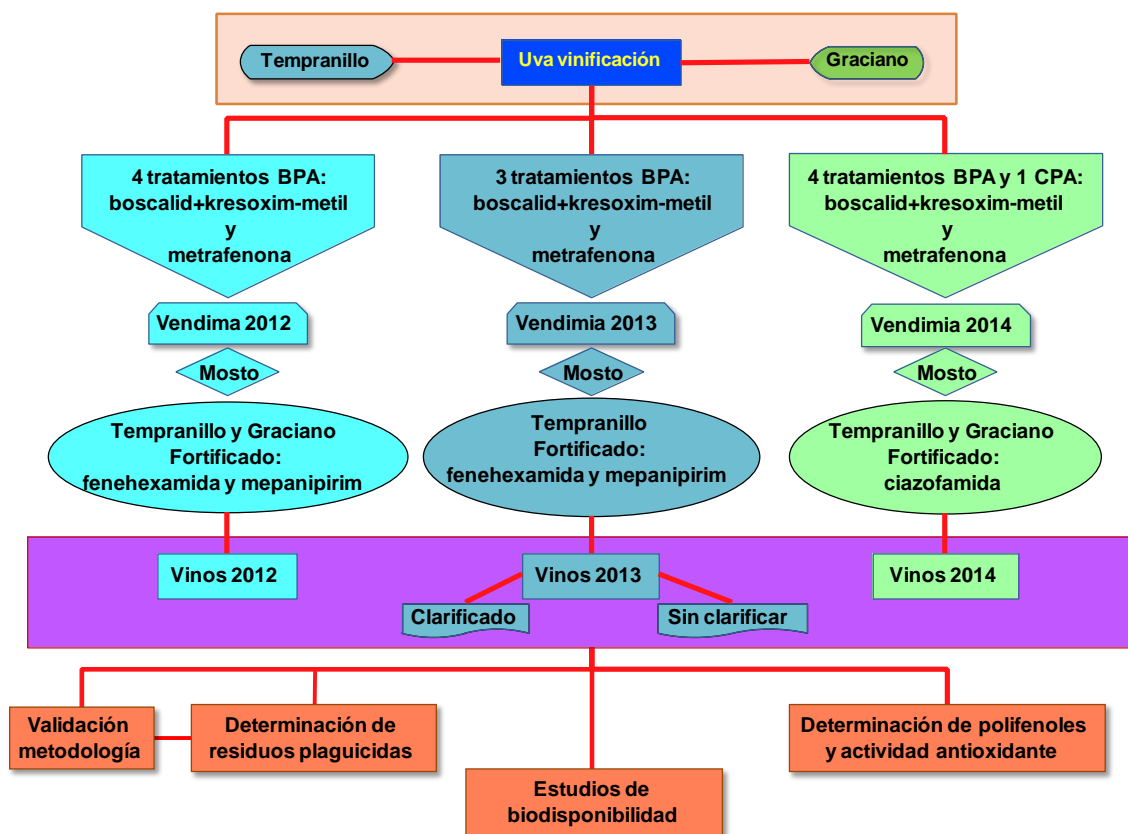


Figura 1.1.- Planteamiento y esquema del trabajo.



## **2. INTRODUCCIÓN.**



## **2.1. ORÍGENES DE LA VID Y EL VINO.**

Entender la historia del vino implica adentrarnos no sólo en la vida cotidiana de millones de personas a lo largo de milenios; también es observar el proceso de diálogo con la naturaleza y de creación de cultura, de apropiación de técnicas agrícolas, de elaboración, de envasado, entre muchas otras prácticas y procesos. Tarea que compromete la necesaria transmisión de experiencias y conocimientos de una generación a otra.

Ninguna otra actividad agrícola ha generado una mitología tan rica y vasta como la vitivinicultura. Sus dioses simbolizan la estrecha relación entre lo sagrado y lo racional que conviven en el arte y la ciencia derivados de la vid. El vino forma parte desde muy temprano de ritos religiosos: la mitología griega y romana, el Judaísmo y el Cristianismo, entre otros, adoptaron al vino como símbolo de vida, muerte y resurrección. Por su naturaleza, las actividades en torno de la vid crean cultura, arraigan pobladores, enriquecen tradiciones y saberes heredados, unen pueblos a través del intercambio comercial.

Según el ampelógrafo profesor Branas (1974), el actual reparto del género *Vitis* en el mundo (secciones *Muscadinea* y *Vitis* que comprende 61 géneros), se explica mediante la teoría de Wegener, por la creación de los continentes a partir de uno primigenio llamado Pangea hace 250 millones de años, así como la formación de las cordilleras en los mismos, que pudieran impedir los movimientos de las vides empujadas por los fríos de las glaciaciones. Las cordilleras orientadas en la dirección norte-sur no imposibilitaron el citado movimiento, mientras que las situadas hacia el este-oeste como sucede en Europa, sí frenaron la traslación de las mismas. Por esta sola razón se explica la existencia de las *Vitis vinifera* en la cuenca del Mediterráneo y por el contrario la presencia en los continentes de Asia y América del resto de los

género vitáceos. La más antigua manifestación de la existencia del género *Vitis*, data de hace más de 63 millones de años, en el Pleistoceno (Terciario), con el descubrimiento de una hoja fósil de una ampelídea en la localidad de Sézanne en el Marne (Francia).

El género *Vitis* aparece en Europa hacia finales del Mioceno (Terciario) hace unos 26 millones de años, ocupando unas posiciones moderadamente cálidas en el Macizo Central. Más adelante al final del Plioceno (Terciario) hace dos millones de años, aparece la *Vitis vinifera silvestris*, quedando después de las glaciaciones en el Cuaternario, refugiada en la cuenca del mar Mediterráneo y sur del mar Caspio.

Las especies procedentes del sur del mar Caspio y las del Oriente Medio, llamadas *Proles Orientalis*, avanzaron hacia las riberas del Mediterráneo en sentido este u oeste, mezclándose con las *Proles Póntica* originarias del mar Negro, que también se movieron en este mismo sentido y cruzándose en su emigración con las especies procedentes del Occidente Mediterráneo, llamadas *Proles Occidentalis*, que avanzaban en sentido contrario. Estas especies mezcladas entre sí, se cruzaron con las *Vitis silvestris* de la Europa del norte, dando origen a las actuales variedades de uva.

Si se considera al cultivo de la vid y la elaboración de vinos como una actividad humana intencional y planificada, se podría decir que en el Neolítico (entre los años 8000 a.C. y 6000 a.C.) se dieron las condiciones necesarias para su comienzo, en una vasta zona comprendida entre el Mar Negro y el Mar Caspio, delimitada por los actuales países de Turquía, Siria, Irak, Irán y Rusia (Figura 2.1).

La Neolítica constituyó la primera gran revolución humana, ya que los hombres cambiaron definitivamente sus vidas a partir de ella. Después de miles de años de trashumar siguiendo a las manadas de animales, alrededor del 8000 a.C., los grupos dejaron de ser nómadas, se asentaron y desarrollaron la agricultura, la metalurgia y otras actividades, dando origen a los primeros poblados humanos. Los cultivos mejoraron la calidad y cantidad de alimentos y trajeron consigo la domesticación de animales. La cantidad inusual de alimentos, su conservación y distribución generó la división del poder, de las tareas sociales y demás actividades culturales dentro de las aldeas. Fueron estas comunidades las primeras que aprendieron a cocinar, fermentar,

deshidratar granos, condimentar alimentos y también bebidas como el vino y los destilados.



**Figura 2.1.** El mapa muestra las primeras regiones, entre los mares Mediterráneo, Negro y Caspio, donde se arraigó la vid (Fuente: [www.museum.upenn.edu](http://www.museum.upenn.edu)).

Los alfareros y ceramistas (5000 a.C.) fueron clave: la plasticidad de la arcilla hizo posible la construcción de vasijas de diferentes formas para la fermentación y conservación del vino. Las vasijas cocidas a altas temperaturas perduraban años y sus poros constituían un excelente vehículo de oxigenación del vino.

Hasta ahora, la primera evidencia arqueológica la constituye un conjunto de vasijas de cuello estrecho y alargado en la aldea Hajji Firuz Tepe, situada en Irán, datadas entre los 5.400 y 5.000 años a.C. A partir de análisis químicos, se pudo determinar la existencia de ácido tartárico, propio del vino, en sus paredes. Hacia el año 2.000 a.C, durante el apogeo de Babilonia, en Mesopotamia, el cultivo de la vid se trasladó hacia el Norte del Valle del Tigris, actual Turquía. De la lectura del Código de Hammurabi se desprende que el vino desempeñaba un papel importante en las ceremonias religiosas y era consumido por la clase gobernante. Hasta el apogeo de los romanos, el vino era un privilegio reservado para reyes, nobles y sacerdotes, mientras que el pueblo consumía otras bebidas menos costosas (Hidalgo, 2003; Lanzarini y Juan-Mangione, 2009).

### **2.1.1. EL VINO EN EGIPTO.**

Egipto se encontraba situado fuera de la zona o hábitat natural de la *Vitis silvestris*, por lo tanto se piensa que la mayor parte del vino, que abundantemente se consumía, procedía de fuera: Caná de Galilea, ribera del Egeo, Grecia, etc. Aunque en determinadas zonas se cultivaba el viñedo, como en el delta del Nilo, pero con resultados de vinos de poca calidad a tenor de las masivas importaciones.

Junto a los templos de los faraones de la primera dinastía del Reino Antiguo (2700 a.C.), se encuentran grandes bodegas, lo que demuestra que los reyes y sacerdotes egipcios consumían vino. Encontrándose además este producto en las ofrendas fúnebres dentro de vasijas cerradas y selladas con arcilla fresca, a modo de etiqueta en la que ponía información relativa del lugar, de la bodega y de su dueño. Descubriéndose de esta manera que el vino era cultivado en pequeños viñedos como jardines. Las pinturas en las paredes de las tumbas en Tebas (hacia el 1450 a.C.) permiten reconocer los canastos de mimbre, usados para recolectar uvas, lagares y vasijas de arcilla cocida (Hidalgo, 2003; Lanzarini y Juan-Mangione, 2009).

### **2.1.2. GRECIA Y EL VINO.**

Son múltiples los testimonios sobre la producción de vino en la cultura micénica y el mayor exponente es el origen de la palabra vino, que procede de wo-no y que a su vez deriva del nombre del dios del vino Diwonusus (Dionisios).

El apogeo de la vitivinicultura antigua comenzó con los griegos. Se los considera los primeros "expertos en vinos" por los avances logrados en el cultivo y la vinificación. Fueron ellos los responsables de la difusión del consumo de vinos en toda la costa del Mediterráneo, hasta Portugal, el Norte de África y Asia Menor; también llevaron la vid a la actual Francia, habitada entonces por los galos. Tal era la importancia del vino en Grecia, que a principios del siglo VII (a.C.) empezaron a importar cantidades notables de cereales, con el objeto de liberar tierras para destinarlas al cultivo de la vid e incluso llegaron a exportar vinos como producto de alto valor comercial. Los viñedos griegos estaban protegidos por murallas y se alternaban con frutales. Hombres y mujeres participaban en sus labores: las mujeres

cosechaban y preparaban la comida para sus compañeros, mientras los varones pisaban la uva, elaboraban el vino y ataban las cepas.

Junto con la vitivinicultura, florecieron en Grecia la alfarería y la orfebrería. Las ánforas de cerámica donde se fermentaba el vino eran semienterradas hasta que el vino estaba listo para la venta. El vino resultante era de alto grado alcohólico, espeso y licoroso, por eso lo llamaban "vino negro" y era rebajado con agua ya que su consumo se hacía de forma civilizada en el marco de los simposios. En el simposio se establecía un ambiente y organización adecuados, dirigiendo el desarrollo un jefe (simposiarca), el cual establecía la proporción de la mezcla del agua con el vino. El objeto de esta práctica era rebajar la graduación alcohólica del vino, para que la duración del festejo fuera mayor o también suavizar los efectos de la acción de las plantas u otros aditivos que se maceraban o mezclaban con el vino. Los griegos consideraban bárbaros e incultos al resto de los pueblos que bebían vino puro sin mezclar con agua. La cultura griega se expandió por toda la ribera del mar Mediterráneo, consumiendo primeramente los pueblos colonizados vino griego o fenicio hasta que aprendieron a producirlo en sus propias tierras (Hidalgo, 2003; Lanzarini y Juan-Mangione, 2009).

### **2.1.3. IMPERIO ROMANO Y EL VINO.**

La vinicultura y enología de Roma, tienen su origen en lo desarrollado por los griegos, perfeccionándose sus técnicas a lo largo de los siglos y encontrando una multitud de restos de estas actividades, tanto en yacimientos arqueológicos, como en testimonios escritos. Con ellos, el consumo del vino se expandió más allá del Norte de Alemania, que era su frontera septentrional. Los primeros viñedos se encontraban en zonas costeras o cerca de ríos importantes como el Rhin, Ródano, Garona y Danubio.

La expansión de los viñedos en el Sur de Francia se dio a partir del año 122 a.C. con la ocupación de los romanos de la Galia Narbonense. Desde allí, los galos vendían el vino en el Norte de Francia, Alemania e Italia obteniendo importantes beneficios. La conquista de Iberia (actual España) finalizada en 133 a.C. favoreció la competencia entre los vinos ibéricos y los italianos.

Hacia el fin del Imperio Romano la vid era el principal cultivo en las zonas que actualmente siguen siendo vitivinícolas. Los romanos fueron los primeros en nombrar a las distintas variedades, aunque es difícil para los ampelógrafos encontrar sinónimos con las actuales, dada la evolución que ha experimentado la vid en más de 2000 años (Hidalgo, 2003; Lanzarini y Juan-Mangione, 2009).

#### **2.1.4. ORÍGENES DE LA VID EN LA PENÍNSULA IBÉRICA.**

En la Península Ibérica, aunque existen pruebas de presencia de viñedos desde el III milenio a.C., manifestado por restos de pepitas encontrados en diversos yacimientos arqueológicos y otros estudios polínicos realizados, fueron probablemente los comerciantes fenicios quienes en los siglos IX a VIII a.C., introdujeron el vino y consecuentemente el cultivo de la vid, con los criterios que esencialmente hoy día continúan en vigor. Primero directamente desde los puertos fenicios de Asia y más tarde desde sus colonias avanzadas en Iberia o del norte de África (Cartago). En un principio el vino era importado por el propio consumo de la colonia fenicia y también con destino a las clases dirigentes locales. Una vez introducido el cultivo de vid en la Península Ibérica de la mano de los fenicios y pueblos helenos, la conquista de Iberia por los romanos supuso primero una continuidad en la producción de vino, que fundamentalmente se centraba en la zona costera del mar Mediterráneo y en segundo lugar, una extensión de los viñedos al resto del territorio y como consecuencia de la cultura romana que siempre era fiel compañera de sus conquistas. Las referencias sobre la vid y el vino en esta etapa de la historia, son numerosísimas y desde entonces en los países ibéricos la cultura del vino se consolidó como parte de la forma de vida de sus habitantes (Hidalgo, 2003).

### **2.2. PANORAMA VITIVINÍCOLA ACTUAL.**

España es uno de los grandes productores mundiales de vino, según los datos del Observatorio Español del Mercado del Vino (OEMV) recogidos en el informe de "El vino en cifras 2013" realizado por WinesfromSpain (OEMV, 2014). Es el primero en el ranking por superficie plantada, en la campaña 2013/2014, primero por producción, superando a Italia y a Francia y segundo exportador mundial en términos de volumen, aunque tercero en términos de valor. Por su importancia en términos económicos, pero

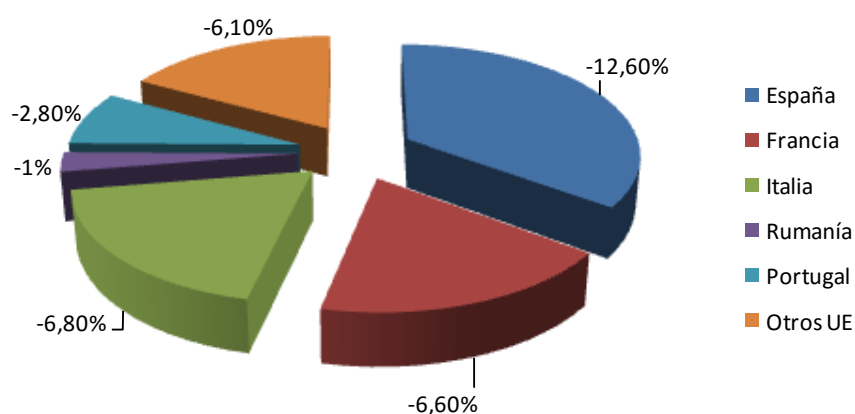
también sociales y medioambientales, así como por la importancia del vino como imagen del país en el exterior, el sector es de extraordinaria relevancia en España.

## 2.2.1. SITUACIÓN DEL MERCADO MUNDIAL.

### 2.2.1.1. Viñedo.

Según datos que se recogen en el informe "Vine and Wine Outlook 2010-2012" realizado por la Organización Internacional de la Viña y del Vino (OIV, 2013), en 2012 la superficie vitícola mundial disminuyó en 6.000 ha respecto a 2011, estimándose el total mundial en 7.528.000 ha. El viñedo comunitario total (UE-27) está reduciendo progresivamente su superficie plantada, pasando de las 3.791.000 ha en el año 2008 a las 3.492.000 ha en el año 2012 (Figura 2.2). Este proceso es consecuencia de la combinación de factores como la reestructuración del viñedo y el impacto de la crisis vitícola, que por otra parte, se ha dejado sentir de forma distinta por zonas y tipos de vino y a la que se añadió el programa europeo de ayuda a los arranques, ya finalizado.

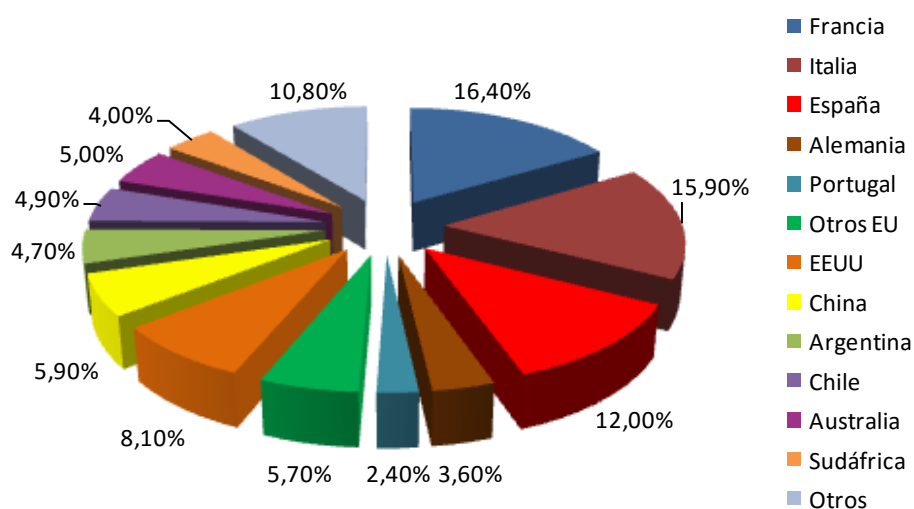
La disminución del viñedo comunitario queda compensada por el mantenimiento de las superficies plantadas del resto del mundo. Mientras disminuyen las plantaciones en Australia, éstas crecen en Chile, China y, en menor medida, en EE.UU.



**Figura 2.2.** Reducción de la superficie plantada entre 2008/2012, en los principales países de la UE (en %). Fuente: OIV; elaboración OEMV.

### 2.2.1.2. Producción mundial de vino.

El primer país productor de vino en 2012 fue Francia, con 41,4 millones de hl (16,4% mundial), seguido por Italia, con 40,1 millones de hl (16% mundial), y España, con 30,4 millones de hl (12,1% mundial y 21% de la UE) (Figura 2.3). Ya con menor volumen, la producción creció en Portugal (+9,5%), Grecia (+14,5%) y cae en Alemania (-1,3%) (OIV, 2013).



**Figura 2.3.** Producción mundial de vino 2012 (%). Fuente: OIV; elaboración OeMV.

Fuera de la UE, el nivel de producción es ligeramente inferior, en 2012, con 109,59 millones de hl, a 2011, 109,63 millones de hl. EE.UU. es el país no europeo de mayor producción de vino con 20,5 millones de hl, lo que supone un crecimiento de 1,3 millones de hl respecto a 2011. En segundo lugar, se encuentra Australia, con 12,7 millones de hl, país que supera ligeramente a Chile (12,6 millones de hl) y a Argentina con 11,8 millones de hl. Con respecto a 2011, aumenta la producción de Australia (+13,2%) y de Chile (+20%). Por el contrario, Argentina disminuye sus cifras en 3,7 millones de hl con respecto a la producción del año anterior, cuando se redujo igualmente, aunque de forma mucho más suave.

Respecto a otros países de fuera de la UE, Sudáfrica pasa de producir 9,3 millones de hl en 2011 a superar levemente los 10 millones en 2012. Brasil pasa de los 3,4 millones de hl producidos en 2011 a 2,9 millones en 2012, volviendo a registrar datos negativos. Nueva Zelanda vuelve a bajar de los 2 millones de hl tras superarlos con creces en 2011. Suiza, por su parte, redujo ligeramente la producción. Según las



estimaciones, de los 15,8 millones de hl que se dejaron de producir en 2012 a nivel mundial, 15 millones se pierden en los tres primeros productores mundiales: Francia, España e Italia, mientras que fuera del Viejo Continente, destaca la caída de Argentina. Por el contrario, países como Chile, EE.UU. y en menor medida, Sudáfrica o Portugal, rompieron con el descenso mundial.

### **2.2.1.3. Producción de vino en la Unión Europea.**

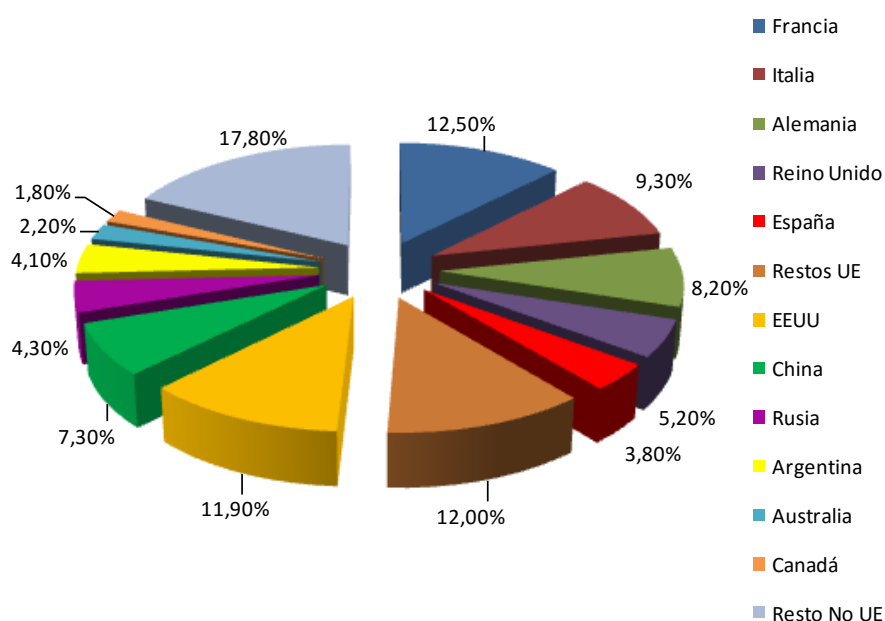
De acuerdo con los datos publicados por la OIV, la producción de vino de la Unión Europea en 2012 se sitúa en 141,4 millones de hl, bastante inferior a la de 2011, que fue de 157,2 millones (-10%). Por el contrario, la producción del conjunto de países externos a la UE se sitúa en 2012 en los 109,59 millones de hl, sólo un 0,04% menor que en 2011, que fue de 109,63 millones. Siguiendo estas estimaciones, la Unión Europea representaría el 56,1% de la producción vinícola mundial en 2012.

Según las cifras de la Comisión Europea, actualizadas a octubre de 2013 (OEMV, 2013), la producción de vino y mosto de uva en la Unión Europea alcanzaría los 171,1 millones de hl en la campaña 2013/2014, lo que supondría un aumento del 12,9% con respecto a la campaña 2012/13, un aumento muy superior en relación a la media de las cinco últimas campañas (+3,4%). Hay que señalar también que la campaña 2012/2013 fue muy escasa. La producción destinada a vinificación en la campaña 2013/2014 se estima en los 167,1 millones de hl, el 97,7% del volumen total. De ellos, 69,6 millones habrían sido destinados para vinos con Denominación de Origen Protegida (DOP) (41,6%), 34,3 millones para vinos con Indicación Geográfica Protegida (IGP) (20,5%), 5,4 millones para vinos varietales sin DOP ni IGP (3,2%) y 57,8 millones para los demás vinos (34,6%).

Por tipo de vino, Francia ocupa la primera posición como productor de vinos con DOP, con 19,8 millones de hl, frente a los 16,2 de Italia y los 14,8 de España. En lo que respecta a los vinos con IGP, la producción francesa asciende a 13,1 millones de hl, la italiana a 12,6 y la española a 4 millones. En cuanto a vinos varietales, sin DOP ni IGP, España se sitúa en cabeza con 2,5 millones de hl, seguida de Italia (0,4 millones de hl) y Bulgaria (0,29 millones de hl). Por último, en lo que respecta a la categoría de otros vinos, Italia es la principal productora con 15,2 millones de hl, por delante de España con 12 millones, y de Francia con algo menos de 10 millones.

### 2.2.1.4. Consumo mundial de vino.

Con una estimación de consumo mundial de vino en 2012 (OIV, 2013) de alrededor de 243 millones de hl, se aprecia un leve descenso respecto al año anterior de 1 millón de hl (-0,4%). Por países, destaca el aumento registrado en China, que crece en 1,5 millones de hl alcanzando los 17,8 millones (+9,3%). Le seguiría Francia, con un aumento de alrededor de 1 millón de hl, superando los 30 millones (+3,2%). En menor medida, el consumo crecería en EE.UU. (+575.000 hl), Alemania (+293.000 hl), o Argentina (+242.000 hl), entre otros. Por el contrario, caería el consumo en España un 6% hasta los 9,3 millones de hl (-594.000 hl), así como en Italia (-419.000 hl) o Reino Unido (-327.000 hl) (Figura 2.4).



**Figura 2.4.** Consumo mundial de vino 2012 (%). Fuente: OIV; elaboración OEMV.

En cuanto a la Unión Europea, el consumo bajaría en 280.000 hl respecto a 2011, con una caída del 1,1%, mientras que, en el resto del mundo, también caería el consumo. Con 122,7 millones de hl, la Unión Europea seguiría liderando el consumo de vino a nivel internacional, aunque sólo un punto por encima (50,5%) del conjunto de otros países.

## **2.2.2. SITUACIÓN DEL SECTOR EN ESPAÑA.**

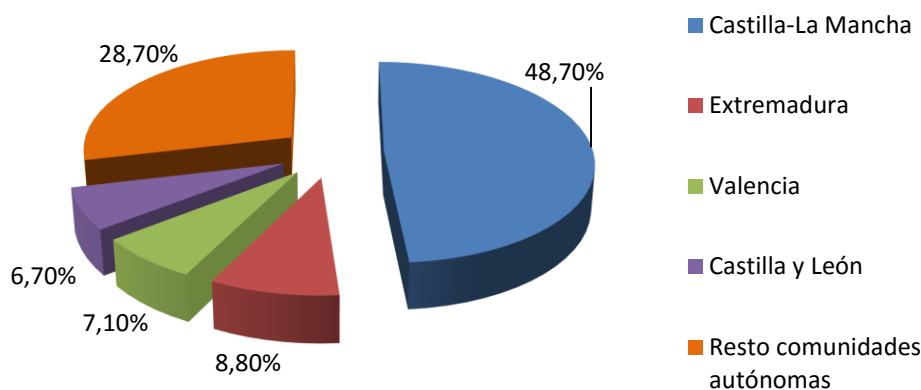
El sector vitivinícola español tiene gran importancia, tanto por el valor económico que genera, como por la población que ocupa y por el papel que desempeña en la conservación del medio ambiente.

### **2.2.2.1. Viñedo.**

España, con 1,018 millones de hectáreas destinadas al cultivo de la vid (97,4% destinadas a vinificación, un 2% a uva de mesa, un 0,3 % a la elaboración de pasas y un 0,3 % restante a viveros), sigue siendo, con diferencia, el país con mayor extensión de viñedo de la Unión Europea y del mundo, a pesar de estimarse una caída de 14.000 hectáreas respecto a 2011. Sin embargo, las estimaciones oficiales más recientes del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), recogidas en la "Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (ESYRCE)" (MAGRAMA, 2014b)", apuntan a que esta superficie ha disminuido hasta las 951.693 ha en 2013. En todo caso, representa casi el 30% de la superficie total de la UE (seguida por Francia con el 23%, y de Italia con el 22%) y un 13,4 % del total mundial. Su tradición elaboradora de vinos se remonta a la época de los romanos, aunque no ha sido hasta más recientemente cuando la exportación se ha convertido en un hecho masivo y generalizado en el sector.

#### **2.2.2.1.1. Superficie cultivada.**

La situación geográfica, las diferencias climáticas y la variedad de suelos, hace de la Península Ibérica y nuestras islas un lugar privilegiado para la producción de vinos de características muy distintas. Se cultiva viñedo en la totalidad de las 17 Comunidades Autónomas en las que se divide el país, si bien en 2013, como se puede observar en la Figura 2.5., cerca de la mitad de la extensión total se encuentra en Castilla-La Mancha (463.639 ha y el 48,7 % del viñedo plantado), la zona geográfica con mayor extensión del mundo dedicada a su cultivo, seguida de Extremadura (84.096 ha, 8,8 %), Valencia (67.994 ha), Castilla y León (63.468 ha), Cataluña, La Rioja, Aragón, Murcia y Andalucía. En todo caso, se trata de superficies de viñedo que siguen en descenso.



**Figura 2.5.** Extensión total (%) sobre el viñedo plantado de las Comunidades autónomas 2013. Fuente: OIV; elaboración OEMV.

La superficie total de viñedo en nuestro país en 2013 se sitúa en las 951.693 hectáreas, frente a las 954.020 ha del año anterior. Por tanto, se observa una ligera caída de 2.397 ha (-0,2%). Las mayores caídas porcentuales las ofrecen Andalucía (-7,4%), Murcia (-6,1%) y Madrid (-5,1%); siendo La Rioja (+1,1%) y Canarias (+3,3%) las únicas comunidades autónomas que incrementan la superficie de viñedo en 2012, mientras que Cantabria la mantuvo estable.

España cuenta con 90 zonas de producción de vinos de calidad con DOP, de ellas 67 son con Denominación de Origen, 2 con Denominación de Origen Calificada, 7 son Vinos de Calidad con Indicación Geográfica y 14 son Vinos de Pago, las cuales, siguiendo el modelo europeo de producción, mantienen un estricto control sobre la cantidad producida, las prácticas enológicas, y la calidad de los vinos que se producen en cada zona. Las primeras Denominaciones autorizadas se aprobaron en 1932, y se trata de Jerez-Xères-Sherry, Manzanilla de Sanlúcar de Barrameda, Málaga, Montilla-Moriles, Rioja, Tarragona, Priorato, Alella, Utiel, Requena, Valencia, Alicante, Ribeiro, Cariñena, Penedés, Condado de Huelva, Valdepeñas, La Mancha, Navarra y Rueda. El 51,1% de la producción está destinada a la elaboración de vinos tintos y rosados y el 48,9%, vinos blancos (MAGRAMA, 2009).

Las variedades de uva más comunes en España son la Airén (23,5%), Tempranillo (20,9%), Bobal (7,5%), Garnacha Tinta, Monastrell, Pardina, Macabeo y

Palomino, por orden de importancia en cuanto a su cultivo. De estas variedades, son tintas, la Tempranillo, Bobal, Garnacha Tinta y Monastrell y blancas las restantes. Sin embargo, el consumo interno de vino en España sigue ofreciendo unos datos bastantes bajos, situándose a día de hoy en una estimación inferior a los 20 litros por persona y año, lo que supone estar a la cola de los países europeos.

#### **2.2.2.1.2. Producción de vino.**

Tras siete campañas de relativa estabilidad, rondando un volumen de producción de vino y mosto de en torno a los 40 millones de hectolitros, en la campaña 2013/2014 (MAGRAMA, 2015), la producción supera los 52 millones de hl, frente a los 34,2 millones de la campaña 2012/13, lo que supone un importante aumento y la cifra más elevada históricamente.

En cuanto al reparto geográfico, para esa campaña, Castilla-La Mancha sigue siendo la principal región productora con el 62,2% de la producción total española y un espectacular aumento respecto a la campaña anterior, habiendo producido 32,7 millones de hl de vino y mosto, lo que supone casi el total de lo producido en la campaña 2012/2013 en toda España.

Extremadura, segunda comunidad productora, aunque muy lejos de Castilla-La Mancha, produce 4,2 millones de hl que suponen un aumento del 32,2%. Cataluña, tercera productora con 3,7 millones de hl, registra un aumento del 32,3% y la Comunidad Valenciana, cuarta del ranking, se acerca a los 3 millones de hl, registrando un aumento del 40,3%. Otras comunidades con aumento destacado de su producción en la campaña 2013/2014 son: Andalucía (+58%), Castilla y León (+21,1%) y Murcia (+32,7%). Durante la última campaña 2013/14, sólo dos comunidades reducen su producción: Cantabria, con muy poco peso dentro del total y La Rioja. En este caso, la disminución fue del -4,5%.

#### **2.2.3. EXPORTACIÓN DE VINO.**

El comercio internacional en el sector del vino adquiere cada vez más importancia. De un total de 72,2 millones de hl de media en el quinquenio 2001-05, se ha pasado a 98,5 millones de hl en el interanual a junio de 2013, según estimaciones

de la OIV. La valoración del importe global de las exportaciones de vino y mosto habría alcanzado en el año 2013 la cifra de 25.767,1 millones de euros para un volumen de 98,6 millones de hl. Este mercado mundial, considerado por la OIV como la suma de las exportaciones de todos los países, ha crecido significativamente en términos de valor, suponiendo un 1,4% más que en 2012. No obstante, el volumen se ha reducido un 2,3% respecto a 2012, con una pérdida de 2,3 millones de hl en un año.

En 2012, las exportaciones mundiales de vino representaron aproximadamente el 40,4% del consumo mundial (contra un 34,6% en 2006). De donde se deduce que una tendencia estable a lo largo de los últimos años es el crecimiento constante de lo que los intercambios internacionales representan dentro del consumo mundial, señal que las caídas del consumo en los países tradicionalmente productores se está viendo compensada por el incremento en países cuyas necesidades de vino superan a su propia producción y se ven obligados, por lo tanto, a importarlo.

Siguiendo con los datos de la OIV para el año 2013, España es el segundo proveedor mundial de vino y mosto en términos de volumen y el tercero en términos de valor, con 17,7 millones de hectolitros y 2.498 millones de euros respectivamente. El precio medio del vino español en el exterior se fijó en los 1,41 euros por litro, y sigue siendo muy inferior al del resto de principales países proveedores, a pesar de haber subido en 2013 un 22,1%.

Las exportaciones mundiales de vino, en términos de volumen, están lideradas por Italia, primer proveedor con 20,4 millones de hl vendidos en 2013. Sin embargo, Francia vuelve a ser el principal exportador en valor de forma clara, con 7.858 millones de euros de facturación, seguido de lejos por los 5.038,6 millones ingresados por Italia. Francia aún se encuentra, con 14,6 millones de hl, muy lejos de Italia y España en volumen, lo que indica un precio medio de venta muy superior para el país galo. En 2013, se situó en los 5,40 euros por litro, y fue claramente el más elevado entre los doce principales proveedores mundiales. La diferencia es aún mayor si lo comparamos con los precios medios de sus principales competidores, Italia (2,46 €/l.) y España (1,41 €/l.). La suma de Italia, España y Francia representó en 2013 aproximadamente el 53,4% del volumen y el 59,7% del valor total de vino y mosto exportado a nivel mundial.

Respecto a otros proveedores, Chile sustituye a Australia como cuarto exportador mundial de vino en volumen con 8,8 millones de hl (+17,6%) y también como cuarto exportador en valor, con una subida del 1,6% hasta alcanzar los 1.422,4 millones de euros en el año 2013. Encontramos a Australia en el quinto puesto, tanto en volumen con 7,1 millones de hl y caída del 3,2%, como en valor con 1.339,4 millones de euros y caída del 12,1%. En 2013, Alemania se suma a la lista de 7 países cuyas exportaciones de vino superaron los 1.000 millones de euros de facturación. El país germano ocupa el séptimo puesto en valor, gracias a una subida del 1,8% hasta sobrepasar los 1.000 millones de euros. En cuanto a Estados Unidos, ocupa el sexto puesto en términos de valor, con crecimiento del 9% hasta los 1.174,4 millones de euros, mientras que en volumen ocupa la octava posición con 4,1 millones de hl y aumento del 3,5%. En términos de volumen, a las ya comentadas caídas de Italia, España, Francia y Australia, se suman las de Portugal (-9,3%) y Argentina (-13,5%).

Las exportaciones españolas de vino cierran el año 2013 con un buen crecimiento en términos de valor, aumentando un 6,5% hasta los 2.628 millones de euros que suponen 161 millones más que los facturados en 2012 y 882 millones más que en 2009 cuando, tras la fuerte crisis mundial iniciada ese año, empezó la masiva y más reciente internacionalización del vino español. Estos 2.628 millones de euros facturados suponen un récord histórico para las exportaciones españolas de vino. En términos de volumen, se produce una caída del 10,9%, hasta los 18,5 millones de hl, frente a los 20,7 millones de 2012. En 2013 se exporta, por tanto, menos vino pero con un mejor precio medio que se sitúa en 1,42 euros por litro, un 19,5% más elevado que en 2012, por el freno de las ventas de los vinos más económicos, que subieron notablemente de precio, unido a la buena marcha de los vinos con DOP, con un precio muy superior a la media. Esto supone un aumento de 23 céntimos de euro con respecto a 2012.

### **2.3. VARIEDADES DE UVAS DE VINIFICACIÓN.**

No todas las variedades tienen la misma vocación vitícola. Como consecuencia de las características morfológicas de los racimos y de las bayas, como por ejemplo la compacidad, el grosor y la forma de las bayas, el espesor del hollejo, la consistencia de la pulpa, el número de pepitas, y en función del destino de las uvas, se distinguen varias categorías de variedades:

- Las variedades de uvas de vinificación: Garnacha, Tempranillo, Monastrell, Graciano, Merlot, Syrah, Cabernet Sauvignon, Chardonnay, etc.
- Las variedades de uvas de mesa, de racimos sueltos con bayas bastante gruesas, pulpa crujiente y piel resistente: Darrier de Beyrouth, Cardinal, etc.
- Las variedades destinadas a la pasificación, de bayas generalmente apirenas (sin pepita) y pulpa bastante consistente: Sultanina (B), Corinto (N), Perlette, aunque a veces se usen de bayas con semillas como Moscatel de Alejandría y Rosaki.

Las variedades de uvas tintas más representativas de la Región de Murcia y La Rioja (de donde son nuestras variedades estudiadas) son: Monastrell, Cabernet Sauvignon, Garnacha Tintorera, Merlot, Petit Verdot, Syrah, Graciano, Mazuela, Pinot Noir y Tempranillo (Reynier, 2002).

De las diversas variedades de uva utilizadas en las diferentes Denominación de Origen (D.O.) españolas, se ha elegido para los ensayos de laboratorio Monastrell, característica de la Región de Murcia; y para los ensayos de campo Tempranillo y Graciano, como más representativas de la D.O. Rioja.

### **2.3.1. VITIS VINIFERA VAR. MONASTRELL.**

Monastrell es una variedad de origen español conocida también como Gallata (Murcia), Garrut (Tarragona y Zaragoza), Morastrell (Albacete y Valencia), Verema Blanca y Murviedro (Valencia), Mourvedre (Francia), Ros, Reina, Veremeta, Churret, Mataró y Negrelejo (Díaz- Plaza, 2004).

Se piensa que su procedencia es El Camp de Morvedre, Sagunto (Valencia), del cual se tienen abundantes referencias históricas. Aparece documentada desde el siglo XV, aunque su utilización para elaborar vinos data de muchas generaciones anteriores a esta fecha.

Esta variedad se extendería desde el entorno de Sagunto hacia Francia para instalarse en el Languedoc-Rousellón y Provenza. Es más, diversos especialistas sostienen la teoría según la cual la Mourvedre francesa habría derivado de la



Monastrell, algo lógico si se piensa que hasta principios del siglo XX todavía se conocía con ese nombre en la zona de Sagunto, antes de que la filoxera obligara a sustituir la vid por el naranjo. De hecho, el ampelógrafo francés Pierre Galet identificaba ambas variedades, por lo que se puede considerar que se trate de la misma cepa (Hidalgo, 2003) (Figura 2.6.).



**Figura 2.6.** *Racimo de Monastrell.*

Con una fuerte presencia en Murcia y Alicante, está considerada la variedad principal en las Denominaciones de Origen de Jumilla, Yecla, Almansa, Alicante, Bullas, Benissalem, Cariñena, La Mancha, Costers del Segre, Penedés, Plá del Bages y Valencia. A nivel mundial y junto a su homónima francesa Mourvedre, ocupa el décimo primer puesto en cuanto a superficie cultivada (Girón, 2012). En España es la quinta variedad en extensión, y en Jumilla representa en torno al 80% de las variedades tintas de cultivo, según los "Datos de las Denominaciones de Origen Protegidas 2012-2013" (MAGRAMA, 2014a).

#### Requerimientos edafoclimáticos.

Es una variedad de gran rusticidad y elevada resistencia a la sequía, que necesita una buena insolación. De hecho, está totalmente adaptada a las condiciones climáticas y edáficas de la zona de Jumilla, es capaz de aguantar sin problemas las diferencias extremas de temperaturas, los veranos calurosos y secos, en los que ralentiza su desarrollo y disminuye su producción (Pardo, 1996).

#### Propiedades.

La variedad Monastrell se caracteriza por su alto valor oxidativo. Los vinos que se elaboran con esta variedad son muy diversos, se pueden obtener vinos rosados y tintos jóvenes, vinos de escasa crianza, así como los clásicos vinos de alto grado, secos

generosos y dulces naturales. El problema de estos vinos, es que evolucionan de forma rápida. Por ello en los últimos años se ha ido cambiando la forma tradicional de elaborar y criar vinos, por una parte, buscando la optimización de los procesos de extracción de compuestos fenólicos, en especial taninos, en los que esta variedad no es muy rica, y por otra, mejorando los procesos de conservación y crianza, con ello se pretende conseguir la obtención de vinos de crianza y reserva con una evolución menos rápida y de mayor calidad (Pardo, 1996; Díaz- Plaza, 2004; Apolinar-Valiente et al., 2015).

### **2.3.2. VITIS VINIFERA VAR. TEMPRANILLO.**

Se trata de la variedad tinta española de mayor calidad y fama, siendo originaria de la zona alta del Ebro entre La Rioja y Navarra. Se estima que podría haber surgido en el último milenio, siendo sus progenitores las variedades Albillo Mayor y Benedicto. Es la uva tinta más extendida en España con un 20% de la superficie total de viñedo (Ibañez et al., 2012). Es cultivada en la actualidad por el resto de las zonas vitícolas de la península, bajo las sinonímias de Ull de llebre en Cataluña, Cencibel en La Mancha, Escobera o Chinchillana en Extremadura, Tinta del País en Castilla-León, Tinto Fino en Madrid, Tinta Roriz en el Alto Douro portugués, así como también en lugares más lejanos como en Argentina, Australia, e incluso California bajo el nombre de Valdepeñas (Figura 2.7).



**Figura 2.7.** *Racimo de Tempranillo.*

#### Requerimientos edafoclimáticos.

Respecto a su comportamiento agronómico, es muy segura en el cuajado, poco resistente a la sequía y a temperaturas altas y, como su propio nombre indica, es "uva

temprana" con ciclo corto de maduración. Necesita terrenos de fondo, no muy sueltos, de consistencia media y que tengan buena capacidad de retención de agua. Prefiere terrenos bien orientados a la iluminación y al viento, obteniendo mejores rendimientos en laderas que en terrenos bajos o vaguadas.

#### Propiedades.

El nombre de Tempranillo procede de su maduración temprana, produciendo cuando está bien cultivada unos vinos tintos de importante carga polifenólica y un inconfundible aroma a frutos negros y regaliz, siendo muy adecuados para su crianza. Las técnicas de cultivo con producciones razonables y la elección del clon adecuado, son las claves para obtener un excelente vino tinto. La variedad Tinta de Toro parece ser un clon de la Tempranillo, contando con una mayor riqueza en compuestos fenólicos, aunque algunos ampelógrafos la citan como vinífera independiente (Díaz-Plaza, 2004).

### **2.3.3 VITIS VINIFERA VAR. GRACIANO.**

Variedad tinta de origen riojano donde su cultivo se recupera en los últimos años. Se presenta como una variedad con brotación tardía, floración en época normal (primera decena de junio), envero tardío (en la segunda decena de agosto) y maduración tardía (primera quincena de octubre). En definitiva, es una variedad de desborre tardío y de ciclo largo (Figura 2.8.) (Aguirrezabal, 2002).



**Figura 2.8.** *Racimo de Graciano.*

A pesar de sus excelencias para los "coupages", es poca la cantidad de viñas existente en el marco varietal de España (el 0,02 %), concentrándose el 23,4 % de

ella en La Rioja y el 31,4 % en Navarra. Su implantación en Navarra es antigua aunque siempre ha representado una superficie muy pequeña, poco más del 1% del viñedo y 200 hectáreas, estando implantada principalmente en las Riberas Alta y Baja.

#### Requerimientos edafoclimáticos.

Necesita climas suaves con terrenos arcillosos, calizos y frescos. Es muy sensible a la sequía. Tiene una adaptación difícil y en climas adversos se desfolia fácilmente a final del ciclo.

#### Propiedades.

Los vinos son de colores muy intensos, por la gran concentración de materia colorante, de acidez elevada y con mucho cuerpo (abundante tanino). Es preciso que se den las condiciones climáticas adecuadas para que su maduración sea óptima, situación que suele producirse en grandes añadas. Se suele utilizar para complementar otras variedades (en "coupages") aunque también para elaborar vinos monovarietales.

## **2.4. VINIFICACIÓN TRADICIONAL EN TINTO.**

Desde el siglo XVIII se conoce la vinificación en tinto tradicional tal y como se desarrolla en la actualidad, es decir, con separación de racimos, estrujado, despalillado, maceración, prensado, fermentación, trasiego, clarificación y filtración. Esto la convierte en una técnica relativamente antigua y a la vez adaptada a la actualidad, pues desde hace más de doscientos años se ha venido realizando de forma dinámica, adaptándose y evolucionando en torno a un objetivo claro: proteger los componentes más deseables del mosto de cara a producir el mejor vino posible (Díaz, 1991; Delgado, 1998; Girón, 2012).

El vino tinto tradicional es un vino de maceración, ya que la fermentación alcohólica del mosto está acompañada de la disolución de los componentes de las partes sólidas de la uva, orujos y semillas. La maceración, por tanto, es la característica esencial de los vinos tintos, que los diferencia entre ellos, y de otros tipos de vino. Las sustancias colorantes, los taninos y los aromas de la uva se encuentran

principalmente en la parte interna de la piel, en la pulpa hay muy poca cantidad, de modo que los orujos no aportan solamente los pigmentos responsables del color, sino muchos otros compuestos que contribuyen al sabor, al aroma y a la estructura que les confiere unas características organolépticas propias (Pardo, 1996; Casassa y Harbertson, 2014; Petropulos et al., 2014).

Otro aspecto importante de este tipo de vinificación es la fermentación maloláctica. No hay duda de que una acidez total elevada confiere al vino una mayor resistencia al desarrollo de bacterias, y por lo tanto disminuye el riesgo de un aumento de acidez volátil, más grave para la calidad que una acidez total alta. Pero es evidente que la calidad gustativa de un vino tinto implica una acidez fija relativamente débil, por lo que, en aquellas regiones (menos soleadas) en las que el contenido en ácido málico es muy alto en uvas y, por tanto, en los vinos que se elaboran a partir de ellas, la fermentación maloláctica se hace más que necesaria. De este modo, la concentración de ácido málico se reduce como consecuencia de su transformación en ácido láctico por acción de bacterias, generando una mejora gustativa de los vinos, no sólo porque su acidez disminuye sino también porque se sustituye un ácido de sabor muy pronunciado, el málico, por otro menos agresivo, el láctico. En zonas muy soleadas, los niveles de este ácido son generalmente bajos, por lo que este fenómeno no suele producirse. Además, como la acidez de las uvas es relativamente baja, este tipo de fermentación estropearía los vinos resultantes, provocando pérdidas de color y aromas y, en general, disminución de la calidad organoléptica del producto (Pardo, 1996; Blouin, 2003; Izquierdo et al., 2008; Antalick et al., 2012; Ruíz et al., 2012; Benito et al., 2015).

La elaboración de vino tinto comienza con el estrujado de la uva, que normalmente va acompañado del despalillado del racimo, para evitar que comunique al mosto sabores leñosos, a verde, que rebajan la calidad del vino futuro. Una vez la vendimia ha sido estrujada y despalillada se transporta a los depósitos de fermentación (encubado), para que ésta se produzca en presencia de los orujos, facilitándose mediante la maceración la difusión en el mosto de la materia colorante presente en los hollejos. Antes que la fermentación alcohólica se inicie, se realiza el sulfitado para proteger la masa estrujada de posibles oxidaciones y también para eliminar del medio fermentativo bacterias y levaduras perjudiciales (Fernández, 2004; Koch et al., 2010; Nardi et al., 2010; Abramovic, 2015).

Durante la maceración, normalmente una o dos veces al día, se toman de uno a dos volúmenes de mosto de la base del fermentador y se bombean sobre la parte más alta, bien pulverizando o rociando el sombrero (remontado o bazuqueo), con el fin de que el caldo del fondo del depósito acceda a los hollejos del sombrero para mejorar la extracción del color y de los componentes del aroma y gusto (homogeneización), así como enfriar el sombrero (Boulton et al., 2002).

Posteriormente el vino se trasiega del depósito de fermentación (descube), separándose de los hollejos, que se presan obteniéndose el llamado mosto-vino prensa, de inferior calidad al mosto-vino flor recogido directamente en el descube. En el depósito nuevo, el vino termina la fermentación alcohólica (si el descube se ha realizado antes de que ésta acabe) e inicia la fermentación maloláctica si la concentración de málico es elevada (Piao et al., 2015).

Acabado este proceso, se efectúan los trasiegos pertinentes y el vino es sometido a tratamientos que varían según el destino que vaya a tener. Si se desea un vino de consumo corriente (el descube se ha llevado a cabo antes de finalizar la fermentación alcohólica), éste se clarifica y se filtra, para conservar la limpidez del producto una vez embotellado. Si lo que se busca es un vino destinado a la crianza y al envejecimiento (el descube se ha realizado varios días después de finalizada la fermentación alcohólica) éste se traslada a barricas de madera, en las que permanece meses o años, dependiendo de si se desea un crianza, un reserva o un gran reserva (Fernández, 2004).

## **2.5. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS VINOS.**

Las cualidades organolépticas de un vino pueden ser consideradas como el resultado de una serie de equilibrios entre las sustancias aromáticas y los elementos sápidos que rigen la armonía del olor y el sabor.

La calidad es el conjunto de propiedades y características de un producto que le confieren su capacidad de satisfacer necesidades implícitas o explícitas (FAO, 2004). Así, al hablar de la calidad intrínseca de un vino, es estrictamente necesario concretar el tipo de vino, y una vez fijado esto, aún es indispensable especificar el tipo de calidad

al que se hará referencia: calidad sensorial, nutricional, global, etc. Cada una de ellas está asociada directa o indirectamente a una serie de parámetros enológicos y a la composición final del vino, que determinará sus peculiaridades sensoriales. También se puede hablar de calidad extrínseca, las exigencias en esta materia son crecientes y esto es debido a numerosas causas: existe una competencia muy fuerte, el consumidor cambia de exigencias, se introducen normas de aseguramiento de la calidad (Díaz-Plaza, 2004).

Desde hace decenas de años la determinación de parámetros de calidad tales como densidad y grado alcohólico, acidez total y volátil, pH, niveles de sulfuroso (total y libre) e intensidad colorante y tono, constituyen el trabajo habitual de todos los laboratorios de enología. Los métodos de análisis son bien conocidos, y han sido probados a lo largo del tiempo, convirtiéndose en oficiales a nivel nacional e internacional (Bautista-Ortín et al., 2003; Fernández, 2004).

La densidad es la primera determinación que se realiza cuando se recibe la vendimia. Su seguimiento permite controlar el inicio, desarrollo (velocidad) y final de la fermentación, e incluso posibles anomalías en su transcurso (Navarro et al., 1990), siendo su valor inicial indicativo del grado final de alcohol que puede alcanzar el vino, aunque éste depende a su vez de la especie de levadura implicada en la fase de fermentación. Así, levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, de alto poder alcohólico, pueden llegar a los 17° en vinos que se elaboran en regiones vitivinícolas como Jumilla. Estudios recientes, muestran que dependiendo de las variedades de levaduras el perfil aromático de los vinos varía (Crandles et al., 2015; Synos et al., 2015). Ello puede ser debido a que cada tipo de levadura libera una cantidad distinta de polisacáridos. Y una mayor cantidad de polisacáridos, provoca una reducción en la mayoría de los compuestos fenólicos (Del Barrio-Galán et al., 2015; Moreno-García et al., 2015). Debido a que las preferencias de los consumidores de vino están cambiando rápidamente hacia aromas y sabores exóticos, se están llevando a cabo distintos estudios, en los que se buscan cepas de levaduras que proporcionen a los vinos un perfil aromático distinto (Dashko et al., 2015).

La acidez engloba cuatro características principales: los propios ácidos, la cuantía de su disociación, la acidez valorable resultante y el pH. Desde el punto de vista gustativo son el pH y la acidez total (valorable) los que juegan un papel

primordial, mientras que la composición en ácidos orgánicos (Cedrón, 2004) queda relegada a un plano más secundario.

El pH condiciona la estabilidad del producto e influye sobre la calidad del mismo. De este parámetro dependen: la capacidad de la mayor parte de las bacterias para desarrollarse, la solubilidad de las sales tartáricas, la eficacia de las adiciones de dióxido de azufre y enzimas, la solubilidad de las proteínas así como las reacciones de oxidación y pardeamiento (Boulton et al., 2002; Czibulya et al., 2015; Liu et al., 2015). Valores más altos de pH incrementan la formación de glicerol y de aromas herbáceos en el vino durante la fermentación, además de favorecer el desarrollo de bacterias lácticas que resultan dañinas en esta fase (Cabanis, 2000).

Además, el aporte de ácido acético procedente de la fermentación, da un sabor agrio, siendo el principal constituyente de la acidez volátil, aparte de un indicador del estado de alteración del vino (Fernández, 2004; Pinto et al., 2015). Cualquier desarrollo microbiano que se produzca, deseable o no, supone un aumento en los niveles de este parámetro. Por tanto, da información acerca de la estabilidad del producto, debiendo encontrarse por debajo de 1 g/l (expresado en ácido acético). Valores superiores son consecuencia de alguna alteración microbiana, una mala vinificación o una conservación defectuosa (Pardo, 1995; Trcek et al., 2015).

La determinación de las concentraciones de dióxido de azufre se hace más que necesaria de cara al mantenimiento del vino, y que dicho agente puede influir de forma negativa en los caracteres olfativos y gustativos del producto acabado si no ha sido empleado racionalmente durante el proceso de elaboración. El sulfitado actúa como germicida, antioxidante e inhibidor de enzimas, aunque pierde su efectividad durante la fermentación, a medida que se combina con el acetaldehído y otros constituyentes (Fernández, 2004; García-Guzmán et al., 2015).

No obstante, si se aplica en dosis elevadas, retrasa o impide la fermentación maloláctica cuando ésta es favorable y, por lo tanto, conduce a vinos con una acidez fija (acidez total-acidez volátil) demasiado elevada, además de sabores desagradables. Por otro lado, si la dosis es insuficiente, el mosto no queda protegido frente a la actividad de bacterias y levaduras perjudiciales, además de producirse oxidaciones de compuestos fenólicos y ácidos grasos, hechos muy desfavorables para la calidad del



vino. Las dosis empleadas deben tener en cuenta múltiples factores; el grado de madurez y el estado sanitario de la vendimia, su temperatura, su riqueza en azúcar y, sobre todo, su acidez. En definitiva, el éxito del sulfitado de la vendimia y de la conservación de los vinos es, ante todo, una cuestión de las dosis utilizadas de anhídrido sulfuroso.

Finalmente, en lo referente a parámetros del color: intensidad colorante y tono; cabe señalar que son los menos controlados durante el proceso de vinificación. Su análisis se lleva a cabo en el vino terminado, y tras un tiempo de conservación, pues se trata de una propiedad que se modifica durante el envejecimiento del producto.

Los principales responsables del color son los compuestos fenólicos procedentes del hollejo y pepitas de las uvas y raspones de los racimos. Se subdividen en no flavonoides: ácidos fenólicos y estilbenos; y en flavonoides: antocianos, flavanos 3-oles y flavonoles, descartando los flavanones y flavonas ya que sólo han sido identificadas en el hollejo de uvas blancas. Su mayor o menor presencia en los vinos dependerá de aspectos como el grado de madurez de las uvas, el tiempo de maceración y la temperatura a la que ésta se realiza (Flanzy, 2000; Fernández, 2004; Doshi et al., 2015).

Principalmente, los cambios de color que experimentan los vinos jóvenes tintos durante la conservación y el envejecimiento, son causa de la desaparición progresiva de antocianos libres, responsables del color rojo violáceo, y del consecuente aumento de complejos antocianos-taninos, que confieren tonalidades anaranjadas en los vinos viejos (Martínez-Sandoval et al., 2015). Además también participan de este proceso la oxidación de ortodifenoles a formas quinónicas y la formación de estructuras muy complejas de taninos de elevado peso molecular, a partir de procianidinas, polisacáridos y péptidos (Santos y Rivas, 1994; Hidalgo, 2010).

## **2.6. COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LA UVA Y LOS VINOS.**

Los constituyentes fenólicos revisten una gran importancia en enología debido al papel que juegan directamente o indirectamente sobre la calidad de los vinos. En efecto, son el origen del color y de la astringencia, siendo atribuida esta última en

particular a la presencia de taninos (Hogan et al., 2009; Li et al., 2009; Liang et al., 2012; Meng et al., 2012 y 2013; Ma et al., 2014). Además, según su naturaleza, pueden tener un interés nutricional y farmacológico (Daglia et al., 2014; Mazué et al., 2014; Sancho & Mach, 2014; Albertoni y Schor, 2015; Boydens et al. 2015; Calabriso et al., 2015; Gormaz et al. 2015).

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos se caracterizan por un núcleo bencénico que lleva uno o varios grupos hidroxilos. Su clasificación está basada sobre la distinción entre compuestos no flavonoides y flavonoides. Estos últimos tienen un esqueleto en C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Los polifenoles incluyen también a los derivados (ésteres, metil ésteres, glicósidos, etc.) que resultan de las sustituciones de la estructura de base. La reactividad de este tipo de molécula es debida tanto a la presencia de la función fenol que, por la movilidad de su átomo de hidrógeno, presenta un carácter ácido, como al núcleo bencénico que puede sufrir sustituciones electrófilas (Fanzone et al., 2012; Flamini et al., 2013).

La uva contiene esencialmente compuestos no flavonoides en la pulpa y flavonoides en los hollejos, semillas y los raspones. De esta manera, la transformación tecnológica adoptada condiciona la extracción de los polifenoles a partir de las diferentes partes del racimo y de las reacciones posteriores de estas moléculas, contribuyendo así de manera esencial a la composición polifenólica de los vinos. Un conocimiento profundo de las diversas estructuras polifenólicas presentes en la uva y de los mecanismos de su evolución durante el transcurso de la vinificación es una base indispensable en la evaluación de su papel en enología y en el desarrollo de los procesos tecnológicos adaptados a la vez a la materia prima y al tipo de producto deseado (Doshi et al., 2015). De la misma manera, las investigaciones vitícolas pueden sacar partido de los avances en este dominio científico complejo que es la química estructural de las sustancias fenólicas, en sus trabajos hacia la creación de nuevas variedades o la optimización de las prácticas culturales por ejemplo (Cacho et al., 1992; Flanzy, 2000).

La comparación de la composición fenólica de la uva y del vino muestra que junto a las moléculas directamente procedentes de la baya, aparecen en el vino otros fenoles. Estos constituyentes específicos del vino comprenden en particular los compuestos procedentes de las etapas fermentativas, pero también numerosos

productos resultantes de la evolución de los polifenoles nativos de la baya de la uva (García-Estévez et al., 2015; Ivanova-Petropulos et al., 2015; Lima et al., 2015; Vilanova et al., 2015). Durante la vinificación y el envejecimiento, los polifenoles participan en diversos tipos de reacciones, dando lugar a una multiplicidad de estructuras nuevas. Además, en los vinos que han permanecido en bodega, se constata la presencia de sustancias extraídas de la madera utilizada durante la crianza (Flanzy, 2000).

Los procesos de vinificación conducen a medios (mosto, vino) en continua evolución. Así, la composición fenólica del vino depende a la vez de la materia prima (González et al., 2015) y del tipo de vinificación adoptado, que influye por una parte sobre fenómenos físicos como la difusión de compuestos desde las partes sólidas hacia mostos, o la extracción de compuestos de los toneles; y por otra parte, influye sobre los fenómenos bioquímicos y químicos en los cuales están implicados los polifenoles (oxidación, degradación, condensación) (Lima et al., 2015; Toaldo et al., 2015).

Finalmente debemos señalar que las características organolépticas en general y los compuestos fenólicos en particular, pueden verse afectados por los ataques fúngicos, pudiendo producir un deterioro en el color y los aromas de los vinos, que dan como resultado aromas terrosos, mohosos, a hojas verdes, entre otros. Por ello es importante conocer cómo se desarrollan estas enfermedades para controlarlas (Cologrande et al., 1988; Flanzy, 2000; Casassa y Harbertson, 2014).

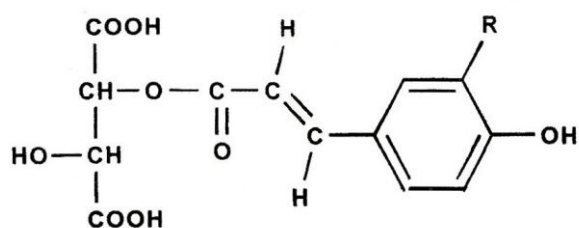
### **2.6.1. COMPUESTOS NO FLAVONOIDES.**

Esta denominación abarca a los ácidos fenoles, divididos en ácidos benzóicos ( $C_6-C_1$ ) y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada ( $C_6-C_3$ ), pero también a otros derivados fenólicos como los estilbenos (Flanzy, 2000).

#### **2.6.1.1. Ácidos fenoles.**

En la uva, los ácidos fenoles son principalmente ácidos hidroxicinámicos que se encuentran en las vacuolas de las células del hollejo y de la pulpa, bajo forma de ésteres tartáricos. Estos son los ácidos cafeoil tartárico (caftárico), p-cumaroil tartárico (cutárico) y feruloil tartárico (fertárico). La forma natural es la trans (E) pero los

isómeros cis (Z), largo tiempo confundidos con los derivados glucosilados, también existen aunque en débil cantidad (Figura 2.9) (Schopp et al., 2013).

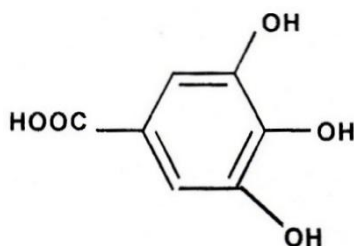


**Figura 2.9.** Ésteres hidroxicinámicos de la uva.

Además, los ácidos hidroxicinámicos, concretamente los ácidos p-cumárico y caféico, están muy implicados en la acilación de los sustitutos glucósidos de los antocianos.

La presencia de los ésteres tartáricos y la ausencia de ésteres quínicos (ácido clorogénico por ejemplo) son una de las especificidades del género *Vitis* si se compara con la mayor parte de las demás frutas. El análisis comparado de los contenidos en ésteres hidroxicinámicos muestra concentraciones en el producto fresco más elevadas en el hollejo que en la pulpa (de 2 a 100 veces más según la cepa). En el hollejo, las concentraciones varían de 0,06 a 0,78 mg/g de hollejo, para el ácido caftárico, y de 0 a 0,3 mg/g para el ácido cutárico, y el ácido fertárico que se presenta en débil cantidad (< 0,06 mg/g). El potencial hidroxicinámico varía según las cepas en el género *Vitis*. La concentración de los ésteres hidroxicinámicos disminuye durante el desarrollo de la baya y se estabiliza en la madurez enológica. Además, el porcentaje de estos compuestos puede servir de criterio taxonómico (Hall y De Luca, 2007; Hixson et al., 2012).

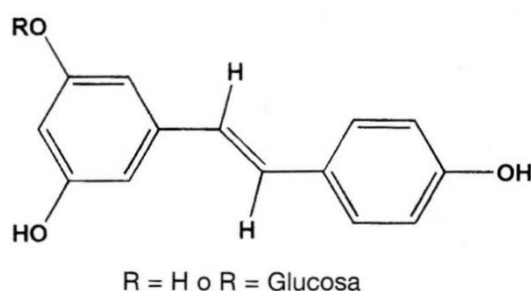
En lo que concierne a los ácidos benzóicos, la uva contiene principalmente ácido gálico (Figura 2.10), presente bajo forma de éster de flavonoles.



**Figura 2.10.** Estructura del ácido gálico.

### 2.6.1.2. Estilbenos.

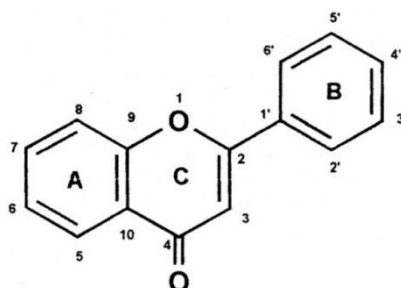
Es de destacar la presencia en la uva de otros compuestos fenólicos (Figura 2.11) como el resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) bajo forma *trans* y de su derivado glucosilado. Este compuesto juega un cierto papel en la resistencia de ciertas bayas de uva a los ataques fúngicos (Waterhouse y Lamuela-Raventós, 1994; Hall y De Luca, 2007; Graziano et al., 2015; Bastianetto et al., 2015).



**Figura 2.11.** *Estilbenos de la uva.*

### 2.6.2. FLAVONOIDES.

Los flavonoides están caracterizados por un esqueleto de base de 15 átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ) de tipo 2-fenil benzopirona (Figura 2.12). Esta gran familia se divide en varias subclases que se distinguen por el grado de oxidación de su núcleo pirano.



**Figura 2.12.** *Fenil Benzopirona.*

Los flavonoides en sentido estricto, basados en la estructura fenil-2-benzopirona, están principalmente representados en la uva por los flavonoles, mientras que los flavonoides en sentido amplio comprenden igualmente los antocianos y los flavanos 3-ol (3-flavonoles). Se encuentran también en la uva otros grupos de menos importancia, como los dihidroflavonoles (flavanonoles), y, en las hojas, las flavonas

(Flanzy, 2000; Kuskoski et al., 2004; Pascual-Teresa et al., 2010; Figueiredo-González et al., 2012).

### **2.6.2.1. Antocianos.**

Los antocianos representan una parte importante tanto a nivel cualitativo como cuantitativo de los flavonoides de la baya de uva tinta. Localizados en el hollejo y en las 3 ó 4 primeras capas celulares del hipodermo, contribuyen de manera preponderante al color de las especie tintas. Estos pigmentos son también encontrados en el seno de la pulpa en las cepas tintoreras (Flanzy, 2000; Pascual-Teresa y Sánchez-Ballesta, 2008; Castañeda-Ovando et al., 2009).

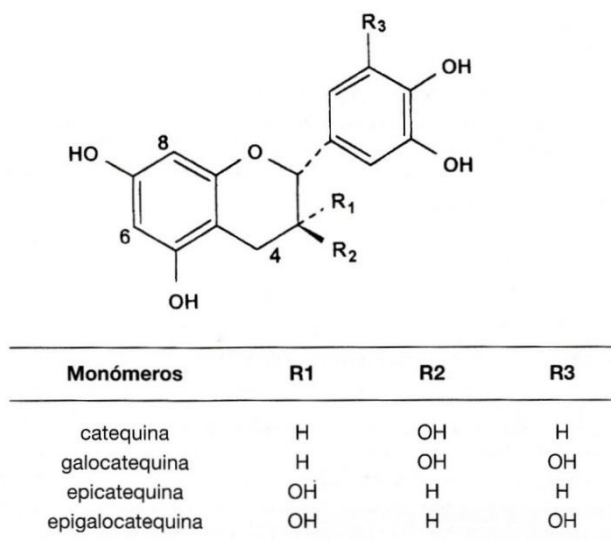
Los antocianos se diferencian por sus niveles de hidroxilación y de metilación, por la naturaleza, el número y la posición de las osas unidas a la molécula, y también por la naturaleza y el número de los ácidos que esterifican los azúcares, la variabilidad creada por esta diversidad de estructuras y la coexistencia de estas diferentes moléculas en el seno de una misma planta permite discriminar género y especie. Los antocianidoles del género *Vitis* son el cianidol, el peonidol, el petunidol, el delfinidol y el malvidol, pero el contenido y la composición en antocianos en la uva varían enormemente en función de la especie y de la variedad (Mazza y Miniati, 1993; Castillo-Muñoz et al. 2009; He et al., 2010).

### **2.6.2.2. Flavanos 3-oles (3-flavanoles).**

Los flavanos 3-oles (3-flavanoles) están presentes en la uva en estado de monómero y bajo formas más o menos polimerizadas que constituyen los taninos catéquicos. En el seno de la baya de uva, se localizan principalmente en las semillas, aunque se han detectado también trazas de monómeros y dímeros en la pulpa (Bourzeix et al., 1986; Ricardo da Silva et al., 1992; Liszt et al., 2015).

Los principales 3-flavanoles monómeros de la uva son la (+)-catequina y su isómero la (-)-epicatequina, pudiendo ser encontrado este último bajo forma de éster gálico (3-galato de epicatequina). La galocatequina (Piretti et al., 1976), el 3-galato de catequina y el 3-galato de galocatequina (Lee y Jaworski, 1990) han sido igualmente

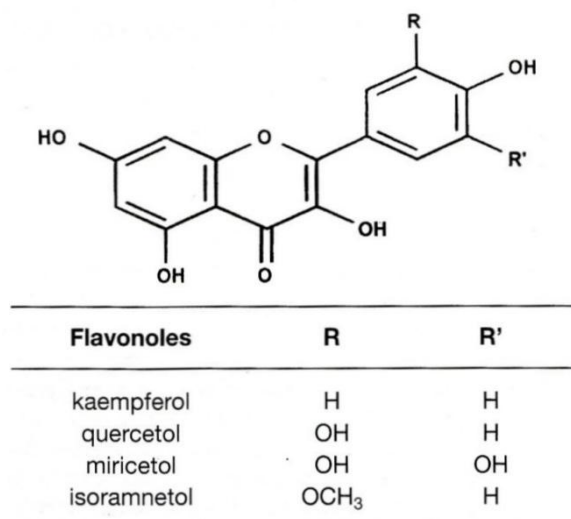
puestos de manifiesto, pero parecen específicos de ciertas variedades del género *Vitis* (Figura 2.13).



**Figura 2.13.** Estructura de los flavanoles monómeros de la uva.

### 2.6.2.3. Flavonoles.

Estos flavonoides (en sentido estricto) están únicamente presentes en los hollejos, bajo forma de glicósidos en posición 3. La Figura 2.14 representa los cuatro principales flavonoles de la uva bajo su forma aglicona.



**Figura 2.14.** Estructura de los cuatro principales flavonoles de la uva en su forma aglicona.

En la uva, se han caracterizado ocho flavonoles monoglicósidos y tres diglicósidos. Las formas glucosiladas son las más abundantes, pero se encuentran igualmente cantidades importantes de glucurónidos. Otros monosacáridos encontrados

son galactosa, xilosa y arabinosa, sobre todo en posición terminal de los diglicósidos (Flanzy, 2000; Makris et al. 2006; Mattivi et al., 2006; Castillo-Muñoz et al., 2007; Figueiredo-González et al., 2012; Liang et al., 2012).

## **2.7. PRINCIPALES ENFERMEDADES FÚNGICAS DE LA VID.**

Las plagas y enfermedades de la vid afectan en dos aspectos: cantidad y calidad de uva. El primer efecto de una enfermedad es mermar la producción y una etapa más intensa del ataque puede retrasar la maduración dando vinos de sabor verde, de poco color y de pocos grados, por lo tanto no aptos para el largo envejecimiento que es deseable en muchas zonas de España. Sin tener en cuenta otras enfermedades como las que atacan a la madera, exponemos a continuación las características más destacables de las tres principales enfermedades de la vid.

### **2.7.1. PODREDUMBRE GRIS O BOTRITIS (*BOTRYTIS CINEREA*).**

La podredumbre gris es una enfermedad criptogámica que preocupa mucho a los agricultores, ya que el hongo *Botrytis cinerea* (Figura 2.15) ataca a un gran número de plantas.



**Figura 2.15.** Ataque de podredumbre gris sobre racimo.

En la vid, *Botrytis cinerea*, se manifiesta en los órganos herbáceos (hojas, brotes e inflorescencias), en las estacas-injertos en cámara caliente de estratificación y sobre los racimos en donde provoca:



- Podredumbre peduncular, que se manifiesta en el pedúnculo y en el raspón de los racimos, produciendo su marchitez y muchas veces, su caída antes de la cosecha; parece que esta forma se manifiesta sobre todo en los viñedos alemanes y en el nordeste de Francia.

- Podredumbre gris propiamente dicha, que es la forma más grave y que afecta a los granos del racimo, en tiempo húmedo, entre el cuajado y la madurez.

- Podredumbre noble, que se manifiesta en período de sobremaduración bajo ciertas condiciones climáticas y que se busca para la elaboración de vinos generosos.

El hongo puede atacar a casi todos los órganos y manifestarse a partir de la primavera, pero los ataques más graves son los que se producen sobre los racimos a partir del envero.

La enfermedad se desarrolla más fácilmente en algunas circunstancias relacionadas con las condiciones climáticas, con la sensibilidad de la planta misma y con los factores de cultivo. El hongo se desarrolla bien entre 15 y 20° C. El agua de lluvia o una humedad superior al 85% crea condiciones muy favorables para su desarrollo.

Los vinos procedentes de cosechas con podredumbres presentan caracteres particulares. En las variedades tintas se produce una degradación de la materia colorante y sustancias aromáticas, formación de mucilagos que perjudican la clarificación y pérdida considerable de jugo (Reynier, 2002; Morales-Valle et al., 2011; Hong et al., 2012; Steel et al., 2013; Calvo-Garrido et al., 2014).

### **2.7.2. MILDIU (*PLASMOPARA VITICOLA*).**

El mildiu de la vid es una enfermedad originaria de América que fue observada en Francia por Planchon en 1878. Está producida por un hongo, *Plasmopara viticola* (Figura 2.16), que se desarrolla sobre todos los órganos verdes: pámpanos, hojas, racimos y zarcillos. Al principio fue la causa de pérdidas catastróficas de cosechas.



**Figura 2.16.** *Ataque de mildiu sobre racimo.*

En las hojas aparecen manchas traslúcidas, llamadas "manchas de aceite", de forma generalmente circular o alargada cuando aparecen en los nervios; en el envés de las hojas, cuando la atmósfera es suficientemente húmeda, aparece en la zona de las "manchas de aceite" un polvo blanco que se desprende fácilmente al frotarlo; este polvo está formado por las fructificaciones del hongo (conidióforos). Al cabo de un tiempo, las manchas se oscurecen y se secan. En las hojas adultas, las manchas son pequeñas y angulosas, estando limitado su contorno por los nervios. Las uvas atacadas por mildiu darán vinos de mala calidad con bajo grado y sabor desagradable.

En los pámpanos, la contaminación produce unas manchas de color amarillo pálido que se oscurecen después; el pámpano se curva en forma de cayado y después se endereza; de estas manchas salen conidióforos; los daños producidos sobre los pámpanos son más raros pero más graves que los de las hojas.

En los racimos, el ataque sobre el pedúnculo provoca una curvatura en gancho del racimo, pero donde más frecuentemente se manifiesta la enfermedad es sobre las bayas, bien en los frutos recién formados, o sobre los frutos verdes o desarrollados.

La humedad y el calor son indispensables para el desarrollo del mildiu. La receptividad de la vid también juega un papel importante. Los órganos herbáceos, jóvenes, en vías de crecimiento y ricos en estomas son los más sensibles (Reynier, 2002; Van-Leeuwen et al., 2013).

### 2.7.3. OÍDIO (*UNCINULA NECATOR*).

Esta enfermedad se debe al hongo *Uncinula necator*, que se desarrolla en todos los órganos herbáceos de la vid (Figura 2.17). Los brotes jóvenes herbáceos presentan en primavera un crecimiento reducido, con entrenudos cortos y un revestimiento de polvo blanquecino que les confiere uno de los aspectos característicos de la enfermedad, visible solamente en las variedades sensibles del viñedo mediterráneo; después del agostamiento los sarmientos tienen manchas parduzcas y sus extremidades permanecen blanquecinas.

En las hojas se observa en principio un ligero rizado en el borde y después la aparición de manchas difusas de polvo blanquecino o grisáceo. Las manchas blanquecinas del oído son visibles sobre todo en la cara superior del limbo mientras que con el mildiu están localizadas estrictamente en la cara inferior.



**Figura 2.17.** Ataque de oídio sobre racimo.

En los racimos, la contaminación puede ocurrir antes de la floración y provocar una desecación parcial o total de las inflorescencias. Después del cuajado, los granos contaminados se recubren de un fino polvo blanquecino y posteriormente de necrosis negras. El crecimiento de las partes afectadas se para, mientras que las uvas continúan engordando, revientan y dejan aparecer las pepitas. Estas lesiones son muy favorables a la penetración de la podredumbre gris.

Con tiempo cálido y atmósfera húmeda, el oído se desarrolla muy rápidamente sobre las hojas y en particular sobre los racimos abrigados por un follaje tupido. Las lluvias de verano, cálidas y cortas son favorables; asimismo, las noches frescas de junio que producen rocíos y nieblas matinales son también favorables.

Para atajar estos problemas que merman la calidad final de la producción, el viticultor emplea desde hace siglos toda una gama de fungicidas, además de otros productos fitosanitarios como insecticidas (Reynier, 2002).

## **2.8. PLAGUICIDAS Y VITIVINICULTURA.**

### **2.8.1. CONCEPTOS GENERALES.**

Los intentos del hombre por controlar las plagas en los cultivos es una cuestión antigua, por lo que el empleo de plaguicidas en la agricultura se remonta a muchos años atrás, aunque en los primeros tiempos fueron mayoritariamente obtenidos de fuentes de la naturaleza. Los primeros registros corresponden a la quema de azufre como fumigante en el año 1000 a.C. Más tarde, se usaron materias como extractos de pimienta y tabaco, agua jabonosa, aguacal, vinagre, trementina, aceite de pescado, salmuera y lejía, entre otras. Posteriormente, empezaron a utilizar sustancias químicas y más tarde se sintetizaron los primeros plaguicidas químicos. Al comienzo de la II Guerra Mundial (1940), la mayoría de plaguicidas contenían compuestos arsenicales, aceites de petróleo, nicotina, piretrina, rotenona, azufre, cianuro de hidrógeno y criolita, y con el fin de esta Guerra y las necesidades mundiales de incrementar la producción de alimentos, se inició la época moderna de síntesis de nuevos plaguicidas más específicos y complejos (Casida y Quistad, 1998; Ware y Whitacre, 2004; Alain et al., 2012).

El Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas, aprobado por el Consejo de la FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) en su artículo 2º, define los plaguicidas como *“cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies de plantas o animales indeseables que causan perjuicio o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos”*. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladoras del crecimiento de las plantas, defoliantes, desecantes,

agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta, y las sustancias aplicadas a los cultivos antes o después de la cosecha para proteger el producto contra la deterioración durante el almacenamiento y transporte (FAO/OMS, 2010).

Este Código, constituye el marco de referencia sobre manejo de plaguicidas para todas las entidades públicas y privadas comprometidas en, o asociadas con, la producción, la regulación y el manejo de plaguicidas. Ofrece patrones de conducta y sirve como punto de referencia en relación a las prácticas de manejo seguro del ciclo de vida de los plaguicidas, en particular para las autoridades gubernamentales y la industria de plaguicidas. El Código de Conducta se implementa mediante directrices técnicas que son elaboradas por un Panel de expertos sobre manejo de plaguicidas (BOE, 1983, 1994a y 1994b).

## **2.8.2. FUNGICIDAS EMPLEADOS EN EL VIÑEDO.**

Los fungicidas son aquellos plaguicidas destinados a controlar hongos patógenos causantes de enfermedades como mildiu, oídio y botritis en viñedos, que han sido descritas anteriormente.

Atendiendo a su comportamiento en la planta una vez aplicados, los fungicidas pueden agruparse en:

- Superficiales o de contacto: son los productos que una vez aplicados en la planta no penetran en los tejidos vegetales por lo que únicamente ejercen su acción sobre la superficie cubierta por el producto (acción local), no protegiendo los órganos formados después del tratamiento. Es decir, se consideran preventivos o protectores ya que previenen la infección inhibiendo al patógeno antes de que éste haya penetrado en la planta y se haya establecido en sus tejidos. Al no penetrar en los tejidos son lavados por lluvias superiores a 10 mm, con lo que su persistencia no es larga (inferior a 7 días), por lo que hasta el presente no han mostrado riesgo de resistencias.
- Penetrantes o sistémicos translaminares: penetran en los tejidos de la planta, pero no se trasladan interiormente por ellos, ejerciendo únicamente su acción

en el sitio donde fueron aplicados. Por lo tanto, al igual que los fungicidas de contacto, no protegen los órganos formados después del tratamiento.

- **Sistémicos:** son aquellos productos que penetran en los tejidos de las plantas y se desplazan por ellos a través de la savia, ejerciendo su actividad en sitios lejanos a donde fueron aplicados y en los órganos que, por el crecimiento, aparecen después de la aplicación (hasta 10-12 días después de la aplicación).

Tanto los fungicidas penetrantes como los sistémicos se consideran curativos ya que, al infiltrarse en los tejidos, detienen o impiden el desarrollo del micelio después de que el hongo haya penetrado en la planta. No son lavados por la lluvia si transcurre 1-2 horas tras el tratamiento, su persistencia es más larga (10 días para los penetrantes y 12 días para los sistémicos), pero presentan el riesgo de aparición de resistencias. Además, ambos también tienen un carácter preventivo, inhiben al hongo para que no penetre en los tejidos. Otro punto importante es que la acción curativa sólo es eficaz si los tratamientos se realizan dentro de un determinado plazo de tiempo contado a partir del momento en que se produjo la infección. En el caso de los fungicidas antibotróficos este intervalo de tiempo queda reducido a unas pocas horas por lo que esos fungicidas tienen una acción más bien preventiva. Por el contrario, los fungicidas antimildiú pueden impedir el desarrollo del hongo si se aplican 2-6 días después de haberse producido la infección (Laguna, 2013).

A su vez, según la forma de actuar los fungicidas podrían clasificarse en dos grandes grupos:

- Los fungicidas "multi-diana" (generalmente de contacto) que actúan interfiriendo simultáneamente varios procesos vitales del hongo.
- Los fungicidas "mono-diana", que suelen ser penetrantes o sistémicos, que afectan a un solo proceso vital (inhibidores de la respiración, inhibidores de la división celular, etc.).

En los últimos años las estrategias de lucha contra las plagas y enfermedades que atacan nuestros cultivos han evolucionado hacia el uso de productos fitosanitarios más respetuosos con el consumidor y con el medio ambiente. Siendo uno de los

principales retos al que se enfrenta la ciencia moderna, el desarrollo de fungicidas más eficientes, selectivos, no persistentes y que sean respetuosos con el medio ambiente. Muchos de los fungicidas que se utilizan actualmente son tan persistentes que pueden ser detectados en cultivos y suelos, después de varias semanas, incluso después de los procesos de vinificación; otros pierden su eficacia debido al desarrollo de resistencias.

Nuestro estudio se ha realizado con nuevos fungicidas pertenecientes a las familias que se presentan en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1.** *Fungidas utilizados y familias a las que pertenecen.*

Kresoxim-metil	Estrobirulinas
Mepanipirim	Organofosforados
Metrafenona	Benzofenonas
Ciazofamida	Cianoimidazoles
Boscalid	Carboxamidas
Fenhexamida	Hidroxianilidas

Han sido elegidos ya que presentan en general un buen perfil toxicológico y ecotoxicológico, siendo adecuados en cultivos integrados en programas de gestión. Ya que no se acumula en el suelo, plantas y animales y la cantidad absorbida se inactiva rápidamente.

## **2.9. EFECTOS DERIVADOS DE LA UTILIZACIÓN DE PLAGUICIDAS EN VITICULTURA.**

La calidad del vino depende fundamentalmente de la calidad de la uva. Para obtener vinos de alta calidad, es necesario procesar las uvas sanas y en la etapa de maduración correcta y por esta razón el agricultor tiene que tener especial cuidado en la prevención de ataques de parásitos sobre el viñedo (Caboni y Cabras, 2010). El uso de plaguicidas en cualquier cultivo presenta posibles efectos derivados de sus características físico-químicas y su forma de aplicación. En el caso concreto de la vid, estos efectos se pueden concretar en los siguientes.

### **2.9.1. RESIDUOS EN UVA, MOSTO Y VINO.**

Durante el ciclo vegetativo de la vid y especialmente entre el envero y la maduración, el viticultor emplea toda una gama de plaguicidas; insecticidas, fungicidas, herbicidas, etc. Aquellos que son penetrantes y/o sistémicos presentan

mayor probabilidad de encontrarse después en el mosto de la uva y, posteriormente, en el vino. Los que son de contacto, se quedan en la superficie de las bayas y pueden dejar residuos sobre todo cuando son utilizados poco antes de la vendimia. Esta es la razón por la que las autoridades imponen un plazo de seguridad (tiempo entre el último tratamiento fitosanitario y la vendimia) en función de la persistencia del producto (Giraudon et al., 2000). Es decir, la detección de mayor o menor concentración de residuos en uvas, mostos y vinos depende fundamentalmente del plaguicida empleado (características químicas de los ingredientes activos, fotodegradación, termodegradación, la co-destilación, degradación enzimática, dosis y plazo de seguridad), aunque también influyen factores tan poco controlables como el clima (Caboni y Cabras, 2010).

En los últimos años, se han realizado distintas investigaciones acerca de la evolución que experimentan los residuos de fitosanitarios a lo largo de las diferentes fases tecnológicas que transforman la uva en vino. Los resultados disponibles ponen de manifiesto que si tales productos se emplean como indican los fabricantes, no deben aparecer residuos que superen los límites establecidos por la legislación en el momento de la vendimia (González et al., 2003; Fernández, 2004; Ruediger et al., 2005; Vaquero-Fernández et al., 2009; Caboni y Cabras, 2010; Angioni et al., 2011).

En este sentido, se han realizado estudios de acumulación de clorpirifós y dicofol en uvas, tras realizar los tratamientos con los correspondientes formulados comerciales, siguiendo las normas de aplicación y sin exceder los límites máximos de residuos (LMR), se comprobó que tras el proceso de fermentación maloláctica, los residuos de éstos se reducen a límites insignificantes (Ruediger et al., 2005).

Otros trabajos se desarrollaron en uvas de la variedad Tempranillo con los fungicidas pirimetanil, metalaxil, diclofluanida y penconazol en diferentes concentraciones. Los residuos se encontraron principalmente en los hollejos, con porcentajes que van desde 66,3% hasta 90,3% del total de residuos. En la pulpa, estos valores variaron desde 3,5% hasta 31%. En las uvas recolectadas respetando el plazo de seguridad, los niveles encontrados para residuos de fungicidas estaban por debajo de los niveles máximos de residuos (Vaquero-Fernández et al., 2009).



Se ha estudiado el fungicida quinoxifen en tratamientos en campo, detectándose en las uvas recogidas tras la aplicación del producto concentraciones de 0,38 mg/kg (inferiores al LMR establecido en Italia: 0,5 mg/kg). Catorce días después, los niveles residuales disminuyeron hasta 0,09 mg/kg. Tras el prensado de la vendimia, únicamente se encuentran en el mosto el 45% de los residuos presentes en las bayas. Si éste se somete a centrifugación, desaparece el 8% de su concentración residual, no detectándose en vinos al final del proceso fermentativo (Cabras et al., 2000).

Las investigaciones realizadas en el campo de la vitivinicultura evidencia la gran influencia que tienen los procesos enotécnicos en la eliminación de residuos de plaguicidas. En muchas ocasiones, los residuos presentes en las uvas se hallan en concentraciones muy bajas en el momento de su recolección; tal es el caso de los fungicidas kresoxim-metil, penconazol y tetraconazol (Cabras et al., 1998b). En otras situaciones, cuando las aplicaciones se llevan a cabo en condiciones desfavorables, o bien sobre uva ya vendimiada, las altas proporciones de producto detectadas en las uvas experimentan importantes variaciones durante la vinificación (Sala et al., 1996; Fernández, 2000).

Durante el proceso de elaboración de un vino, los niveles residuales de los fungicidas disminuyen, unos de forma brusca y otros ligeramente. Dicha disminución depende de la naturaleza química del fungicida (sobre todo de su solubilidad en agua), de la concentración inicial en las uvas vendimiadas y de las diferentes etapas que se llevan a cabo en el proceso de vinificación. Aunque el porcentaje de reducción es muy variable, es muy improbable que los vinos presenten niveles residuales de fungicidas que supongan un riesgo para la salud de los consumidores. Ello se debe principalmente a los procesos de retención de los fungicidas en orujos y lías, a las reacciones de hidrólisis ácida de estos compuestos y/o a la acción de microorganismos (levaduras y bacterias) y enzimas que intervienen durante la vinificación (Cabras et al., 1994; Lagunas, 2013).

En la primera etapa de vinificación, estrujado y despalillado, los residuos de fungicidas se reparten entre la fase sólida de la uva y la fase líquida o mosto en proporciones variables dependiendo de la afinidad del fungicida por cada una de las fases y su solubilidad en agua. Los resultados publicados por diferentes autores, muestran que los porcentajes de reducción de las concentraciones residuales en mosto

prensado con respecto a las concentraciones en uva inicial pueden oscilar entre: 0-5% (fenamidona, fludioxonil, mepanipirim, piraclostrobin, kresoxim-metil y trifloxistobin); 15-30% (azoxistrobin, ciprodinil y tebuconazol); 50% (pirimetanil, boscalid, ciazofamida y mandipropamida), 60% (quinoxifen) y >75% (fluazinam, tetraconazol, famoxadona, metrafenona y proquinazida) (Cabras et al., 1997, 1998a, 2000; Garau et al., 2009; González-Rodríguez et al., 2011a).

Asimismo se ha encontrado una reducción significativa de las concentraciones de los fungicidas fenamirol, mancozeb, penconazol y vinclozolina entre la pasta inicial (mosto con piel y pepitas) y el vino tinto prensado, oscilando entre 45% y 65%, a excepción del metalaxil (sólo un 9%) (Navarro et al., 1999). Resultados similares se obtuvieron para la disipación de pirimetanil, que tras la fermentación alcohólica mostró una reducción del 52,6% (Vaquero-Fernández et al., 2012). Mientras que para ciprodinil, fludioxonil, pirimetanil y quinoxifen se obtuvieron porcentajes de reducción entre 70-85% (Fernández et al., 2005a). Famoxadona se eliminaba en el vino tinto prensado en porcentajes cercanos al 90% con respecto a la pasta inicial (De Melos Abreu et al., 2006). No se detectaron residuos después de esta etapa de vinificación para piraclostrobin, famoxadona y folpet (González-Rodríguez et al., 2009).

Los trasiegos posteriores, una vez terminada la fermentación maloláctica, también tienen una gran repercusión en la desaparición de algunos fungicidas, ya que pueden ser de nuevo adsorbido en las lías (Sala et al., 1996; Navarro et al., 1999; Fernández et al., 2005a; Edder et al., 2009). La reducción obtenida en la fermentación maloláctica podría deberse más a la adsorción en las paredes celulares de las bacterias que a degradaciones químicas o físicas, como demostraron Cabras et al., (1994b; 2000), quienes determinaron las concentraciones que permanecían en las bacterias tras dicha etapa de vinificación.

La clarificación y filtración de los vinos también puede dar lugar a la desaparición de residuos de fungicidas presentes en los vinos. Con respecto a la clarificación, su eficacia depende de nuevo de factores como la solubilidad del fungicida en la mezcla hidroalcohólica del vino y el tipo de agente clarificante empleado (albúmina de huevo, bentonita, PVPP, etc.). Estudios realizados para evaluar el efecto de cuatro agentes clarificantes (bentonita, carbón activo, PVPP y caseinato potásico) en la eliminación de famoxadona, fluquiconazol y trifloxistobin, aplicados directamente

en vinos trasegados elaborados a partir de la uva blanca variedad Airén de la D.O. Jumilla (Murcia, España), pusieron de manifiesto que la adición de carbón activo origina porcentajes de eliminación cercanos al 100% para los tres fungicidas (Oliva et al., 2007b). En otro estudio, se evalúa el efecto de seis agentes clarificantes (albúmina de huevo, albúmina de sangre, bentonita más gelatina, carbón activo, PVPP y sílica gel) sobre famoxadona, fluquiconazol y trifloxistrobin, pero esta vez añadiendo directamente a un vino tinto trasegado de la variedad Monastrell. Cada uno de los clarificantes afectó en mayor o menor grado a la eliminación de los fungicidas, siendo carbón activo y PVPP los más efectivos, con porcentajes de reducción comprendidos entre 50-100%. Las albúminas de huevo y sangre mostraron porcentajes de eliminación intermedio (25-50%), aunque su empleo se desaconseja debido a que pueden aportar aromas desagradables al vino. Finalmente sílica gel y bentonita no fueron tan efectivas en la eliminación de estos residuos (Oliva et al., 2007c).

El tipo de filtrado antes del embotellado también puede tener algún efecto en la reducción de los residuos. El empleo de filtros de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  influye mínimamente (< 10%) en el descenso de los residuos de famoxadona, fluquiconazol y trifloxistrobin, tanto en vinos tintos como en blancos previamente clarificados (Oliva et al., 2007a; 2007c). Resultados similares fueron mostrados por cipronidil, fludioxonil, pirimetanil y quinoxifen en vinos tintos (Fernández et al., 2005b).

### **2.9.2. EFECTOS DE LOS RESIDUOS DE FUNGICIDAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LEVADURAS Y BACTERIAS LÁCTICAS.**

La presencia de levaduras y su evolución durante la fermentación del vino puede verse influenciada por diversos factores entre los que se encuentra la presencia de residuos de fungicidas (Cabras et al., 1999). Los niveles residuales de estos compuestos pueden variar en el momento de la vendimia así como su interacción en las rutas metabólicas de la fermentación, en concreto el efecto que pueden ejercer sobre la síntesis de esteroides (Doignon y Rozes, 1992) o la inhibición de la respiración celular (Ubeda et al., 1996). Estos efectos pueden modificar la estructura de las membranas celulares de las levaduras y afectar su función específica, como resultado se puede producir una caída progresiva en la viabilidad de la población de levaduras y como consecuencia, la ralentización de la fermentación, afectando a las características organolépticas del vino, disminuyendo su calidad final (Cabanis y Cooper, 1991; Larue,

1991; García-Romeo, 1996; Reulet et al., 1996; Cugier y Reulet, 1997; Vaquero-Fernández, 2010; Regueiro et al., 2015,).

A partir de la década de los 90 se intensificaron las investigaciones centradas en evaluar la influencia de las sustancias activas fúngicas sobre los procesos fermentativos alcohólicos implicados en la elaboración del vino. Observándose que el crecimiento de determinadas cepas de levaduras estaba afectado negativamente por fungicidas como folpet, captan y captafol (Cabras et al., 1987; Domínguez et al., 1995; Hatzidimitriou et al., 1997), mancozeb (Ubeda et al., 1996) o fenarimol (Zironi et al., 1991). Asimismo, se ha constado el efecto de la concentración sobre la actividad fermentativa de diferentes levaduras para cinco fungicidas (diclofluanida, benomilo, iprodiona, procimidona y vinclozolina). Clasificándolos de mayor a menor toxicidad en función de la concentración necesaria para inhibir el crecimiento de cada levadura en un 90%: diclofluanida (2 mg/l) > benomilo (250-750 mg/l) > iprodiona (1000-1600 mg/l) > promicidona (800-2500 mg/l) (Calhelha et al., 2006).

Por el contrario, otras sustancias fúngicas tales como azoxistrobin, ciprodinil, fludioxonil, mepanipirim, pirimetanil y tetraconazol (Cabras et al., 1999); quinoxifen (Cabras y Angioni, 2000), fenhexamida (Cabras et al., 2001), iprodiona y fludioxonil (Ochiai et al., 2002) o zoxamida (Angioni et al., 2005) no afectaron de forma significativa a los procesos fermentativos. Famoxadona, fenhexamida, fluquinconazol, kresoxim-metil, quinoxifen y trifloxistrobin no produjeron efectos negativos sobre las levaduras iniciales ni sobre el proceso fermentativo, pero sí que podrían afectar a la calidad organoléptica de los vinos (Oliva et al., 2007b). Estos efectos también han sido estudiados y demostrados por otros autores como González-Rodríguez et al. (2011b) y Noguero-Pato et al. (2011).

En otros casos se ha puesto de manifiesto que la aplicación de nuevos fungicidas orgánicos aplicados en viñedo originan una reducción drástica de las levaduras autóctonas presentes en la piel de las uvas, así como un cambio en la población de levaduras *A. pullulans* (Comitini & Ciani, 2008)

La inhibición que producen los plaguicidas sobre la actividad de bacterias lácticas (fermentación maloláctica) durante la elaboración del vino es un efecto que se ha estudiado en menor medida. Así se ha puesto de manifiesto para bacterias

*Oenococcus Oeni* responsables de la fermentación maloláctica, cuando están en presencia de diclofluanida, cobre o incluso ácidos grasos, estas sustancias parecen tener un efecto sobre el crecimiento celular inhibiendo la actividad de la ATPasa (Vidal et al., 2001; Carreté et al., 2002). También se ha constado que dicofol presenta un efecto inhibitorio importante sobre el catabolismo del ácido málico. Clortalonil, clorpirifos y fenamirol también presentaron dicho efecto pero en menor medida. Sin embargo, los fungicidas carbendazima, fenarimol, metalaxil, oxadixil, procimidona y triadimenol, no mostraron efecto negativo alguno sobre la bacteria láctica *Oenococcus Oeni* (Ruediger et al., 2005).

Otros autores estudiaron los efectos inhibitorios de fungicidas como zoxamida (Angioni et al., 2005), no interfiriendo en la actividad de las bacterias lácticas, o diclofluanida, iprodiona, vinclozolina y promicidona sobre la fermentación maloláctica de *Oenococcus Oeni* (Sapis-Domercq, 1980; Vidal et al., 2001; Carreté et al., 2006). Los tres últimos fungicidas pertenecientes a la familia de las dicarboximidias no mostraron apenas efectos inhibitorios. La diclofluanida mostró efectos moderados, siendo la concentración mínima inhibitoria de 5 mg/l.

### **2.9.3 INFLUENCIA DE LOS RESIDUOS DE FUNGICIDAS EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS VINOS.**

La presencia de residuos de fungicidas en uva puede provocar modificaciones en la composición polifenólica de los vinos, al alterar no sólo la extracción de estos compuestos durante el proceso de vinificación, sino también su evolución durante el envejecimiento.

Los primeros estudios realizados sobre este tema fueron los de Hajšlová et al. (1984) que estudiaron la influencia de dos formulados fitosanitarios, Melprex 65 W (dodina) y Anthio 25 (formotion), en la composición fenólica de manzana. Experiencias posteriores en diferentes frutas, ponen de manifiesto que residuos de plaguicidas en zumos de tomate y membrillo afectan a la actividad de diferentes enzimas entre los que se encuentran algunos de los que participan en el metabolismo de los polifenoles, como son peroxidasas y polifenol oxidasas (Saad et al., 1993; Fattouch et al., 2010).

Los ensayos realizados sobre la influencia de fungicidas en el color durante el proceso de vinificación son muy escasos. Los primeros resultados fueron obtenidos en el estudio del efecto de cinco fungicidas: carbendazima, diclofluanida, iprodiona, procimidona y vinclozolina, aplicados a dos dosis diferentes, sobre los parámetros físico-químicos y organolépticos del vino. Los valores de pH, densidad y acidez total no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, en presencia de procimidona y vinclozolina se obtuvo menos concentración de ácido málico, mayor concentración de polifenoles totales y color rojo (a dosis alta de ambos plaguicidas), con la misma tonalidad en todos los vinos elaborados (Santos, 1977).

Varios años más tarde se estudió la influencia de los residuos de seis fungicidas (azoxistrobin, ciprodinil+fludioxonil, kresoxim-metil, pirimetanil y quinoxifen), sobre el color final de vinos tintos obtenidos por maceración prefermentativa a baja temperatura. El estudio se llevó a cabo en uva tinta (variedad Monastrell) a la que, un día antes de la vendimia, se trató con las diversas formulaciones utilizadas a las dosis recomendadas por la casa comercial. Una vez terminada la fermentación de los vinos, se determinaron diferentes parámetros indicativos de la composición fenólica de los vinos obtenidos. Los resultados mostraron diferencias significativas entre las vinificaciones tratadas con fungicidas y la testigo, sobre todo en el caso de pirimetanil. Asimismo se han encontrado diferencias significativas para diversos índices y fracciones de compuestos fenólicos entre los vinos control y los procedentes de las uvas tratadas con fenhexamida y famoxadona, elaborado con uvas de Monastrell (Oliva et al., 2005; 2009).

En un ensayo realizado para comprobar el efecto de algunos fungicidas sobre el contenido de antocianos en vinos, se encontró que las concentraciones de antocianos totales se incrementan con la aplicación de quinoxifen y kresoxim-metil, siendo la primera la más significativa con respecto al control; por otro lado fluquinconazol se mantiene en un nivel prácticamente idéntico al control. Estos resultados coinciden con los expuestos para kresoxim-metil en vinos (Fernández et al., 2001). En otro estudio de diversos fungicidas, se comprobó que famoxadona, trifloxistrobin y fenhexamida, ejercían una cierta acción de inhibición sobre el contenido de antocianos, mostrando diferencia significativas respecto vino control; ninguno de los fungicidas estudiados provocó un incremento en el total de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles, aunque fenhexamida produjo la disminución más pequeña. En contraste, los fungicidas que

producen la mayor disminución en las concentraciones de algunas de los compuestos fenólicos son fluquinconazol para el grupo flavonoles y trifloxistrobin para antocianinas y hidroxicinámicos (Mulero et al., 2015).

#### **2.9.4. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.**

El uso continuado de fitosanitarios y su incorporación al suelo, puede suponer un riesgo potencial para el medio ambiente, sobre todo si los residuos persisten en el suelo o se movilizan hacia cursos de agua. Pudiendo afectar incluso a plantas y organismos beneficiosos como las lombrices (Fairbrother et al., 2007; Harmsen, 2007; Katayama et al., 2010) y en consecuencia a la fertilidad del suelo. Estos residuos llegan al suelo bien por aplicación directa, en tratamientos de desinfección, o bien por deriva de la aplicación a la planta (arrastre por aguas de lluvia o riego, viento, etc.) (Kookana et al., 1998; Wightwick y Allinson, 2007; Wightwick et al., 2008; Kibria et al., 2010; Komarek et al., 2010).

El destino y el comportamiento de los plaguicidas en el medio ambiente está influenciado por sus propiedades químicas (capacidad para inmovilizarse en el suelo y susceptibilidad para degradarse) y por los factores ambientales (tipo de suelo, topografía, prácticas agrícolas, precipitaciones, etc.) (Wightwick y Allinson, 2007; Arias-Estevez et al., 2008; Komarek et al., 2010). Una de las formas de desaparición de los plaguicidas en el suelo es su arrastre por lluvias o aguas de riego. Sin embargo, este hecho beneficioso para el terreno contaminado, es por el contrario una fuente de contaminación potencial de aguas subterráneas y superficiales. En otros casos, la temperatura y las condiciones de iluminación permiten la volatilización del compuesto.

En cuanto a la naturaleza del fitosanitario, es importante conocer su movilidad y tiempo de vida media (tiempo necesario para que el depósito de materia activa se reduzca a la mitad) para mantener controlado el residuo (Fairbrother et al., 2007).

Por otro lado, la conjunción de las características del suelo (pH, materia orgánica, naturaleza de los coloides, humedad, microflora y microfauna), y las propiedades físico-químicas del plaguicida (grupo químico, densidad, punto de fusión, solubilidad, etc.), además de las prácticas culturales que se realizan en el cultivo

condicionan en gran medida la presencia durante más o menos tiempo del residuo en el suelo (Khan, 1980; Gevao et al., 2000; Katayama et al., 2010).

También es necesario considerar la degradación química o metabólica del producto, ya que en algunos casos, el metabolito resultante puede ser tanto o más tóxico que el original y no siempre valorable por el método analítico empleado para el producto inicial. En general, los plaguicidas utilizados en la defensa fitosanitaria de la vid presentan una escasa movilidad en el suelo, y rara vez penetran más de 30 cm. Su degradación aumenta al hacerlo la materia orgánica y los productos de metabolización suelen ser, en la mayoría de los casos, menos tóxicos que el original. Incluso la etilentiourea, compuesto carcinogénico derivado de la degradación de los etilenbisditiocarbamatos, posee una mínima persistencia debido a su rápida transformación en etilenurea (Cabras et al., 1987).

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

### **2.9.5. EFECTO TOXICOLÓGICO SOBRE EL CONSUMIDOR.**

El gran número de plaguicidas utilizados en la actualidad hace imprescindible la realización de controles que permitan identificar y cuantificar los residuos que estos compuestos pueden dejar en las uvas. Por lo que hay que tomar las debidas precauciones para que la vinificación se realice de forma correcta y los residuos no se transfieran al mosto y de éste a los vinos (Badii y et al., 2008; Ortiz et al., 2010; Carisse, 2010).

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



Sólo la legislación alemana establece LMR para algunos antibotánicos concretos únicamente para uvas destinadas a vinificación; y en Suiza, metil-tiofanato y vinclozolina tienen estipulados LMR tanto en uva como en vino, pero éstos son casos excepcionales. En Italia, aunque los LMR se fijan en uvas, se permiten la estimación del límite en vinos considerando el porcentaje de transformación, siempre y cuando se sigan las técnicas normales de buena elaboración (Cabras et al., 1987). En la actualidad, en Francia, Italia y otros países, e incluso a nivel de la CEE, se está estudiando la posibilidad de establecer una normativa en vinos. Pero hasta su existencia, se ha de procurar siempre el cumplimiento de los límites legislados para uvas, no sólo en el país de origen sino también en el país importador en caso de comercio internacional.

Durante los años 1998-2001 se realizó un muestreo sobre más de trece mil muestras de alimentos de origen vegetal (Fuster, 2003). En el caso de bayas y pequeños frutos, la materia activa que aparece con mayor frecuencia (41%) es etil-clorpirifos, seguida del fungicida procimidona (26%). Del resto de plaguicidas encontrados en estos frutos, sólo triadimenol alcanza el 10%, mientras que los insecticidas fenitrotion y metil-paration, y los fungicidas penconazol y vinclozolina no superan el 3%. Sobrepasaron sus LMR (Límite Máximo de Residuo) etil-clorpirifos, metil-paration, dicofol, fenitrotion, quinalfos y triadimenol, observándose además, que en el año 2000 se produce un ligero aumento de plaguicidas que se detectan con concentración superior a su LMR, lo que se debe principalmente, a la mayor presencia de etil-clorpirifos, metil-paration y dicofol. En cambio, en 2001 se recupera la tendencia a la baja de materias activas que superan su LMR. No obstante, ningún fitosanitario de los encontrados en los distintos años y muestras estudiadas puede inducir riesgo toxicológico a largo plazo, pues la relación entre la ingesta diaria admisible y la ingesta diaria estimada (IDA/IDE) calculada para todos los plaguicidas detectados se sitúa en todos los casos por debajo del umbral de riesgo.

Con el fin de proteger la salud de los consumidores se ha regulado el uso de estos productos y se han establecido programas de vigilancia para controlar la presencia de sus residuos en uvas destinadas a la vinificación y los controles necesarios para el cumplimiento de la legislación vigente (MAGRAMA, 2012).

## **2.10. MEDIDAS LEGISLATIVAS SOBRE EL USO SOSTENIBLE DE PRODUCTOS FITOSANITARIOS.**

El uso de productos fitosanitarios está regulado en la legislación europea y española con el fin de realizar un uso correcto de los mismos y contribuir así a reducir al mínimo los posibles daños que produzcan en el medio ambiente y en la salud de personas y animales. En consecuencia, la UE aplica los mecanismos necesarios para que sólo puedan comercializarse aquellos productos fitosanitarios que sean útiles y eficaces para combatir las plagas mediante un sistema comunitario armonizado para comercializar y utilizar productos fitosanitarios (COMM, 2006).

Con el fin de garantizar que la utilización de estas sustancias químicas sean seguras para los consumidores, se establecen los LMR, término que se define *como el límite legal superior de concentración de un residuo de plaguicida en alimentos o piensos establecido de conformidad con la reglamentación correspondiente, basado en las buenas prácticas agrícolas y la menor exposición del consumidor necesaria para proteger a todos los consumidores, incluidos los más vulnerables*. La Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) establece que estos LMR no son límites toxicológicos, sino límites toxicológicamente aceptables, basados en una buena práctica agrícola y que representan la cantidad máxima de un residuo que es posible encontrar en un producto alimentario de origen vegetal como consecuencia del uso legal y racional de ese plaguicida evaluado.

Estos LMR no son límites toxicológicos porque no representan la cantidad máxima de la sustancia activa que puede ser perjudicial para la salud de los consumidores. Es decir, la superación de un LMR no implica siempre un riesgo para la salud. Por otro lado, los LMR son toxicológicamente aceptables porque su cumplimiento asegura que no causan efectos tóxicos en los individuos, ni a corto ni a largo plazo. Los valores de LMR de las materias activas autorizadas y los cultivos para las que están registradas se encuentran tabuladas en una base de datos a disposición pública en el organismo correspondiente de la UE (EU PESTICIDE DATABASE, 2015).

El marco legislativo en materia de residuos de plaguicidas, desde 2008, es el Reglamento (CE) Nº 396/2005, del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a los límites de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen animal y vegetal y

que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo y sus modificaciones posteriores. Su objetivo es unificar las directivas existentes anteriormente sobre los límites máximos de los residuos de los plaguicidas (LMR) en los alimentos y piensos de origen animal y vegetal destinados al consumo humano o animal, en un solo texto legislativo de aplicación directa a todos los Estados miembros y teniendo en cuenta las buenas prácticas agrícolas aplicables a cada plaguicida y los principios de control integrado (CEE, 1991 y 2005).

Hasta entonces cada Estado tenía límites máximos de residuos de algunos plaguicidas no armonizados, que diferían según el tipo de alimento y estas diferencias podían comportar obstáculos en la comercialización entre los Estados miembros y entre terceros países y la UE, así como diferencias en el nivel de protección de la salud de los consumidores. Con este reglamento se da un paso más en la armonización total de los límites máximos de residuos de los plaguicidas en la UE. Este nuevo reglamento:

- Establece límites máximos armonizados para todos los productos alimentarios, incluyendo también a los destinados a los animales.
- Exige acciones informativas para que se conozca exhaustivamente los riesgos que presentan los plaguicidas.
- Define el papel que desempeñarán los distintos actores en el proceso de control, especialmente la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
- Establece la obligación de todos los países miembros de publicar en Internet los resultados de los residuos nacionales, de modo que, cuando el límite máximo de residuo (LMR) sea excedido, los Estados miembros podrán declararlo a los minoristas, comerciantes y productores afectados.

Los productos, grupos de productos o partes de productos en los cuales se aplicarán los LMR armonizados y las sustancias activas de productos fitosanitarios por las que se establecen LMR se recogen en los siete anexos del Reglamento:

El anexo I incluye la lista de productos, grupos o partes de ellos en los que se aplicarán los LMR según el Reglamento (CE) nº 178/2006 (CEE, 2006).

El anexo II es la lista de LMR definitivos de la Unión Europea y consolida la legislación de la UE existente antes de 2008 (CEE, 1986a, 1986b y 1990).

El anexo III, contiene la lista de los denominados LMR provisionales. Incluye los LMR temporales de sustancias activas sobre las que todavía no se ha tomado una decisión de inclusión o no en el anexo I de la Directiva 91/414/CEE del Consejo relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.

El anexo IV, expone la lista de sustancias activas evaluadas para las que no se exige LMR (CEE, 1991).

El anexo V, contiene la lista de plaguicidas para los que sus residuos no podrán superar 0,01 mg/kg o el valor fijado por defecto, teniendo en cuenta los métodos analíticos rutinarios disponibles.

El anexo VI, contiene la lista de factores de conversión de LMR para mercancías procesadas (CEE, 2008).

El anexo VII, contiene la lista de sustancias activas y productos utilizados como fumigantes a los que se aplica la excepción a los límites máximos establecidos en los anexos II e III con respecto al tratamiento por fumigación posterior a la cosecha antes de que los productos se pongan en el mercado.

Si un plaguicida no está incluido en ninguno de los anexos citados anteriormente, se aplica por defecto un LMR general de 0,01 mg/kg.

Estos límites máximos, se fijan sobre materias primas sin transformar, por ejemplo, uvas para vinificación en lugar de vino, aceitunas para producción de aceite en lugar de aceite, uvas de mesa en lugar de pasas.

Es por ello que para conocer el LMR en productos transformados se hace necesario aplicar factores de transformación (concentración, dilución, etc.) sobre el LMR del producto inicial, según se establece en el artículo 20.1 del Reglamento mencionado. A modo de ejemplo si el LMR para trifloxystrobin es 0,3 mg/kg en aceitunas para la producción de aceite, y se considera un factor de, por ejemplo, 4 (es una sustancia activa soluble en grasa), la cantidad máxima de trifloxystrobin legalmente admitida en una muestra de aceite es de 1,2 mg/kg.

La responsabilidad de acreditar el factor a aplicar en función del procesamiento al que ha sido sometido el producto fresco recaerá en las diferentes autoridades de

control oficial, pudiendo recurrir a diversa bibliografía para orientarse en este asunto y fijar de manera certera el LMR. De entre ella destacamos, los dictámenes razonados de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) para cada sustancia activa disponibles en su página Web o los documentos del *Codex Alimentarius*.

Así, de manera orientativa, la deshidratación es, quizás, el procesamiento más sencillo que puede afectar a la concentración de residuos por lo que sus factores asociados han sido los más rápidamente aceptados por la comunidad científica. No obstante, se pueden considerar otros factores como los acordados en reuniones conjuntas FAO/OMS del Comité del Codex Alimentarius, como el rendimiento de la producción del elaborado a partir de la materia prima. Así por ejemplo, para el vino se considera un rendimiento del 70% y en consecuencia se puede aceptar un factor para definir su LMR de 0,5-1 (JMPR, 2007); otros criterios apuntan a una variación de la concentración de los residuos entre el 0,7 y el 1,3 dependiendo de, entre otros factores, la liposolubilidad o no de la sustancia activa empleada, expresada como coeficiente de partición n-octanol/agua.

Aunque los productos fitosanitarios contribuyen a aumentar los rendimientos en la agricultura y ayudan a asegurar una buena calidad en los alimentos, su utilización puede tener efectos desfavorables en la producción vegetal y también puede entrañar riesgos para los seres humanos, animales y el medio ambiente, lo que representa un coste demasiado alto para la sociedad.

Debido a ello, fue necesario elaborar un marco regulador a nivel europeo que contempla, entre otras normas, la Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas (transpuesta en los correspondientes R.D. y Reglamento CE relativos a la comercialización de productos fitosanitarios y por los que se derogan las antiguas Directivas del Consejo (CEE, 2009a y 2009b; BOE, 2012).

El objetivo del Reglamento es garantizar un alto grado de protección de la salud humana, animal y del medio ambiente, a la vez que salvaguardar la competitividad de la agricultura comunitaria. Establece el procedimiento y los requisitos para la aprobación comunitaria de sustancias activas, protectoras y sinergistas, fijando unos criterios de corte sanitarios y medioambientales para poder ser aprobadas. Contempla, además, el procedimiento para la autorización nacional de comercialización y uso de

los productos fitosanitarios, estableciéndose por primera vez el concepto de evaluación zonal.

Para poder comercializar y usar los productos fitosanitarios es necesario una autorización que conlleva realizar una estricta evaluación de riesgos (CEE, 2009b). Todos los países miembros de la Unión Europea aplican los mismos procedimientos de evaluación y autorización para poder poner los productos fitosanitarios en el mercado. Las sustancias activas se autorizan a nivel comunitario mientras que los productos fitosanitarios que contienen estas sustancias activas, necesitan autorización a nivel de los estados miembros.

La Conferencia Sectorial de Agricultura y Desarrollo Rural celebrada el 10 de diciembre de 2012, aprobó el Plan de Acción Nacional para el uso sostenible de productos fitosanitarios (PAN), de acuerdo con lo indicado en el artículo 4 de la Directiva 2009/128/CE (CEE, 2009a). En el Plan de Acción Nacional se establecen objetivos, medidas, calendarios e indicadores para introducir criterios de sostenibilidad en el uso de productos fitosanitarios para el periodo comprendido entre los años 2013 a 2017. El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente elabora y hace público el informe anual de los resultados de la aplicación del PAN (BOE, 2012).

## **2.11. DETERMINACIÓN DE LA EXPOSICIÓN A LOS PLAGUICIDAS.**

### **2.11.1. CONCEPTO DE RIESGO.**

El riesgo se define como la probabilidad de que se produzca un efecto nocivo para la salud y de la gravedad de dicho efecto, como consecuencia de un peligro o peligros en los alimentos (FAO, 2014). Para ello se realiza un análisis de riesgos que consta de tres componentes: evaluación, gestión y comunicación de riesgos.

La evaluación de riesgos es un proceso basado en conocimientos científicos, que consta de las siguientes fases: (i) determinación del peligro, (ii) caracterización del mismo, (iii) evaluación de la exposición, y (iv) caracterización del riesgo.

En la gestión de riesgos se realiza la ponderación de las distintas opciones normativas a la luz de los resultados de la evaluación de riesgos y, si es necesario, de la selección y aplicación de las posibles medidas de control apropiadas, incluidas las medidas reglamentarias.

La comunicación de riesgos consiste en el intercambio interactivo de información y opiniones sobre los riesgos, entre las personas encargadas de la evaluación y de la gestión de los mismos, los consumidores y otras partes interesadas.

La caracterización del riesgo se basa en la estimación cualitativa y/o cuantitativa, incluidas las incertidumbres concomitantes, de la probabilidad de que se produzca un efecto nocivo, conocido o potencial, y de su gravedad para la salud de una determinada población, basada en la determinación del peligro, su caracterización y la evaluación de la exposición. En la identificación y caracterización del agente de riesgo, se realizan diversos estudios de toxicidad aguda y crónica, en los que se examinan aspectos como la toxicidad genética, neurotoxicidad, carcinogenicidad e inmunotoxicidad.

### **2.11.2. EVALUACIÓN DEL RIESGO.**

Una de las formas de medida del riesgo en el caso de los posibles contaminantes de alimentos es el cálculo de su ingestión por el consumidor. Así, se utilizan conceptos como:

La ingesta diaria estimada (IDE) de un residuo de plaguicida, es la cantidad del plaguicida ingerida por el consumidor. La ingesta diaria admisible (IDA) se define como la cantidad (mg) de un residuo de plaguicida que puede ser consumida diariamente con el alimento durante toda la vida de la persona, sin efecto adverso para ella, según ha demostrado la experiencia hasta ese momento. Debido a la gran diferencia de peso entre personas, indicativo de su nivel de desarrollo fisiológico, la IDA siempre se expresa como mg del residuo en función de kg de peso corporal.

La evaluación de la exposición, se determina mediante encuestas de consumo y los niveles de residuos encontrados en las muestras, la IDE en caso de exposición crónica o la ingesta aguda estimada (IAE) para una exposición aguda con los alimentos

(Löwik et al., 1999; Petersen et al., 2001; Kroes et al., 2002). En teoría, es posible estimar las ingestas de cualquier sustancia en una población dada si se conocen estos dos tipos de datos. Incluso, el sumatorio del producto del consumo de todos los alimentos donde el residuo está presente por las concentraciones en cada uno de ellos, nos puede dar la ingesta total del residuo.

### **2.11.3. BIODISPONIBILIDAD DE LOS RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS.**

Sin obviar los importantes beneficios que supone la utilización de los plaguicidas, tanto en la agricultura como en las actividades de salud pública, son innegables los efectos tóxicos que pueden generar en el ser humano. Su biodisponibilidad en el organismo depende de su toxicocinética: absorción, distribución, metabolismo y eliminación. Estos procesos están influenciados tanto por factores externos relacionados con los patrones de exposición y con la sustancia química (tipo de empleo, temperatura ambiental, tipo de plaguicida, frecuencia, intensidad y duración de la exposición, etc.), como por factores inherentes al individuo (edad, sexo, dotación genética, estado de salud, estado nutricional, estilos de vida, vía principal de absorción, etc.) (Fait y Colosio, 1998; Ramírez y Lacasaña, 2001; García-Sartal et al., 2013; Moreda-Piñeiro et al., 2013; Payá et al., 2013; Read et al., 2015).

La biodisponibilidad es un término esencialmente farmacéutico que alude a la porción de la dosis de un fármaco administrado de manera exógena, que llega hasta el órgano o tejido en el que lleva a cabo su acción. Como determinar la concentración en un tejido resulta excesivamente invasivo, se acepta el valor de la concentración del mismo en el plasma. Puede expresarse en porcentaje o en tasas. Este concepto se utiliza para cuantificar el grado en que una sustancia es aprovechada por el organismo.

Hoy día, el ámbito del estudio de la biodisponibilidad de un xenobiótico se ha extendido a otros campos y así se encuentran multitud de estudios en nutrientes y algunos en contaminantes (Menchai et al., 2008; You et al., 2009; Tao et al., 2011; Shaw-Wei et al., 2014; Rukhsanda et al., 2015). Para los residuos de plaguicidas este valor viene implícito en los estudios de toxicidad por ingestión que se realizan en los animales de experimentación en el registro de una sustancia pero se aplica la sustancia en estado puro, sin mezclar con los alimentos, y se ha demostrado ampliamente en el



campo farmacéutico que la presencia de los alimentos puede disminuir sensiblemente, o en algunos casos aumentar, la biodisponibilidad de un xenobiótico para el organismo. Por tanto, el estudio de la biodisponibilidad de un residuo embebido en el medio que llega al organismo es esencial para determinar la dosis que realmente penetra en él. Aunque es posible encontrar diversos estudios de biodisponibilidad en suelos, los trabajos realizados por el grupo de investigación de la Universidad de Murcia E068 *Química de Plaguicidas, contaminación agroquímica, toxicidad y ecoeficiencia*, sobre biodisponibilidad in vitro de plaguicidas han sido los primeros que contemplan este aspecto en los alimentos (Payá et al., 2006, 2007, 2009 y 2013; Cermeño et al., 2015; Martínez et al., 2015) .

Cuando un xenobiótico entra en contacto con el organismo, bien voluntaria o involuntariamente, lo primero que ha de ocurrir es que se absorba, es decir, la llegada del xenobiótico a la sangre (puede ocurrir a través de la piel, aparato digestivo, respiratorio, etc.), una vez en la sangre puede metabolizarse, pero la mayor parte se distribuye, pudiendo quedar muy restringido a algunos tejidos o que sea una distribución muy homogénea, pero siempre en equilibrio entre la concentración de la sangre y los tejidos; ya dentro del tejido podrá metabolizarse. El principal órgano metabolizador de los xenobióticos es el hígado. El riñón filtra la sangre para excretar sustancias, pudiendo excretar el xenobiótico tal cual o los metabolitos resultantes. La mayor parte de los xenobióticos se excretan por la orina, pero hay otras vías de excreción como son heces, sudor, respiración, etc.

La absorción de los fármacos va a depender de la vía por la que llegan al organismo. Existen varias vías de administración como la oral, parenteral, respiratoria, sublingual, intramuscular, dérmica, etc. La biodisponibilidad es muy dependiente de la vía de administración; en primer lugar, la mayor biodisponibilidad la presenta la vía intravascular (intravenosa o intrarterial), debido a su modo de administración, a continuación la vía intramuscular y sublingual, seguidas por la oral y por último la rectal. Además, en la vía oral, es en la que mayores interacciones se encuentran (Johnson, 1997; Ross et al., 2001; Hodgson et. al, 2004).

Los factores que influyen la biodisponibilidad oral son: pH, vaciado gástrico, motilidad intestinal, presencia de los alimentos, metabolismo presistémico, efecto de primer paso hepático, microflora bacteriana. El efecto individual de estos factores en la

absorción oral de plaguicidas no se conoce. Pero de ellos, en el caso que nos ocupa, el de mayor relevancia es el efecto de la presencia de alimentos, puesto que los residuos de plaguicidas en la dieta nunca penetran aisladamente. Además, se debe tener en cuenta la influencia de las propiedades fisicoquímicas de las sustancias, sobre todo su estructura y su liposolubilidad, que determinarán en gran medida su capacidad para atravesar las barreras biológicas. Por ello, los estudios de biodisponibilidad oral que se presentan en este trabajo se han centrado en la influencia de la naturaleza particular del plaguicida para la absorción y sus efectos sobre los vinos estudiados (Lesjak et al., 2014).

En general, se suelen utilizar dos tipos de modelos para el estudio de la biodisponibilidad oral en fármacos y xenobióticos, *in vivo* e *in vitro* (Khire et al., 2014; Juhasz et al., 2015; Tako et al., 2015; Singh et al., 2015). Los modelos *in vivo* con animales de experimentación son los más fácilmente correlacionables con los humanos, de hecho se puede aplicar el mismo factor de seguridad citado en los estudios toxicológicos de registro de una sustancia, pero plantean problemas de coste, tiempo y ética (Koritala et al., 2015).

Los modelos *in vitro* son aceptables en el estadio inicial de una investigación por ser buenos indicadores de lo que ocurre en un medio fisiológico y además son mucho más económicos, sencillos y rápidos (Chiou y Barve, 1998; Ivashchenko et al., 2014). Los ensayos *in vitro* de biodisponibilidad oral se realizan frecuentemente con montajes de bolsas y cánulas en laboratorio para imitar los compartimentos gastrointestinales y vasos del organismo, con cultivos celulares o con membranas de diálisis (Audus et al., 1990; Artursson y Borchardt, 1997; André et al., 2015). Los métodos *in vitro* se han diseñado para simular el proceso digestivo en los seres humanos, aunque lógicamente están limitados porque no evalúan la interacción entre alimento y el sistema digestivo. La digestibilidad *in vitro* con diálisis es una técnica que tiene en cuenta la solubilidad de los productos digeridos de los no digeridos. El método habitual es el uso de una membrana semipermeable a modo de intestino delgado, porque es el epitelio donde se produce mayoritariamente la absorción oral, al ser el más preparado celularmente por la presencia de sus microvellosidades *in vivo* para que así ocurra (Miller et al., 1981; Schricker et al., 1981; Gil-Izquierdo et al., 2002; Bollinger et al., 2005; Payá et al., 2013). Esta membrana se coloca dentro de un dispositivo adecuado, de manera que se dispone en un lado la disolución a estudiar, en

este caso el alimento fortificado, y se mide su aparición en el lado opuesto, o sea, en el interior de la membrana, una vez que ha logrado traspasar la superficie de la membrana por difusión pasiva (Artursson, 1990). La permeabilidad de esta membrana es el factor fundamental para que estos experimentos sean correlacionables, ya que la característica esencial de las membranas biológicas es que son semipermeables (Artursson y Karlsson, 1991; Camenisch et al., 1998a, 1998b; Ivashchenko et al., 2014; Khire y Valvia, 2014). Para estudiar este proceso adecuadamente, hay disponibles membranas celulósicas comerciales, de permeabilidad aproximada a las condiciones fisiológicas y en monocapa, como el epitelio intestinal. Además, la integridad y viabilidad de la membrana deben ser vigiladas durante todo el proceso, más si como en este caso, hay por lo menos cuatro horas de procedimiento.

Además estos sistemas *in vitro* nos ayudan a estudiar la absorción de los compuestos beneficiosos para la salud, que en nuestro trabajo son los denominados compuestos antioxidantes (Lesjak et al., 2014). Con ello podemos analizar qué cantidad es la que realmente entra en el torrente sanguíneo.

Ante todo lo expuesto, en esta Memoria se pretende aportar datos sobre los residuos de fungicidas que permanecen en el vino después de su aplicación en campo y de su adición controlada en bodega; así como de los valores de compuestos fenólicos y la influencia que la presencia de residuos de los fungicidas puede tener sobre dicha composición.

También y como aporte al concepto de seguridad alimentaria, se comprobará la biodisponibilidad *in vitro* de los residuos de los fungicidas ensayados y de los compuestos fenólicos presentes en los vinos elaborados.



### **3. MATERIALES Y MÉTODOS.**

## 3.1. MATERIALES.

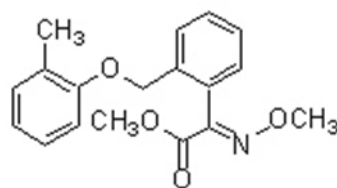
### 3.1.1. FUNGICIDAS ESTUDIADOS.

De todos y cada uno de los plaguicidas se utilizaron patrones analíticos de pureza igual o superior al 98%, proporcionados por Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemania). A continuación se detallan las características de los plaguicidas que han sido utilizados (Macbean, 2012).

#### 3.1.1.1. Kresoxim-metil.

##### Nomenclatura y estructura.

Nombre químico según IUPAC: metil (E)-metoximino[ $\alpha$ -(o-toliloxi)-o-tolil]acetato (Figura 3.1.).



**Figura 3.1.** Estructura molecular de kresoxim-metil.

##### Propiedades físico-químicas.

Punto de fusión: 101,6-102,5 °C.

Tensión de vapor:  $2,3 \times 10^{-3}$  mPa (20 °C).

Coefficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ):  $\log P = 3,4$  (pH 7, 25 °C).

Solubilidad en agua: 2 mg/l (20 °C).

Modo de acción.

Fungicida de contacto, preventivo, curativo y erradicante. Inhibe la producción y germinación de las esporas y el crecimiento del micelio del hongo. Ésto lo logra a través de la inhibición de la respiración mitocondrial de los hongos mediante el bloqueo de la transferencia de electrones entre el mitocondrio b y el citocromo c.

Se utiliza para el control de la sarna en las manzanas y las peras (*Venturia spp.*); oídio en manzanas (*Podosphaera leucotricha*), vides (*Uncinula necator*), cucurbitáceas (*Sphaerotheca fuliginea*) y remolacha azucarera (*Erysiphe betae*); moho (*Erysiphe graminis*), escaldadura (*Rhynchosporium secalis*), helmintosporiosis (*Pyrenophora teres*) y mancha de la gluma (*Septoria nodorum*) en cereales y moho en las verduras (*Leveillula taurica*, *Erysiphe spp.*, *Alternaria spp.*).

Formulaciones.

"Stroby" (BASF, Nissan); "Ardent" (Makhteshim) mezclas: "Allegro" (+ epoxiconazol) (BASF), "Mentor" (+ fenpropimorf) y "Collis" (+ boscalid) (BASF).

Aspectos toxicológicos.

DL<sub>50</sub> oral y aguda: ratas >5000 mg/kg

NOEL: ratas macho 2000 ppm (146 mg/kg al día), para ratas hembra 500 ppm (43mg/kg al día) (3 meses).

IDA: 0,4 mg/kg de peso corporal.

No tiene potencial mutagénico.

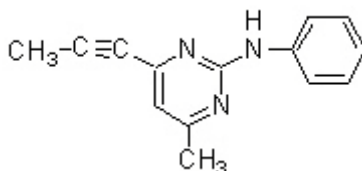
Aspectos metabólicos y medioambientales.

Es muy tóxico para peces y ligeramente tóxico para aves y abejas. En el aire está presente únicamente como partículas, las cuales son eliminadas de la atmósfera por precipitación húmeda y seca. En el suelo se espera que tenga una movilidad baja y que no se volatilice desde sus superficies húmedas. En este medio kresoxim-metil se degrada muy rápidamente bajo condiciones aeróbicas, con una vida media menor a un día. En medios acuosos se adsorbe en sólidos suspendidos y sedimentos y se degrada muy fácilmente bajo la acción de los microorganismos aeróbicos, con una vida media de 1,2 días. Su volatilización desde la superficie del agua no es un destino ambiental importante para este compuesto. Su potencial de bioconcentración en organismos acuáticos es moderado.

### 3.1.1.2. Mepanipirim.

#### Nomenclatura y estructura.

Nombre químico según IUPAC: N-(4-metil-6-prop-1-ynilpirimidina-2-il) anilina (Figura 3.2.).



**Figura 3.2.** Estructura molecular de mepanipirim.

#### Propiedades físico-químicas.

Punto de fusión: 132,8 °C.

Tensión de vapor:  $2,32 \times 10^{-2}$  mPa (20 °C).

Coefficiente de partición n-octanol/agua (K<sub>OW</sub>): log P = 3,28 (20 °C).

Solubilidad en agua: 3,10 mg/l (20 °C).

#### Modo de acción.

Fungicida no sistémico con acción preventiva. Inhibe la penetración del patógeno en la planta hospedera, la elongación del tubo germinativo y la formación de apresorio. No inhibe la germinación de las esporas, la formación de esporas y el crecimiento de las hifas. Se utiliza en el control del moho gris en vides, fresas, tomates y pepinos; roña en manzanas y peras; y la podredumbre marrón en melocotones. Y en el control de oídio en las fresas, pepinos, berenjenas, caquis, y rosas.

#### Formulaciones.

"Cockpit", "Frupica " y "Japica" (Kumiai).

#### Aspectos toxicológicos.

DL<sub>50</sub> oral y aguda: ratas y ratones >5000 mg/kg.

NOEL: para las ratas macho 2,45 y ratas hembras 3,07; para ratones macho 56 y ratones hembra de 68 mg/kg de peso corporal diaria (2 años).

IDA: 0,024 mg/kg.

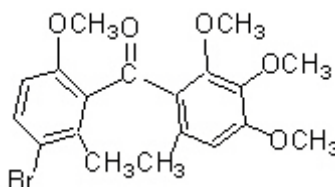
No tiene potencial mutagénico.

Aspectos metabólicos y medioambientales.

En ratas el 96-100% de la dosis se excreta por las heces y la orina dentro de las 96 horas siguientes a su ingestas, degradándose en varios metabolitos. Y en plantas los principales metabolitos son 2-hidroxiopropil-, 2,3-dihidroxiopropil- y 4-hidroxifenil-.

**3.1.1.3. Metrafenona.**Nomenclatura y estructura.

Nombre químico según IUPAC: 3'-bromo-2,3,4,6'-tetrametoxi-2',6-dimetilbenzofenona (Figura 3.3.).



**Figura 3.3.** Estructura molecular de metrafenona.

Propiedades físico-químicas.

Punto de fusión: 99,2-100,8 °C.

Tensión de vapor: 0,153 mPa (25°C).

Coefficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ):  $\log P = 4,3$  (25 °C).

Solubilidad en agua: 0,552 mg/l (pH 5).

Modo de acción.

Fungicida con actividad preventiva, curativa y anti-esporulante. Controla el hongo causante de la enfermedad conocida como mancha ocular (*Pseudocercospora herpotrichoides*) y los oídios (*Erysiphe*) en vid, trigo y cebada.

Formulaciones.

'Flexity' y "Vivando" (BASF).

Aspectos toxicológicos.

DL<sub>50</sub> oral y aguda: ratas macho y hembras 5000 mg/kg

NOEL: ratas 25 mg/kg de peso corporal al día

IDA: 0,25 mg/kg de peso corporal al día

No tiene potencial mutagénico.

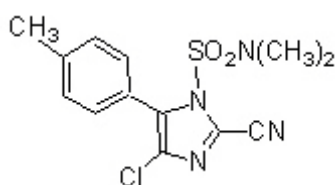


Aspectos metabólicos y medioambientales.

En las plantas penetra a través de la cutícula foliar y se acumula en los tejidos de debajo de la zona de aplicación. Su vida media en el suelo, determinada experimentalmente, se considera moderada; en general, el producto se degrada más rápidamente en condiciones anaeróbicas y bajo la incidencia de la luz. En el agua se degrada rápidamente mediante transformación fotolítica hasta metabolitos secundarios que se depositan en el sedimento y se degradan de forma anaeróbica. En el aire su potencial de volatilización es relativamente bajo y su degradación es fotoquímica: reacciona con radicales OH de forma rápida, lo que hace que la cantidad de sustancia activa que se dispersa en la atmósfera sea muy baja.

**3.1.1.4. Ciazofamida.**Nomenclatura y estructura.

Nombre químico según IUPAC: 4-Cloro-2-ciano-N,N-dimetil-5-p-tolilimidazol-1-sulfonamida (Figura 3.4.).



**Figura 3.4.** Estructura molecular de ciazofamida.

Propiedades físico-químicas.

Punto de fusión: 152,7 °C.

Tensión de vapor:  $1,3 \times 10^{-2}$  mPa (35 °C).

Coefficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ):  $\log P = \log P = 3,2$  (25 °C).

Solubilidad en agua: 0,121 (pH 5, 20 °C).

Modo de acción.

Fungicida de acción preventiva foliar que inhibe todas las etapas del ciclo de vida de *Phytophthora infestans*. Se utiliza para el control de oomicetos y *Plasmodiophora*, en la patata y el tomate (*Phytophthora infestans*) y mildius.

Formulaciones.

'Docious' (Ishihara Sangyo); 'Mildicut' (Ishihara Sangyo); 'Ranman' (Ishihara Sangyo).

Aspectos toxicológicos.

DL<sub>50</sub> oral y aguda: ratas y ratones >5000 mg/kg.

NOEL: 29,51 mg/kg/día (ratas macho).

IDA: 0,17 mg/kg/día.

No tiene potencial mutagénico.

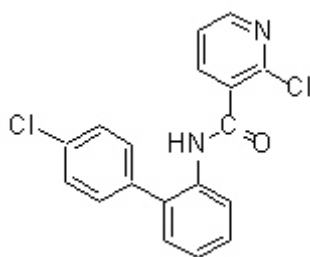
Aspectos metabólicos y medioambientales.

Se degrada rápidamente en el medio ambiente.

**3.1.1.5. Boscalid.**

Nomenclatura y estructura.

Nombre químico según IUPAC: 2-Cloro-N-(4'-clorobifenil-2-il)nicotinamida (Figura 3.5.).



**Figura 3.5.** Estructura molecular de boscalid.

Propiedades físico-químicas.

Punto de fusión: 142,8-143,8 °C

Tensión de vapor:  $7,2 \times 10^{-4}$  mPa

Coefficiente de partición n-octanol/agua ( $K_{ow}$ ):  $\log P = 2,96$

Solubilidad en agua: 4,6 mg/l (20 °C).

Modo de acción.

Inhibe el complejo II en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Es un fungicida foliar que se utiliza para el control de oídio, *Alternaria* spp., *Botrytis* spp., *Sclerotinia* spp. y *Monilia* spp. en distintas frutas y verduras.

Formulaciones.

“Cantus”, “Endura” y las mezclas “Signum” (+ piraclostrobin) y “Collis” (+ kresoxim-metil) (BASF).

Aspectos toxicológicos.

DL<sub>50</sub> oral y aguda: >5000 mg/kg.

NOEL: ratas 5 mg/kg.

IDA: 0,04 mg/kg.

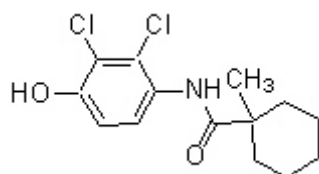
Aspectos metabólicos y medioambientales.

En animales tienen una excreción rápida, principalmente por las heces. Y en el suelo se degrada de manera moderada.

**3.1.1.6. Fenhexamida.**

Nomenclatura y estructura

Nombre químico según IUPAC: 2',3'-dichloro-4'-hidroxi-1-metilciclohexancarboxanilida (Figura 3.6.).



**Figura 3.6.** Estructura molecular de fenhexamida.

Propiedades físico-químicas.

Punto de fusión: 153 °C.

Tensión de vapor:  $4 \times 10^{-4}$  mPa (20 °C).

Coefficiente de partición n-octanol/agua (K<sub>OW</sub>): log P = 3,51 (pH 7, 20 °C).

Solubilidad en agua: 20 mg/l (pH 5-7, 20 °C).

Modo de acción.

Fungicida foliar con acción protectora. Se utiliza para el control de *Botrytis cinerea*, *Monilia* spp. y patógenos relacionados con las uvas, las bayas, frutas de hueso, cítricos, hortalizas y plantas ornamentales.

Formulaciones.

"Decree" y "Elevate" (en cooperación con Bayer) (Arvesta); 'Password' (Nihon Bayer); 'Teldor' (Bayer CropScience).

Aspectos toxicológicos.

DL<sub>50</sub> oral y aguda: ratas > 5000 mg/kg.

NOEL: ratas 500 y ratones 800 mg/kg (24 meses).

IDA: 0,183 mg/kg.

No tiene potencial mutagénico.

Aspectos metabólicos y medioambientales.

En ratas es absorbido y eliminado rápidamente sin acumulación en 48 horas. La mayor eliminación se realiza por las heces (61%), mientras que la eliminación renal supone entre el 15-36% de la dosis total administrada. En los sistemas acuáticos, fenhexamida se degrada rápidamente y completamente, dando como resultado la formación de CO<sub>2</sub>.

**3.1.2. FORMULADOS COMERCIALES**

Los fungicidas estudiados se aplicaron tanto en campo sobre la vid, como en bodega para fortificar la uva estrujada en el primer paso de la vinificación, como formulados comerciales.

En la Tabla 3.1, se exponen las materias activas utilizadas, sus formulaciones comerciales y concentraciones, así como sus dosis de aplicación, junto a sus características más destacables desde el punto de vista agrícola, su plazo de seguridad (PS) y límite máximo de residuos legislado en uva (LMR).

**Tabla 3.1.** *Formulados comerciales utilizados para aplicación en campo y bodega.*

Materia activa	Formulación comercial	Concentración en formulado	Dosis de aplicación	PS (días)	LMR (ppm) uva
Fenhexamida	Teldor® Granulado dispersable	500 gr/kg	5 mg/l	14	5
Mepanipirim	Frupica® Polvo mojable	500 gr/l	3 mg/l	21	3
Ciazofamida	Mildicut® Suspensión concentrada	2,5% p/v	0,5 mg/l	21	0,5
Boscalid	Collis® Suspensión concentrada	200 gr/l	0,4 l/ha	28	0,1
Kresoxim-metil		100 gr/l			0,2
Metrafenona	Vivando® Suspensión concentrada	500 gr/l	0,2 l/ha	28	0,5

### **3.1.3. MATERIAL VEGETAL ESTUDIADO.**

#### **3.1.3.1. Uvas tintas de vinificación.**

##### **3.1.3.1.1. *Vitis vinifera* var. Monastrell.**

Se utilizó uva tinta orgánica (*Vitis vinifera*, var. Monastrell) cultivada en Jumilla (Murcia), como matriz control exenta de residuos de fungicidas. Las viñas tenían entre 25-30 años de edad y un marco de plantación de 2,5 x 2,5 m<sup>2</sup>. Las parcelas pertenecían a Bodegas San Isidro Sociedad Cooperativa (D.O.P. Jumilla). Las plantas no habían tenido tratamiento de agroquímicos y se encontraban en perfecto estado nutricional y excelentes condiciones fisiológicas.

##### **3.1.3.1.2. *Vitis vinifera* var. Tempranillo.**

Las viñas tenían 28 años de edad y su plantación abarca una superficie aproximada de 3.000 m<sup>2</sup>, con 40-50 cepas por fila, con una separación entre filas de 2,6 m y entre cepas de 1,2 m. El sistema de poda fue de vaso, el riego por goteo y la carga de la cosecha de 8.000 kg/ha. Las parcelas pertenecían a las Bodegas D. Mateos S.L., que se encuentra en Aldeanueva de Ebro, La Rioja, pertenecientes a la D.O.Ca. La Rioja.

##### **3.1.3.1.3. *Vitis vinifera* var. Graciano.**

Las viñas tenían 18 años de edad y la plantación presentaba una superficie aproximada de 3.000 m<sup>2</sup>, con 40-50 cepas por fila, con una separación entre filas de 2,6 m y entre cepas de 1,2 m. El sistema de poda fue de espaldera, el riego por goteo y la carga de la cosecha de 10.000 kg/ha. Las parcelas pertenecían a las Bodegas D. Mateos S.L., ubicadas en Aldeanueva de Ebro, La Rioja pertenecientes a la D.O.Ca. La Rioja.

### **3.1.4. REACTIVOS Y DISOLVENTES.**

#### **Determinación de polifenoles y actividad antioxidante.**

Se utilizaron los siguientes productos: ácido fórmico, metanol y acetato de etilo para cromatografía (Merck, Darmstad, Alemania), cianidina 3-rutinósido (Polifenoles AS, Sandnes, Noruega), rutina (Merck, Darmstad, Alemania), ácido clorogénico (Sigma, Madrid, Sapin), trans-resveratrol (Sigma, Madrid, España), Trolox® (6-hidroxi-2,5,7,8-ácido-tetrametilcroman 2-carboxílico) y 2,2-difenil-1-picrilhidracilo (DPPH •) (Sigma, Steinheim, Alemania), reactivo de Folin-Ciocalteu de Sigma Aldrich Chemie (St Louis, USA), carbonato sódico de Sigma-Aldrich (Madrid, España). El agua ultrapura se obtuvo utilizando un sistema Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA).

#### **Extracción, validación y análisis de residuos de fungicidas en vino y dializados.**

Se usó bicarbonato sódico, 99% de pureza, de Scharlau (Barcelona, España); pepsina porcina de mucosa gástrica, 1:3000 NF de Sigma Aldrich Chemie (St. Louis, USA); ácido clorhídrico al 37%, de Scharlau (Barcelona, España); sales biliares, de Sigma Aldrich Chemie (St. Louis, USA); pancreatina de páncreas de porcino, de Sigma Aldrich Chemie (St. Louis, USA); hidróxido sódico, 98% de pureza, de Scharlau (Barcelona, España); formiato amónico, 95% de pureza, de Fluka (Buchs, Suiza); sulfato magnésico anhidro, 97% de pureza, de Fluka (Buchs, Suiza); cloruro sódico, 99,5% de pureza, de Fluka (Buchs, Suiza); citrato disódico sesquihidratado, 99% de pureza, de Aldrich (Milwaukee, USA) y citrato trisódico dihidratado, 99% de pureza, de Sigma (St. Louis, USA).

Los disolventes empleados fueron: acetonitrilo de calidad cromatografía líquida en gradiente, de Scharlau (Barcelona, España); ácido fórmico 98% grado reactivo de Fluka (Buchs, Suiza); y agua milli-Q, procedente de un sistema Millipore de Purificación Pak (Billerica, USA).

### **3.1.5. APARATOS E INSTRUMENTACIÓN.**

#### **Aplicación de productos fitosanitarios.**

La aplicación de los productos fitosanitarios en campo se realizó mediante un atomizador Hardi modelo Mercury Viña (Taastrup, Denmark).

#### **Determinación de polifenoles y actividad antioxidante.**

Espectrofotómetro UV-VIS 190 a 1.100 nm, Varian Cary 50, con Software WinUV (Victoria, Australia). Filtros 0,45  $\mu\text{m}$ , tipo Millex HV13 (Millipore Corp., Bedford, MA). Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de diodo-array (HPLC-DAD), acoplado a una bomba L-6200 de Merck-Hitachi (Merck-Hitachi, Darmstadt, Alemania) y detector de diodo-array Shimadzu SPD-M6A UV (Shimadzu, Kyoto, Japón) equipado con una columna de fase reversa, LiChrospher® RP 100-18 (25 x 0,4 cm, 5  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula) (Merck, Darmstadt, Alemania).

#### **Extracción de fungicidas y ensayos de biodisponibilidad.**

Se utilizaron: centrífuga Heraeus Cristo (Osterode, Alemania); congelador CFZ30JC, de Zanussi (Luton, Reino Unido); cámara de refrigeración semi industrial con control de temperatura; baño con agitación y control de temperatura, de Julabo (Seelbach, Alemania); pH-metro Crison (Barcelona, España); micropipetas para volúmenes de 10-1000  $\mu\text{l}$  y 1-10 ml y puntas adecuadas, de Rainin (Oakland, USA); balanza analítica, capaz de medir hasta 0,1 mg, de Sartorius AG (Goettingen, Alemania); granatario capaz de medir hasta 3.000 g con precisión de 0,1 g, de Gram Precision (Barcelona, España); dispensadores de volumen de 1-10 ml y 2,5-25 ml, de Brand (Wertheim, Alemania). También se utilizaron: viales de 2 ml, para autoinyector, 32 x 11,6 mm, con cápsula y septum, de Ziemer GmbH (Mannheim, Alemania); membrana de diálisis, con tamaño de poro de 12.000 Da, procedente de la casa Sigma (St. Louis, USA); y tubos de centrífuga de polipropileno, 114 x 28 mm, de 50 ml, con tapón a rosca y de un único uso, de Sarstedt (Nümbrecht, Alemania).

## Determinación de residuos de fungicidas

Para el análisis de los residuos, se empleó un cromatógrafo de líquidos-masas mod. 1260 Infinity (HPLC-MS), con una columna Poroshell 120 EC-C18 (3,0 x 100 mm, 2,7 micras), acoplado a un detector de masas de trampa de iones con analizador triple cuadrupolo (MS QQQ) modelo Triple Quad LC/MS 6410B, con scan dynamic MRM, todo de Agilent Technologies (Palo Alto, USA).

## 3.2. MÉTODOS.

En este apartado, se describe la aplicación en campo, la vinificación realizada, el método de extracción y análisis empleados para los plaguicidas seleccionados, así como su validación y el control de calidad realizado en el laboratorio. Además de la cuantificación de compuestos fenólicos y actividad antioxidante y los ensayos de biodisponibilidad *in vitro* realizados en vino.

### 3.2.1. APLICACIONES EN CAMPO.

Las parcelas experimentales se encontraban ubicadas en La Rioja, en el municipio de Aldeanueva del Ebro, plantada de viñedos de uvas tintas variedades Tempranillo y Graciano, pertenecientes a las Bodegas D. Mateos S.L. (adscritos a D.O.Ca. Rioja), y son representativas del cultivo de uva de vinificación en la zona (Figura 3.7.).



Figura 3.7. Localización geográfica de las parcelas experimentales.



Se seleccionó, para cada variedad de uva, una parcela por tratamiento formada por 6 filas de unas 240–300 cepas, tomándose muestra solamente de las dos filas centrales. Asimismo se acotaron parcelas testigo, situadas lo suficientemente cerca de las seleccionadas para desarrollar los distintos ensayos con objeto de garantizar idéntico cultivo y condiciones climáticas, pero suficientemente separadas para evitar cualquier riesgo de contaminación procedente de los distintos tratamientos fitosanitarios realizados.

Los ensayos con los productos comerciales Collis® (Boscalid + Kresoxim-metil) y Vivando® (Metrafenona), se realizaron siguiendo el código de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). Utilizando las dosis recomendadas para este cultivo, calendario apropiado según las prácticas agronómicas habituales y respetando los plazos de seguridad establecidos para cada fungicida. Las dosis aplicadas se encontraban en el punto medio del intervalo permitido por el MAPA.

Las parcelas (testigo y tratadas) fueron cultivadas según las prácticas agronómicas habituales de la zona y en concreto para el control de plagas fueron objeto de tratamientos fitosanitarios durante los meses de abril a julio de cada uno de los años con los siguientes productos: azufre mojable, metiram, penconazol, cimoxanilo, triadimenol, pirimetanil, oxiclورو de cobre, folpet, piraclostrobin y dinocap.

Los tratamientos específicos de los fungicidas boscalid, kresoxim-metil y metrafenona se realizaron aplicando los productos comerciales Collis® y Vivando® en condiciones de Buenas Prácticas Agrícolas (BPA). En 2014 se realizó además un tratamiento en condiciones de Críticas Prácticas Agrícolas (CPA), es decir aplicando los plaguicidas a las dosis recomendadas y tomando muestra 2 horas después, sin respetar el plazo de seguridad. En la Tabla 3.2 se exponen las dosis de aplicación y las fechas en las que se realizaron los tratamientos.

Tras la vendimia, las uvas procedentes de las parcelas experimentales (Tempranillo y Graciano) tratadas bajo BPA con Collis® y Vivando® se llevaron a la bodega experimental de la Universidad de La Rioja para la elaboración del vino.

**Tabla 3.2.** Concentraciones y fechas de los tratamientos fitosanitarios en campo.

Producto tratamiento y dosis utilizada	Fecha	Vendimia
Collis 0,4 l/ha Vivando 0,2 l/ha	20/04/2012	17/09/2012
	25/05/2012	
	20/06/2012	
	12/07/2012	
Collis 0,4 l/ha Vivando 0,2 l/ha	10/04/2013	03/10/2013
	14/05/2013	
	22/07/2013	
Collis 0,4 l/ha Vivando 0,2 l/ha	24/04/2014	25/09/2014
	17/06/2014	
	01/07/2014	
	14/07/2014	
	25/09/2014 CPA	

Sobre las uvas vendimiadas de las parcelas testigo y ya en bodega, se realizaron fortificaciones con los formulados comerciales Mildicut® (Ciazofamida), Frupica® (Mepanipirim) y Teldor® (Fenhexamida) a las dosis equivalentes a los correspondientes LMR establecidos en la legislación para uva, que son 0,5 mg/kg, 3 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente. Dichas fortificaciones se hicieron en uva testigo estrujada procedente de las variedades tempranillo y graciano y antes de introducir el mosto en los depósitos para la vinificación (Tabla 3.3).

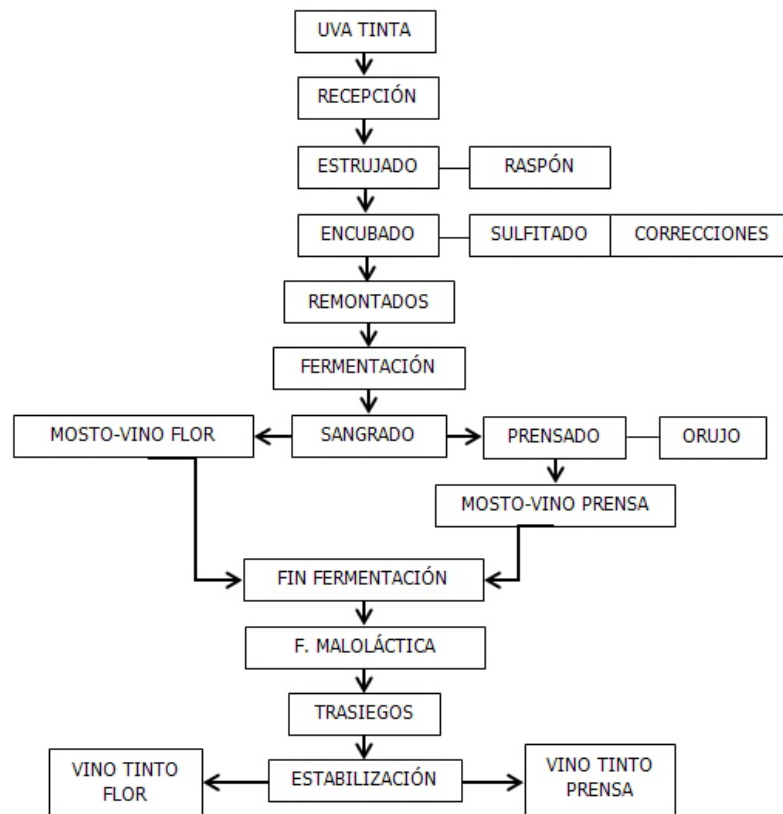
**Tabla 3.3.** Fortificaciones en depósitos.

Variedad uva	Año	Formulado comercial	Materia activa	Cantidad añadida
Tempranillo Graciano	2012	Teldor 50 WC	Fenhexamida	250 mg/50 l
		Fuprica 50 WP	Mepanipirim	150 mg/ 50 l
Tempranillo	2013	Teldor 50 WC	Fenhexamida	250 mg/ 50 l
		Fuprica 50 WP	Mepanipirim	150 mg/ 50 l
Tempranillo Graciano	2014	Mildicut SC	Ciazofamida	250 cc/ 50 l

### 3.2.2. VINIFICACIÓN.

En todos los casos las vinificaciones se desarrollaron en depósitos de 50 l según el procedimiento clásico para la elaboración de vino tinto en la D.O.Ca Rioja (Figura

3.8). Se realizaron 5 microvinificaciones idénticas, para cada uno de los tratamientos en 2012 y 2013: testigo, Collis<sup>®</sup>-BPA, Vivando<sup>®</sup>-BPA y fortificaciones con Teldor<sup>®</sup> y Frupica<sup>®</sup>; y 6 microvinificaciones idénticas: testigo, Collis<sup>®</sup>-BPA, Vivando<sup>®</sup>-BPA, Collis<sup>®</sup>-CPA, Vivando<sup>®</sup>-CPA y fortificaciones con Mildicut<sup>®</sup> para cada uno de los tratamientos, en 2014. Todas las microvinificaciones se realizaron por duplicado.



**Figura 3.8.** Esquema de vinificación tradicional en tinto (D.O. Ca Rioja).

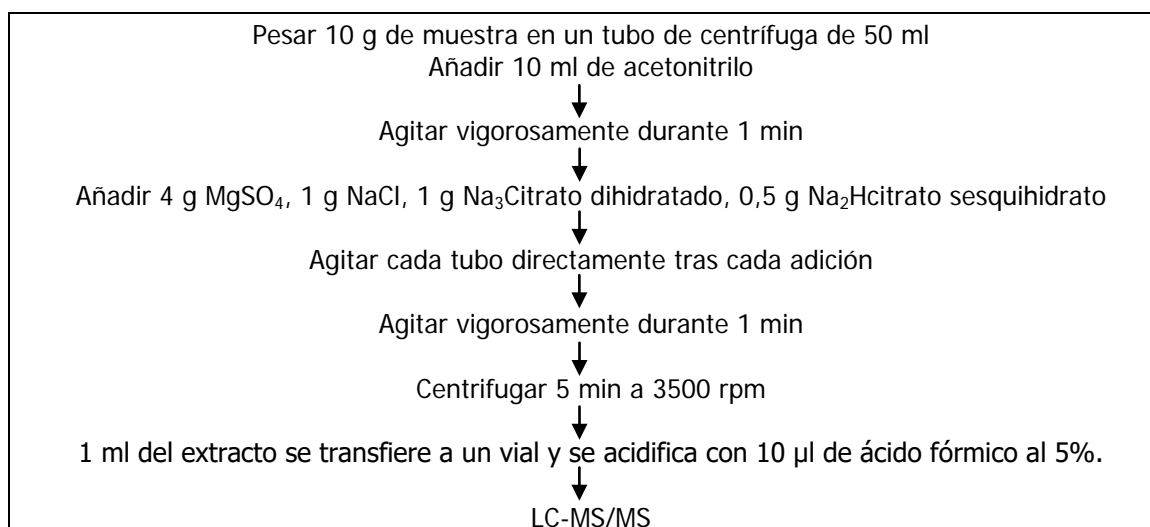
La evolución de las microvinificaciones fue controlada en la Bodega experimental de la Universidad de la Rioja, mediante la medida de densidad y recuento del número de levaduras viables. Se observó una disminución en el número de levaduras viables en aquellas microvinificaciones que provenían de uvas tratadas, debido a la presencia de residuos de plaguicidas, pero sin perturbar la evolución de las microvinificaciones, que en todos los casos duraron 14 días. Tras el trasiego de los vinos se llevó a cabo una clarificación de los mismos con gelatina a una dosis de 12 ml/hl. Por último, todos los vinos fueron embotellados y quedaron dispuestos para realizar los distintos análisis objeto de la Memoria.

### 3.2.3. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.

Para la puesta a punto y validación de la metodología analítica, tanto en uvas como vinos, se utilizaron matrices testigo (exentas de residuos de plaguicidas) procedentes de uvas y vinos ecológicos varietales de Monastrell elaborados en la Bodega San Isidro (Jumilla, Murcia), siguiendo para estos últimos el protocolo de la D.O.P. Jumilla.

#### 3.2.3.1. Extracción (QuEChERS) en uva y vino.

El procedimiento de extracción utilizado ha sido una adaptación del método QuEChERS (Anastassiades et al., 2003, 2007), que tiene en cuenta la composición de las matrices a estudiar y las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas (Souci et al., 1999; Macbean, 2013; USDA, 2013) (Figura 3.9.).



**Figura 3.9.** Esquema del método de extracción utilizado.

En tubos de centrifuga de 50 ml de polipropileno, se pesan 10 g de muestra y se añaden 10 ml de acetonitrilo. El tubo se cierra y se agita a mano vigorosamente durante 1 minuto, en frío. Añadimos la mezcla de sales tampón para inducir la separación de fases y la partición. El tubo se cierra y se agita enérgicamente durante 1 minuto a mano. A continuación se centrifuga a 3.500 rpm durante 5 min. El extracto obtenido acidificado, se puede analizar directamente mediante cromatografía.

### 3.2.3.2. Determinación por CL-MS/MS.

Se ha utilizado un cromatógrafo HPLC Agilent Technologies modelo 1260 Infinity (LC-MS/MS QQQ) equipado con una columna Poroshell 120 EC-C18 (3 mm x100 mm x 2,7  $\mu$ m), termostataada a 40°C y con un flujo de 0,6 ml/min, siendo el programa de inyección: 5 $\mu$ l muestra + 95 $\mu$ l de fase móvil. El tiempo de análisis se fijó en 12 minutos dejando 5 minutos de tiempo de estabilización. Las fases móviles empleadas fueron: A) ácido fórmico en acetonitrilo 0,1% (v/v) y B) ácido fórmico al 0,1% y 2 mM de formiato de amonio en H<sub>2</sub>O, con el gradiente de flujos expuesto en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** Gradientes de flujos utilizados en el análisis LC-MS/MS QqQ.

Tiempo (min)	%A	%B
0	20	80
10	100	0
12	20	80

Para determinar los fungicidas se empleó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo 6410B equipado con una fuente ESI (electrospray ionization) en modo positivo.

Se utilizó como gas nebulizador nitrógeno y gas de colisión argón. En las siguientes condiciones: Tensión capilar de 3000 V y temperatura de la fuente y de desolvatación de 120 °C y 350 °C, respectivamente; flujo de gas de cono 1 l/min y el flujo de gas de desolvatación 9 l/min; detección por Monitoreo Multi-Reacción (MRM) para todos los compuestos con un tiempo de ciclo de 500 ms. Los parámetros ESI y MS se optimizan individualmente para cada compuesto diana y se detallan en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Parámetros experimentales y condiciones de LC-MS/MS de los fungicidas analizados.

Fungicidas	Ion precursor	Ion cuantificador	Ion confirmatorio	Fragmentación(v)	t <sub>R</sub> (min.)
Boscalid	[M+H] <sup>+</sup> =342,9	342,9 →306,9	342,9 →139,9	130	7,49
Ciazofamida	[M+H] <sup>+</sup> =325,1	325,1 →108,0	325,1 →261,0	80	8,44
Fenhexamida	[M+H] <sup>+</sup> =302,1	302,1 →97,1	302,1 →55,1	130	7,51
Kresoxim-metil	[M+H] <sup>+</sup> =314,1	314,1 →267,0	314,1 →206,1	80	8,52
Mepanipirim	[M+H] <sup>+</sup> =223,9	223,9 →77,1	223,9 →106,0	130	7,65
Metrafenona	[M+H] <sup>+</sup> =409,0	409,0 →227,0	409,0 →209,0	130	9,44

### **3.2.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS.**

La validación del método analítico se realizó caracterizando su alcance, especificidad, exactitud, sensibilidad, repetibilidad y reproducibilidad, siguiendo los criterios de las Guías para análisis de residuos de plaguicidas editadas por la Dirección General de Sanidad y Consumo de la Unión Europea y la Norma 17025 (SANCO, 2013 y UNE-EN ISO/IEC 17025, 2005). A continuación, se describen los aspectos caracterizados y los criterios de aceptación adoptados en la validación analítica del método utilizado.

#### **3.2.4.1. Identificación, confirmación y cuantificación.**

La identificación de las materias activas se realizó por comparación de los tiempos de retención ( $t_R$ ) encontrados en las muestras, con los de un patrón externo, inyectados ambos en el sistema cromatográfico con las mismas condiciones analíticas. Si tienen un rango de  $t_R \pm 2\%$  serán admitidas como identificaciones positivas.

La confirmación en espectrometría de masas se realizó seleccionando dos transiciones MRM y energías de colisión óptimas. Se confirma si, en el espectro de masas, la relación entre las transiciones de cuantificación e identificación cumplen los requisitos de la Guía SANCO. La cuantificación en CL-MS, se basó en la medida del área cromatográfica de cada pico, calculando su concentración mediante el uso de rectas de calibrado preparadas en matriz.

La selectividad y especificidad se estudiaron mediante el método de adiciones. Añadiendo una cantidad conocida de materia activa a extractos de las matrices seleccionadas y posterior comparación de la respuesta de las muestras, con la respuesta de un patrón de la misma concentración, sin observar diferencias significativas entre ambas.

#### **3.2.4.2. Linealidad de respuesta del detector.**

La linealidad de respuesta del detector se determinó con cinco puntos de calibración dentro del rango de análisis propuesto y una sola inyección de cada uno,

para cada materia activa. El ajuste lineal de los datos a una curva de regresión se evaluó para cada materia activa mediante el método de mínimos cuadrados, aceptando la linealidad de respuesta del detector entre las concentraciones inyectadas siempre que el coeficiente de correlación lineal ( $R^2$ ) fuera superior a 0,98 y la desviación estándar relativa (RSD) inferior al 20% para los factores de respuesta. La recta de regresión no fue forzada a pasar por el origen. Las curvas de calibración de los compuestos analizados se obtuvieron por triplicado a cinco concentraciones (5, 10, 25, 50 y 100 mg/l) mediante el uso de acetonitrilo puro y la solución de extracto de matriz para evaluar los posibles efectos de la matriz.

#### **3.2.4.3. Límites de detección y cuantificación.**

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

El límite de cuantificación (LQ) se calculó para cada uno de los analitos, determinando la menor concentración de materia activa presente en el extracto de cada matriz, cuya respuesta en el cromatograma puede cuantificarse con exactitud y precisión (relación señal/ruido > 10).

#### **3.2.4.4. Precisión y exactitud.**

Para el cálculo de la repetibilidad del método se procesaron de forma consecutiva 10 muestras fortificadas a las concentraciones iguales a los límites de cuantificación (LQ) y 10 veces superior (10LQ) de cada uno de los fungicidas estudiados. Los resultados obtenidos fueron sometidos a tratamiento estadístico y el criterio de aceptación fue que el valor del coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD) obtenido fuese  $\leq 20\%$ .

Para el cálculo de la reproducibilidad, se procesaron 10 muestras fortificadas a dos niveles (LQ y 10LQ) en cinco días diferentes y se sometieron a tratamiento estadístico con el fin de calcular el coeficiente de variación para cada fungicida. Se aceptó la reproducibilidad válida cuando el CV fue  $\leq 20\%$ .

Para la evaluación de la exactitud o porcentaje de recuperación se extrajeron diez muestras fortificadas a los dos niveles citados, LQ y 10LQ, comparando sus resultados con patrones preparados a las mismas concentraciones y analizados todos en la misma secuencia. El criterio de aceptación fue que la recuperación media para cada conjunto de 10 réplicas estuviese comprendida entre 70-120% con un  $CV \leq 20\%$ .

#### **3.2.4.5. Control de calidad.**

El control de calidad interno se llevó a cabo de manera rutinaria, incluyendo en cada secuencia de análisis tres puntos de calibración, análisis de blancos de disolvente y blancos de muestra y fortificaciones a concentraciones de 0,01 y 0,05 mg/l.

#### **3.2.5. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.**

La capacidad captadora de radicales libres de la uva y el vino se evalúa haciendo reaccionar la muestra con el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) según el método descrito por Bondet et al., 1997. En el extracto metanólico de la muestra se determina la capacidad antioxidante por medida en un espectrofotómetro Varian Cary UV, frente a un blanco de 900  $\mu$ l de metanol. Posteriormente a este blanco se añaden 95  $\mu$ l de DPPH, y se realiza la primera lectura de absorbancia  $A_0$ . En este momento se adicionan 5  $\mu$ l de muestra y se observa la variación de absorbancia durante 60 minutos, realizando lecturas a intervalos de 1 minuto

La disolución patrón de DPPH se prepara añadiendo a 0,036g de DPPH 80 ml de metanol, y posteriormente se guarda en frío, protegido de la luz. En estas condiciones se puede conservar 1 semana.

El poder antioxidante de la muestra hace disminuir la concentración de DPPH y por tanto el color azul intenso que presenta este radical a lo largo del tiempo. Esta disminución, que se mide a una longitud de onda de 517 nm, depende de la concentración de antioxidantes presente en la muestra, ya que la concentración de radical DPPH es constante en todas las determinaciones.

La capacidad antioxidante de la muestra se expresa referida a la capacidad antioxidante del Trólox, un derivado soluble de la vitamina E capaz de ejercer una



importante actividad antioxidante. Para ello se realiza una curva patrón utilizando 50  $\mu$ l de diferentes concentraciones de Trólox con 950  $\mu$ l del radical DPPH (0,1 mM), midiendo la absorbancia a 517 nm. La disolución madre de Trólox (Sigma, Madrid, España) fue de 100000  $\mu$ M, realizada disolviendo 25 mg de Trólox en 10 ml de metanol. La recta de calibrado obtenida fue:

$$y = 31554x \quad R^2 = 0,9938$$

Siendo  $y$  = Absorbancia inicial – Absorbancia final, y  $x$  = concentración.

El análisis de la actividad antioxidante de las muestras de vino se realizó tras su embotellado. Las muestras son analizadas por triplicado y los resultados de la capacidad antioxidante se expresan como valores medios  $\pm$  desviación estándar de Equivalentes de Trolox (mMET/ml).

### **3.2.6. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN VINO.**

#### **3.2.6.1. Polifenoles totales.**

Los fenoles totales han sido medidos mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965), metodología basada en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. La coloración azul producida se mide a una absorbancia máxima de 765nm.

La muestra en blanco se prepara en un matraz aforado de 10 ml, adicionando 0.5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 ml de carbonato sódico al 20% (p/v) y completando el volumen total con agua destilada.

Las muestras se preparan adicionando en un matraz aforado de 10 ml, y por este orden, 40  $\mu$ l de vino, 0,5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu y 2 ml de de carbonato sódico al 20% (p/v), completando el volumen con agua destilada. Se determina la absorbancia a 765 nm frente al blanco. Las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado y los resultados se expresaron como mg de ácido gálico (AEG) por litro de vino.

### **3.2.6.2. Compuestos fenólicos.**

La determinación de antocianos, flavonoles y derivados hidroxicinámicos en los vinos se realiza mediante inyección directa en HPLC-DAD, de 20 µl de vino, previo paso por un filtro de 0,45 µm.

Los estilbenos se extraen mediante la mezcla de 5 ml de vino con 5 de acetato de etilo y agitando vigorosamente. Después, la fase orgánica se separa usando un embudo decantador, se lleva a secar en un rotavapor y se vuelve a disolver en 0,5 ml de metanol y se filtran a través de un filtro de 0,45 µm. El extracto obtenido es directamente inyectado en el HPLC-DAD.

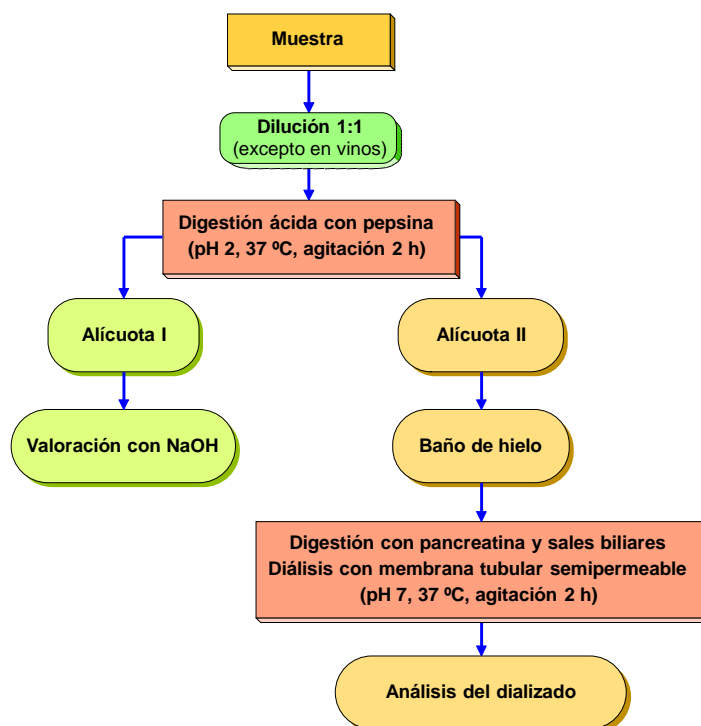
La fase móvil es una mezcla de agua y ácido fórmico al 5% (disolvente A) y metanol grado HPLC (disolvente B), a una velocidad de flujo de 1 ml/min. La elución se lleva a cabo comenzando con un gradiente, 2% de B hasta 32% en 30 min, 40% a los 40 min y 95% a los 50 min y se mantiene durante 5 min en una elución isocrática. Los compuestos se caracterizaron por comparación cromatográfica con sus espectros en el detector de fotodiodos.

Todas las antocianos (cianidina 3-glucósido, pelargonidina 3-glucósido, petunidina 3-glucósido, peonidina 3-glucósido, malvidina-3-glucósido y derivados acilados) fueron cuantificadas como cianidina 3-rutinósido, por absorción a 510 nm. Los flavonoles (miricetina 3-glucósido, quercetina 3-glucósido, kaempferol 3-glucósido, miricetina, quercetina) como rutina a 360 nm y los derivados hidroxicinámicos (Cafeoil-tartárico, feruloil-tartárico, cumaroil-tartárico) como ácido clorogénico a 320 nm. Por último, los estilbenos (cis y trans resveratrol y piceidos) fueron cuantificados como trans-resveratrol a 320 nm (Cantos et al., 2003).

Los compuestos fenólicos totales se calcularon como la suma de las cantidades de antocianos, flavonoles, hidroxicinámicos y estilbenos, detectados en cada cromatograma. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valor medio  $\pm$  desviación estándar (SD). La precisión y la exactitud del método se verificaron y se adecuaron para los objetivos buscados.

### 3.2.7. ESTUDIO DE BIODISPONIBILIDAD *IN VITRO*.

El estudio de biodisponibilidad se realizó simulando la digestión gastrointestinal y el proceso de absorción intestinal. Se tomaron 40 ml de estándares de los plaguicidas a las concentraciones de 0,1; 0,5; 1; 2; 5 y 10 mg/kg, que fueron preparados en acetonitrilo:agua 50:50 (V:V) y muestras de 40 g de uva y 40 ml de cada tipo de vinificación, fortificadas a las mismas concentraciones utilizadas para los estándares. En la Figura 3.10., se expone un esquema del procedimiento.



**Figura 3.10.** Esquema del ensayo de biodisponibilidad *in vitro*.

Inicialmente, el pH de la muestra se mide y se valora con HCl hasta pH 2. Entonces, se añaden 6 ml de la solución de pepsina (160 mg/l) y se realiza la digestión ácida durante 2 horas, a 37°C, en un baño con agitación moderada constante, imitando los peristaltismos y la temperatura corporal humana. Durante este tiempo, se verificó el mantenimiento del pH en 2.

En segundo lugar, una alícuota de la muestra, a la que se añaden 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina (4 mg/l), se valora con NaOH hasta pH 7, mientras la otra alícuota permanece en un baño de hielo con la digestión ácida

detenida. En tercer lugar, esta segunda alícuota se somete a la segunda digestión y a la diálisis, a 37°C, durante 2 h y en un baño con agitación constante moderada, imitando las condiciones humanas. Para ello, se introduce una membrana tubular sellada, con un volumen de 10 ml de una solución preparada con una cantidad de  $\text{NaHCO}_3$  equivalente a la acidez valorada en la primera alícuota y diluida hasta 25 ml con agua Milli-Q. Media hora después, se añaden los 5 ml de la solución de sales biliares y pancreatina. Finalmente, se recoge el dializado, se mide y analiza (Miller et al., 1981; Schricker et al., 1981; Gil-Izquierdo et al., 2002).



#### **4. RESULTADOS.**

## 4.1. RESIDUOS DE FUNGICIDAS.

### 4.1.1. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO DE RESIDUOS DE FUNGICIDAS.

Tanto en los cromatogramas correspondientes al acetonitrilo, como en los pertenecientes a extractos de matrices en blanco (uva y vino), no se detectaron picos cromatográficos con áreas superiores al 30% del límite de cuantificación (LQ), en los tiempos de retención de los compuestos de interés.

La linealidad de respuesta se obtuvo en los correspondientes cromatogramas, a partir de las áreas de los picos de los diferentes plaguicidas, y se evaluó mediante la preparación de diferentes rectas de calibración con disoluciones estándar añadidas a matrices de uva y vino, con el fin de evitar posibles interferencias causadas por el efecto de la matriz. La Tabla 4.1., muestra las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas, sus coeficientes de correlación ( $R^2$ ) y desviaciones estándar relativas (RSD).

**Tabla 4.1.** Rectas de regresión, coeficientes de correlación ( $R^2$ ) y desviación estándar relativa (RSD) de los fungicidas estudiados en uva y vino.

Fungicidas	Uva			Vino		
	Ecuación de regresión	$R^2$	%RSD	Ecuación de regresión	$R^2$	%RSD
Boscalid	$y = 83,76x - 6,49$	0,999	6,52	$y = 1702,69x + 386,06$	1,000	2,36
Ciazofamida	$y = 219,95x + 144,95$	0,999	7,85	$y = 1031,24x + 415,03$	0,999	5,62
Fenhexamida	$y = 48,95x + 66,39$	0,999	16,88	$y = 223,13x + 63,88$	1,000	6,66
Kresoxim-metil	$y = 106,86x + 25,97$	0,999	13,05	$y = 412,49x + 331,89$	0,999	3,34
Mepanipirim	$y = 414,28x + 433,75$	0,998	17,87	$y = 779,27x + 2952,92$	0,999	11,04
Metrafenona	$y = 111,79x + 105,40$	0,999	11,05	$y = 416,77x + 139,72$	0,999	3,18

Como se puede observar, todas las ecuaciones presentan valores del coeficiente de correlación superiores a 0,998 y unas desviaciones estándar relativas (RSD)

inferiores al 18%; ajustándose a las exigencias de la Guía SANCO y por tanto las consideramos válidas en ambas matrices. Para todos los plaguicidas el límite de detección (LD) fue de 0,003 mg/kg y el límite de cuantificación (LQ) de 0,01 mg/kg. Este último, como muestra la Tabla 4.2., es hasta 50 veces más bajo que el menor límite máximo de residuos (LMR) establecido para estos fungicidas en uva de vinificación, ya que no están establecidos en vino.

**Tabla 4.2.** Límites de detección, cuantificación y LMR en los fungicidas estudiados (mg/kg).

Fungicidas	Uva			Vino		
	LD	LQ	LMR	LD	LQ	LMR
Boscalid	0,003	0,01	5	0,003	0,01	-
Ciazofamida	0,003	0,01	0,5	0,003	0,01	-
Fenhexamida	0,003	0,01	5	0,003	0,01	-
Kresoxim-metil	0,003	0,01	1	0,003	0,01	-
Mepanipirim	0,003	0,01	3	0,003	0,01	-
Metrafenona	0,003	0,01	0,5	0,003	0,01	-

Para el estudio de precisión y exactitud, se analizaron 10 réplicas de muestras de uva y vinos fortificados con cantidades iguales al LQ y diez veces superior (10LQ), en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. En todos los casos, se aplicaron las condiciones de aceptación y rechazo especificados en las directrices SANCO y descritas en el apartado 3.2.4. de Materiales y Métodos.

En la Tabla 4.3., se muestran los valores de desviación estándar relativa (RSD) obtenidos en el estudio de la precisión en uva y vino en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad. Como se puede observar, las desviaciones estándar de la repetibilidad como de la reproducibilidad para los fungicidas estudiados tanto en la matriz uva como en la del vino se encuentran entre 1,57%-18,92%, y 1,91%-17,98%, respectivamente, no superando en ningún caso el 20%, que es el límite de aceptación fijado.

En las Tablas 4.4., 4.5., 4.6. y 4.7., se muestran los valores de exactitud obtenidos en el análisis de las 10 réplicas para los dos niveles de fortificación (LQ y 10LQ) para uva y vino, en condiciones de repetibilidad y reproducibilidad.

**Tabla 4.3.** Desviación estándar relativa en el estudio de la precisión en uva y vino.

Fungicidas	UVA RSD (%)				Vino RSD (%)			
	Repetibilidad		Reproducibilidad		Repetibilidad		Reproducibilidad	
	LQ	10LQ	LQ	10LQ	LQ	10LQ	LQ	10LQ
Boscalid	4,33	3,18	17,09	3,74	4,76	2,75	8,55	2,88
Ciazofamida	3,01	3,61	11,06	4,65	6,28	3,51	6,82	3,72
Fenhexamida	4,26	1,57	7,78	5,90	5,33	2,54	9,47	3,01
Kresoxim-metil	5,82	5,85	18,92	7,83	5,99	6,63	6,96	5,86
Mepanipirim	4,98	3,77	10,85	5,88	14,88	2,55	17,98	4,04
Metrafenona	5,62	2,91	11,10	3,63	4,55	2,43	6,44	4,20

**Tabla 4.4.** Porcentajes de recuperación en las muestras de uva fortificadas a LQ y 10LQ, en condiciones de repetibilidad.

Fungicida	UVA- LQ		UVA- 10LQ	
	Media	Máximo-Mínimo	Media	Máximo-Mínimo
Boscalid	105,39	113,78-98,39	83,55	87,13-78,34
Ciazofamida	111,92	119,64-107,70	95,06	99,41-87,49
Fenhexamida	84,53	90,04-78,39	71,56	73,56-70,17
Kresoxim-metil	108,63	123,32-99,19	95,04	102,57-83,92
Mepanipirim	79,52	89,00-74,15	74,29	78,44-70,15
Metrafenona	103,36	110,41-88,83	83,14	86,45-79,20

**Tabla 4.5.** Porcentajes de recuperación en las muestras de uva fortificadas a LQ y 10LQ, en condiciones de reproducibilidad.

Fungicida	UVA LQ		UVA 10LQ	
	Media	Máximo-Mínimo	Media	Máximo-Mínimo
Boscalid	89,97	113,78-72,39	89,97	90,18-79,78
Ciazofamida	98,10	119,96-78,23	91,87	99,4-83,3
Fenhexamida	79,96	90,04-72,02	74,30	83,49-70,16
Kresoxim-metil	88,82	102,57-80,01	92,01	102,57-80,01
Mepanipirim	79,49	100,73-70,48	74,37	84,92-70,15
Metrafenona	84,67	110,41-75,54	82,50	86,45-76,7

En las muestras de uva, en todos los casos se supera el 79,49% de recuperación para las muestras fortificadas con cantidades iguales al límite de cuantificación; y el 71,56% para las fortificadas con concentraciones 10 veces superior a dicho límite. En condiciones de repetibilidad los valores medios son superiores a 79,52% (mepanipirim) a niveles de LQ y 71,56% (fenhexamida) en rangos de 10LQ; en ningún caso se supera el valor medio de recuperación de 111,92% (ciazofamida) más desfavorable. En condiciones de reproducibilidad los valores medios para niveles



de LQ son superiores a 79,49% (mepanipirim) y para rangos de 10LQ a 74,30% (fenhexamida); no superando en ningún caso el máximo de 92,01% (kresoxim-metil).

En las muestras de vino, en general, se supera el valor medio de recuperación de 77,51% en niveles de LQ y de 73,00% en 10LQ. En condiciones de repetibilidad el valor medio para todos es superior al 77,51% (ciazofamida) en rangos de LQ y al 73% (metrafenona) en 10LQ; no superándose el 84,04% (boscalid) en ningún caso. En condiciones de reproducibilidad los valores medios son superiores a 77,76% (ciazofamida) en el rango de LQ y a 73,01% (boscalid) en el de 10LQ; en ningún caso se supera el 86,82% (mepanipirim) como valor medio de recuperación.

**Tabla 4.6.** Porcentajes de recuperación en las muestras de vino fortificadas a LQ y 10LQ, en condiciones de repetibilidad.

Fungicida	VINO LQ		VINO 10LQ	
	Media	Máximo-Mínimo	Media	Máximo-Mínimo
Boscalid	84,04	85,96-70,87	73,40	76,24-70,84
Ciazofamida	77,51	84,62-71,16	73,79	79,32-70,78
Fenhexamida	79,32	72,19-85,69	74,14	78,34-71,47
Kresoxim-metil	77,70	85,87-71,18	76,54	70,44-85,4
Mepanipirim	82,27	104,09-54,54	74,77	77,1-70,74
Metrafenona	75,85	81,74-71,59	73,00	75,58-70,21

**Tabla 4.7.** Porcentajes de recuperación en las muestras de vino fortificadas a LQ y 10LQ, en condiciones de reproducibilidad.

Fungicida	VINO LQ		VINO 10LQ	
	Media	Máximo-Mínimo	Media	Máximo-Mínimo
Boscalid	81,57	94,07-70,87	73,01	76,24-70,21
Ciazofamida	77,76	70,03-84,62	73,56	79,32-70,47
Fenhexamida	82,72	96,59-72,19	73,67	78,34-70,95
Kresoxim-metil	77,94	87,6-71,18	73,42	75,36-70,44
Mepanipirim	86,82	104,09-54,54	74,47	79,45-70,74
Metrafenona	80,19	87,45-71,59	73,03	80,15-70,21

Podemos concluir que los valores obtenidos en el estudio de la metodología analítica empleada en la extracción y cuantificación de los residuos de los fungicidas ensayados, cumplen los criterios de aceptación y rechazo estipulados; y por lo tanto, es suficientemente precisa y exacta para los objetivos de este trabajo.

#### 4.1.2. DETERMINACIÓN DE RESIDUOS EN VINOS.

Se determinaron los residuos de los fungicidas boscalid, kresoxim-metil y metrafenona, en los vinos obtenidos de uvas, variedades Tempranillo y Graciano, cultivadas según prácticas agrícolas y tratamientos fitosanitarios habituales (Buenas Prácticas Agrícolas) y que se han expuesto en el apartado de Materiales y Métodos. El proceso de vinificación en bodega se desarrolló durante las campañas de 2012, 2013 y 2014. Además, en el año 2014 se determinaron dichos niveles residuales bajo tratamiento fitosanitario de Críticas Prácticas Agrícolas, vendimiando la uva 2 horas después de la aplicación de los fungicidas a las dosis recomendadas.

Los resultados obtenidos (Tabla 4.8.) muestran niveles residuales para los tres fungicidas muy inferiores a los LMR establecidos para uva en los vinos elaborados procedentes de viñas tratadas bajo BPA. Hay que señalar que tanto en las vendimias de 2013 como 2014 los residuos de los tres fungicidas son inferiores a los límites de cuantificación establecidos (0.01 ppm).

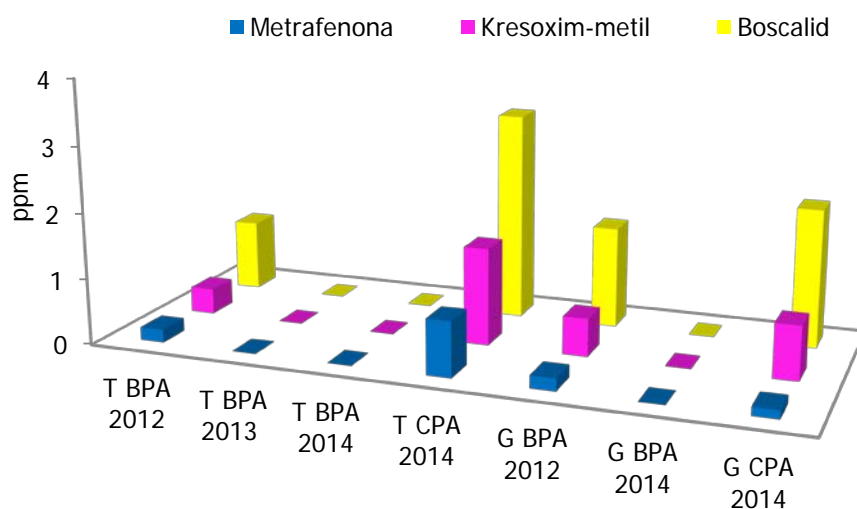
**Tabla 4.8.- Residuos de fungicidas (ppm) en vinos después de su aplicación en campo en uvas de variedades Tempranillo y Graciano.**

Fungicidas	LMR (uva)	Tempranillo				Graciano		
		BPA		CPA	BPA		CPA	
		2012	2013	2014	2012	2014	2014	
Boscalid	5	1,09	<0,01	<0,01	3,17	1,54	<0,01	2,1
Kresoxim-metil	1	0,39	<0,01	<0,01	1,48	0,58	<0,01	0,82
Metrafenona	0.5	0,2	<0,01	<0,01	0,84	0,19	<0,01	0,13

En el caso de los tratamientos realizados bajo Críticas Prácticas Agrícolas (CPA) en los dos tipos de uva, tan solo metrafenona y kresoxim-metil presentan residuos superiores a los LMR en uva Tempranillo en la vendimia de 2014. El resto de fungicidas y en todos los demás casos y vendimias son claramente inferiores a los LMR establecidos para uva de vinificación.

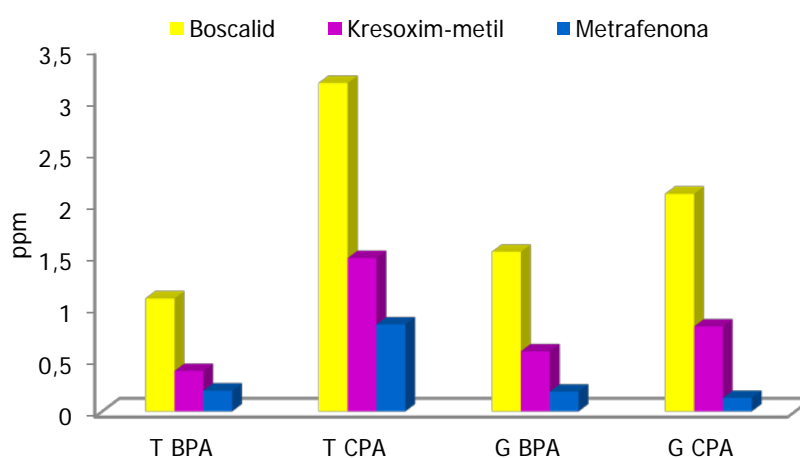
Las diferencias entre los valores residuales de las diferentes vendimias pueden atribuirse principalmente a la climatología y fechas de vendimia de los tres años: 2012 fue un año considerado como "muy bueno" con una climatología normal; 2013 se caracterizó por una climatología con pluviometría muy alta y 2014 ,mantuvo una climatología muy favorable para el desarrollo del viñedo (CRDOC, 2015).

En la Figura 4.1., se representan gráficamente los valores residuales en los vinos procedentes de uvas tratadas con los fungicidas objeto de estudio, aplicados en campo y por vendimia.



**Figura 4.1.** Evolución de los residuos de fungicidas en las tres vendimias.

Como se observa en la Figura 4.2., en los vinos procedentes de la variedad Tempranillo tratada bajo BPA, presentan valores ligeramente inferiores a los elaborados a partir de la variedad Graciano, aunque en ningún caso en condiciones agronómicas habituales alcanzan los LMR establecidos para uva. En el caso de los tratamientos en condiciones de CPA, encontramos que los niveles residuales en la variedad Tempranillo son superiores a los de Graciano.



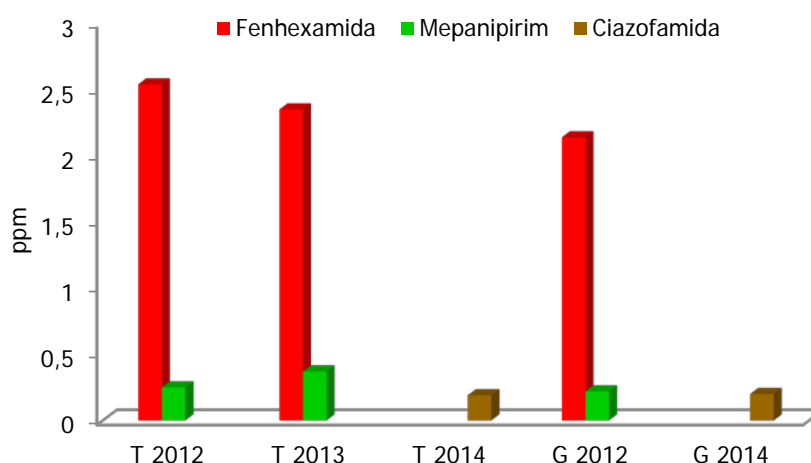
**Figura 4.2.** Valores residuales (ppm) en vinos.

En los vinos elaborados con uvas de ambas variedades, a las que se les añadió en bodega y después del estrujado los fungicidas fenhexamida y mepanipirim, se observa un comportamiento similar, encontrando que en ningún caso los vinos contenían residuos de estos fungicidas con valores superiores a los LMR en uva. En el caso de los vinos fortificados con ciazofamida, los niveles residuales en vino también son inferiores a su LMR para uva (Tabla 4.9.).

**Tabla 4.9.** Residuos de fungicidas (ppm) en los vinos fortificados en bodega.

Fungicidas	Concentraciones añadidas en uva (ppm)	Tempranillo			Graciano	
		2012	2013	2014	2012	2014
Fenhexamida	5	2,54	2,35		2,14	
Mepanipirim	3	0,25	0,37		0,22	
Ciazofamida	0,5			0,19		0,2

No se observan diferencias significativas entre las dos variedades de uva durante la vinificación y tanto fenhexamida como mepanipirim y ciazofamida tienen una evolución similar, las muestras de uva fortificadas con estos fungicidas a las dosis de 5, 3 y 0,5 ppm, respectivamente disminuyen en más del 50% a lo largo del proceso de vinificación, encontrando unos niveles residuales en vino muy por debajo del LMR establecido para uva (Figura 4.3.).



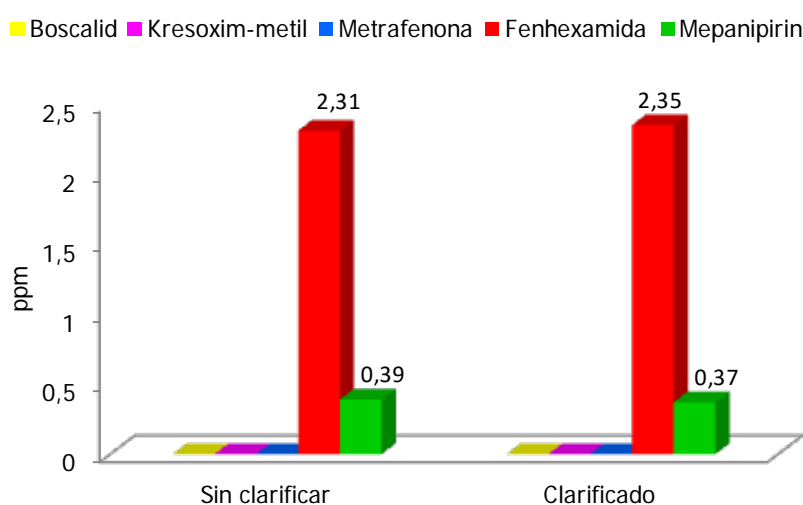
**Figura 4.3.** Valores residuales (ppm) en vino de los fungicidas añadidos en bodega.

Se ha estudiado la posible influencia del proceso de clarificación en la eliminación de los residuos de boscalid, kresoxim-metil, metrafenona, fenhexamida y

mepanipirim en el vino, no encontrándose efectos significativos, ya que los valores residuales no difieren antes y después de la clarificación. (Tabla 4.10. y Figura 4.4.).

**Tabla 4.10.** Valores residuales (ppm) en vinos antes y después de la clarificación.

Vino	Tratamiento en campo			Añadido uva en bodega	
	Boscalid	Kresoxim-metil	Metrafenona	Fenhexamida	Mepanipirim
Sin clarificar	<0,01	<0,01	<0,01	2,31	0,39
Clarificado	<0,01	<0,01	<0,01	2,35	0,37



**Figura 4.4.** Efecto de la clarificación en la desaparición de residuos de fungicidas.

## 4.2. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y COMPUESTOS FENÓLICOS.

### 4.2.1. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.

La actividad antioxidante se determinó inmediatamente después de abrir el vino embotellado para evitar posibles oxidaciones e interferencias en los resultados, utilizando el radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), tanto en los vinos elaborados con uvas de las parcelas sin tratar, como en los tratados en campo y en los fortificados en bodega. En la Tabla 4.11., se exponen los resultados obtenidos expresados como valores medios  $\pm$  desviación estándar de equivalentes Trolox, en cada una de las vendimias y variedades de uva.

**Tabla 4.11.** Actividad antioxidante (mM Trolox/ml vino) de los vinos de las distintas vendimias y variedades en BPA, CPA y fortificadas.

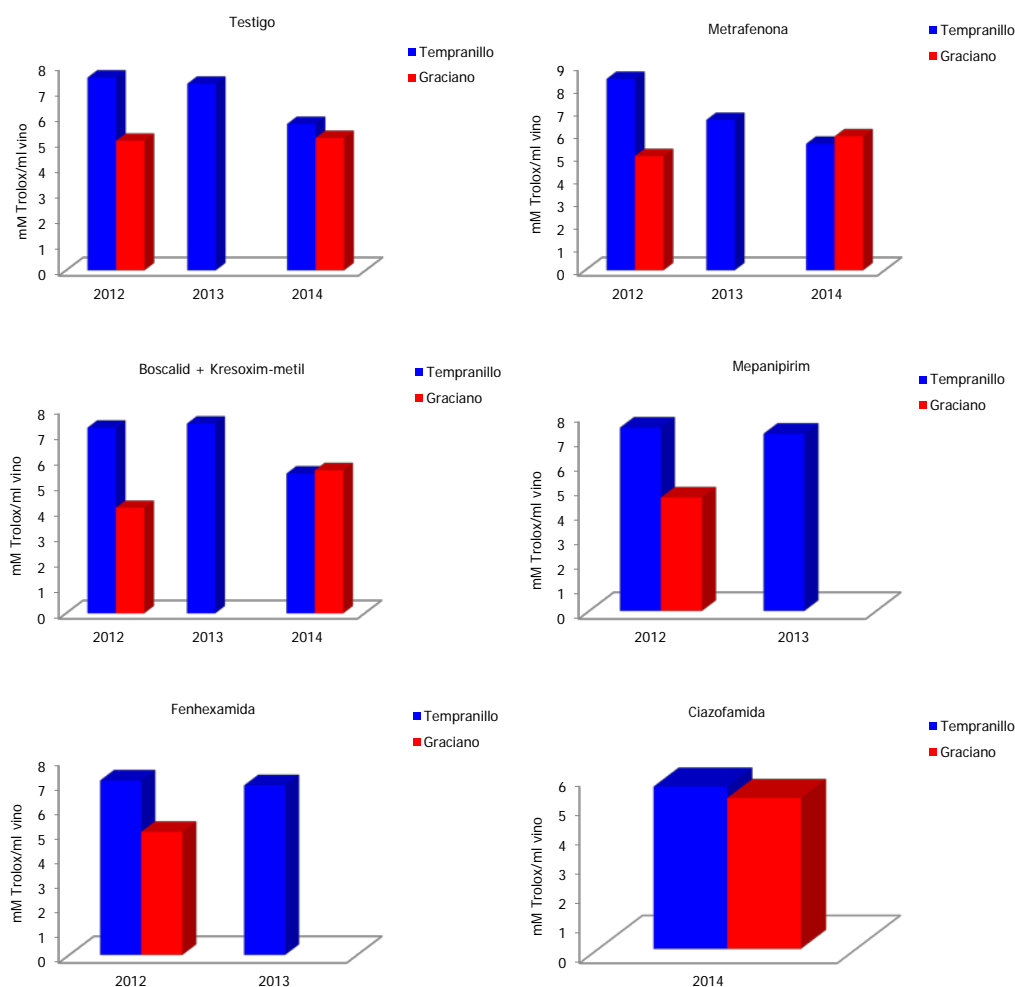
Fungicida	Tempranillo				Graciano		
	2012	2013	2014	2014 CPA	2012	2014	2014 CPA
Testigo	7,53±0,36	7,29±0,24	5,72±0,46		5,06±0,37	5,17±0,37	
Boscalid + Kresoxim-metil	7,25±0,47	7,41±0,22	5,22±0,46	5,70±0,41	4,12±0,31***	6,02±0,25**	5,16±0,16
Metrafenona	8,41±1,12	6,61±0,39	5,56±0,17	5,55±0,22	5,02±0,34	5,77±0,39*	6,01±0,12**
Fenhexamida	7,09±0,37	6,89±0,61			5,00±0,66		
Mepanipirim	7,45±0,63	7,20±0,42			4,61±0,49		
Ciazofamida			5,52±0,14			5,13±0,29	

\*\*\* p≤0,001    \*\* p≤0,01    \* p≤0,05

En los vinos testigo, sin tratamientos fitosanitarios, en las vendimias de 2012 y 2013 se constata que la actividad antioxidante de la variedad Tempranillo (7,53±0,36 mM Trolox/ml vino) es superior a la de los vinos variedad Graciano (5,06±0,37 mM Trolox/ml vino); mientras que en la de 2014 los valores se aproximan. Estos datos están en consonancia con los mostrados por distintos autores, ya que la capacidad antioxidante del vino depende de la variedad de uva, condiciones edafoclimáticas, prácticas culturales y climatología (Lee y Talcott, 2004; Rebolo-López, 2007; Fanzone et al., 2012).

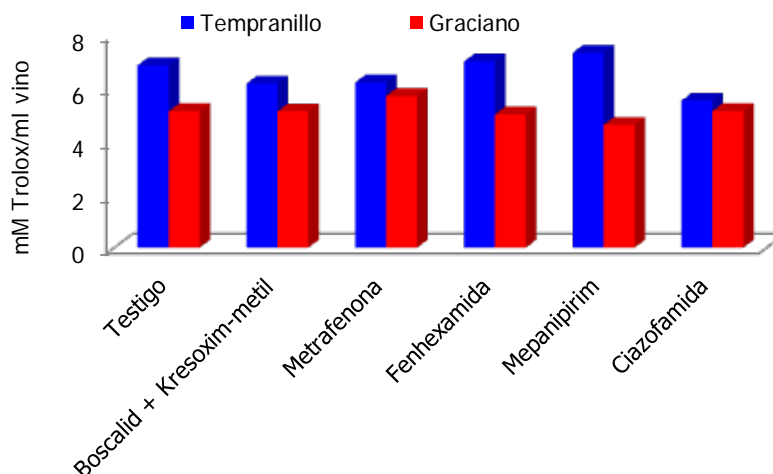
La presencia de residuos de boscalid, kresoxim-metil, fenhexamida y mepanipirim en vino Tempranillo no afectan a su actividad antioxidante, ya que los valores encontrados apenas difieren de los hallados en los vinos testigo. En el caso de vinos con residuos de metrafenona, los valores presentan pequeñas variaciones respecto al testigo, no siendo éstas significativas. Por el contrario, hemos encontrado que para vinos variedad Graciano, la presencia de residuos de los fungicidas estudiados si afecta significativamente a la capacidad antioxidante de los mismos, excepto para ciazofamida, mepanipirim y fenhexamida.

En la Figura 4.5., se muestra la actividad antioxidante en cada uno de los vinos estudiados, testigo y elaborados durante las tres vendimias, tanto para los aplicados en campo bajo buenas como en críticas prácticas agrícolas (BPA y CPA) como en la experiencia realizada para establecer posible influencia de la clarificación durante el proceso de vinificación.



**Figura 4.5.** Actividad antioxidante en los vinos Tempranillo y Graciano con los distintos fungicidas estudiados, durante las tres vendimias.

Cuando comparamos los valores medios de la actividad antioxidante en los vinos (Figura 4.6.) se puede observar que prácticamente no hay variación en función del tratamiento fitosanitario en campo, bien sea en condiciones de BPA o CPA. Los vinos Tempranillo con presencia de residuos de boscalid+kresoxim-metil y metrafenona presentan una ligera disminución de la capacidad antioxidante; mientras que en la variedad Graciano la presencia de metrafenona eleva ligeramente dicha capacidad. En el caso de fenhexamida y mepanipirim, fungicidas añadidos en depósito al inicio de la vinificación, observamos una ligera disminución de la actividad antioxidante para la variedad Graciano y no hay diferencias significativas en Tempranillo. La presencia de ciazofamida reduce la actividad antioxidante en vino Tempranillo y prácticamente no influye en Graciano.



**Figura 4.6.** Comparación de la actividad antioxidante media de las tres vendimias para cada variedad vino y fungicida estudiado.

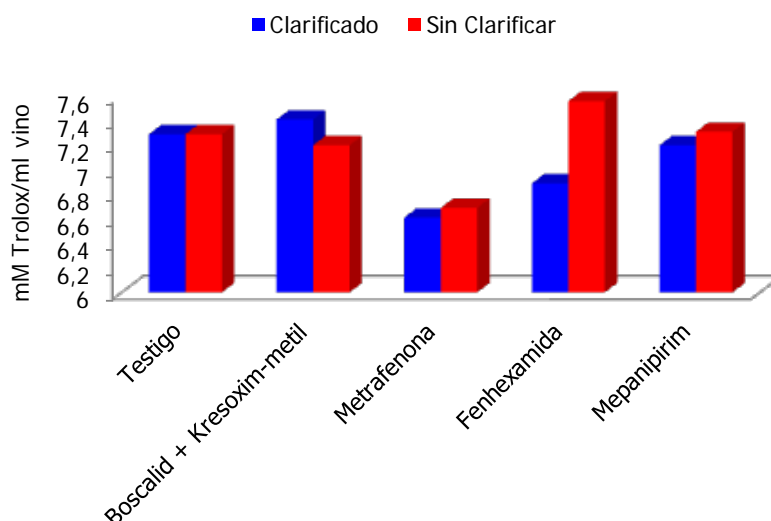
Se ha estudiado la influencia del proceso de clarificación en la vinificación, con objeto de determinar si la eliminación de sólidos en esta etapa podría afectar a la capacidad antioxidante de los vinos. En la Tabla 4.12. y Figura 4.7., se exponen los valores de la actividad antioxidante en vinos clarificados y sin clarificar de la variedad Tempranillo, observando cómo se había indicado anteriormente, la clara influencia de metrafenona y fenhexamida en la capacidad antioxidante del vino ya que se reduce respecto a la del vino testigo ( $6,61 \pm 0,39$  y  $6,89 \pm 0,61$  frente a  $7,29 \pm 0,24$  mM Trolox).

**Tabla 4.12.** Efecto de la clarificación en la actividad antioxidante (DPPH) en vino Tempranillo.

Fungicida añadido	Actividad antioxidante (mM Trolox/ml $\pm$ SD)	
	Clarificado	Sin clarificar
Testigo	$7,29 \pm 0,24$	$7,29 \pm 0,24$
Boscalid + Kresoxim-metil	$7,41 \pm 0,22$	$7,20 \pm 0,18$
Metrafenona	$6,61 \pm 0,39$	$6,69 \pm 0,68$
Fenhexamida	$6,89 \pm 0,61$	$7,56 \pm 0,26$
Mepanipirim	$7,20 \pm 0,42$	$7,31 \pm 0,22$

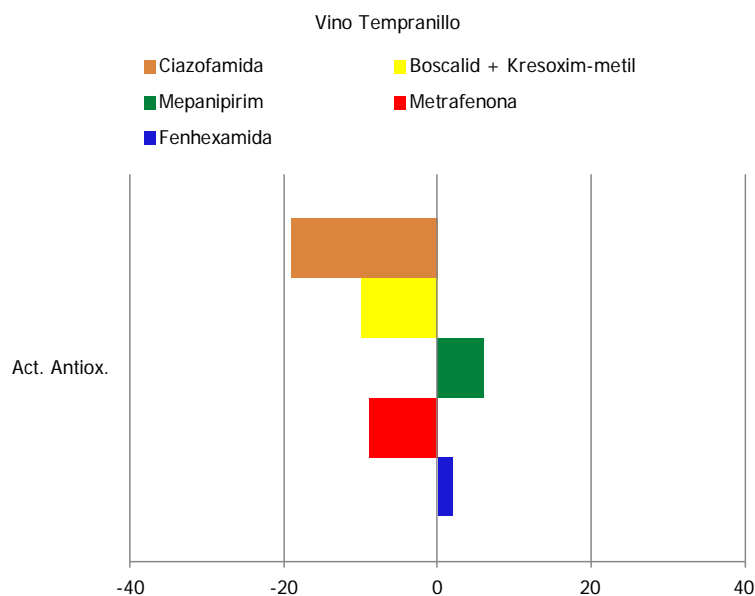
En general, no se aprecian diferencias significativas en la actividad antioxidante antes y después del proceso de clarificación. Hay que señalar que en los vinos con residuos de fenhexamida, se produce una disminución del orden del 9 %.





**Figura 4.7.** Efecto de la clarificación en la actividad antioxidante de vinos Tempranillos con residuos de fungicidas.

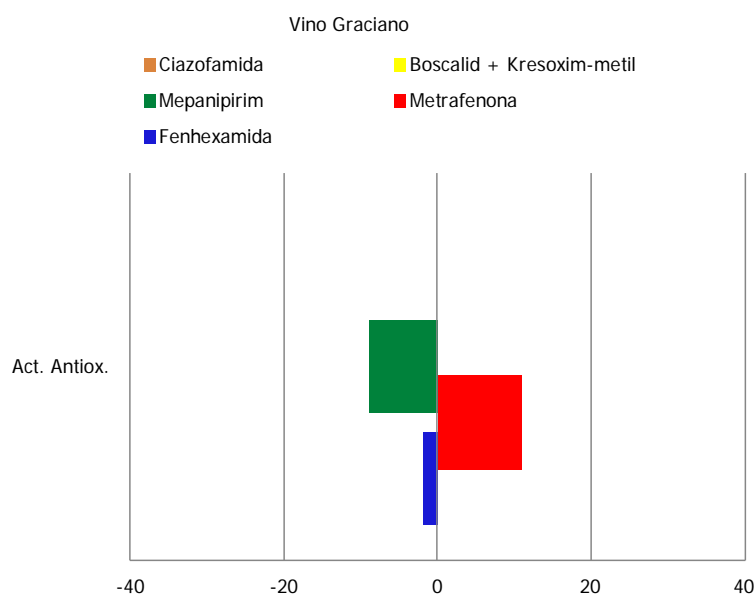
Al hacer una comparación global de todos los tratamientos, en la Figura 4.8. se puede observar que en el vino Tempranillo, la presencia de residuos de mepanipirim y fenhexamida incrementan la actividad antioxidante, mientras que ciazofamida, boscalid+kresoxim-metil y metrafenona la disminuyen respecto al vino testigo.



**Figura 4.8.** Variación de la actividad antioxidante en vino Tempranillo respecto al vino testigo.

En el caso de vino Graciano (Figura 4.9.), ciazofamida y boscalid+kresoxim-metil no se aprecia influencia sobre la actividad antioxidantes respecto al vino testigo,

mientras que la presencia de metrafenona la aumenta y mepanipirim y fenhexamida la reducen.



**Figura 4.9.** Variación de la actividad antioxidante en vino Graciano respecto al vino testigo.

#### 4.2.2. POLIFENOLES TOTALES.

La actividad antioxidante del vino se debe a su capacidad para atrapar radicales libres, y se ha establecido que su valor presenta una relación directa con el contenido polifenólico (González-Paramás et al., 2004; Fernández-Pachón et al., 2004; Müller et al., 2010, Molina-Quijada et al., 2010; Sun et al., 2011). Para establecer posibles correlaciones entre la actividad antioxidante y compuestos fenólicos, se ha determinado el contenido en polifenoles totales (expresados como g/l) según el método de cuantificación que utiliza el reactivo de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). En la Tabla 4.13., se exponen los valores de polifenoles totales para cada vino elaborado con las dos variedades de uva, las tratadas con los formulados comerciales en campo Collis® (boscalid+kresoxim-metil) y Vivando® (metrafenona) y las fortificadas en bodega con Teldor® (fenhexamida) y Frupica® (mepanipirim) y Mildicut® (ciazofamida).

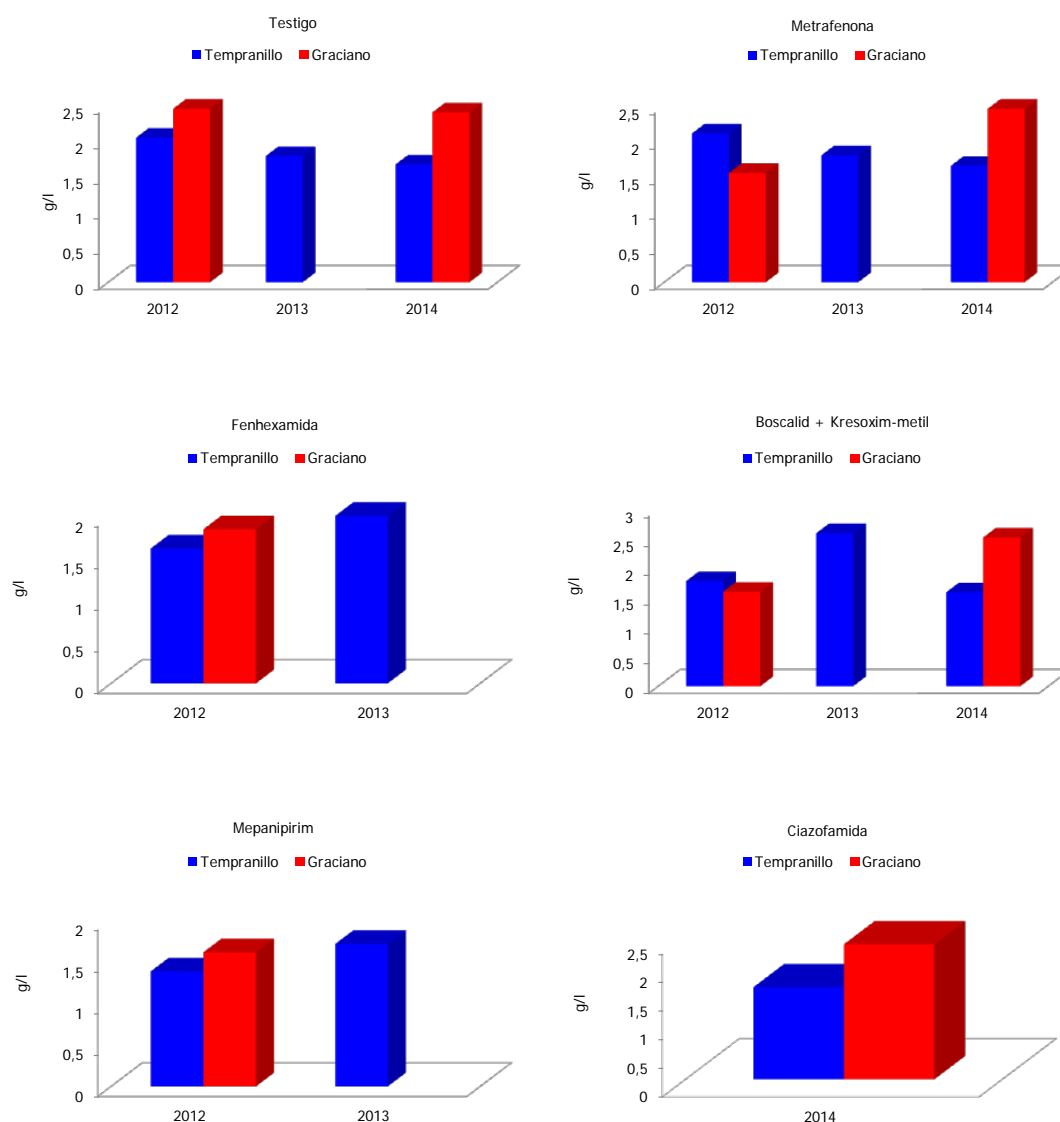
**Tabla 4.13.** Polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) en vinos Tempranillo y Graciano (g/l).

Fungicida	Tempranillo				Graciano		
	2012	2013	2014 BPA	2014 CPA	2012	2014 BPA	2014 CPA
Testigo	2,05±0,09	1,79±0,01	1,67±0,03		2,46±0,09	2,41±0,05	
Boscalid + Kresoxim-metil	1,78±1,71*	2,59±0,01**	1,52±0,45	1,66±0,02	1,60±0,04	2,47±0,02	2,57±0,01
Metrafenona	2,11±0,06	1,80±0,01	1,65±0,02	1,65±0,05	1,55±0,10	2,45±0,06	2,47±0,03
Fenhexamida	1,61±0,12**	2,00±0,01**			1,84±0,07		
Mepanipirim	1,38±0,04	1,71±0,01**			1,61±0,24**		
Ciazofamida			1,61±0,02			2,36±0,01	

\*\*\* p≤0,001    \*\* p≤0,01    \* p≤0,05

Al examinar los valores encontrados en los vinos testigo de la vendimia de 2012, se constata que el contenido en polifenoles totales en vino variedad Graciano (2,46±0,09 g/l) es ligeramente superior al encontrado en vino Tempranillo (2,05±0,09 g/l). La presencia de residuos de boscalid+kresoxim-metil, metrafenona, fenhexamida y mepanipirim reducen el contenido de polifenoles totales en los vinos variedad Graciano. Sin embargo este comportamiento es diferente para vinos Tempranillo, ya que metrafenona incrementa ligeramente su contenido (2,11±0,06 g/l) respecto al vino testigo (2,05±0,09 g/l), (Figura 4.10.). Los resultados encontrados están sin duda condicionados por las distintas labores manuales realizadas tanto durante los tratamientos en campo, por el clima y sobre todo por el proceso de vinificación en los depósitos experimentales.

Se ha estudiado la influencia de la clarificación en el contenido en polifenoles totales calculado según el método de Folin-Ciocalteu, encontrando que los vinos con presencia de los fungicidas fenhexamida, boscalid+kresoxim-metil y metrafenona presentaban contenidos más altos en polifenoles que el vino testigo (Tabla 4.14.). Observando cómo el proceso de clarificación en vinos Tempranillo tiene efectos significativos en los valores de polifenoles totales.



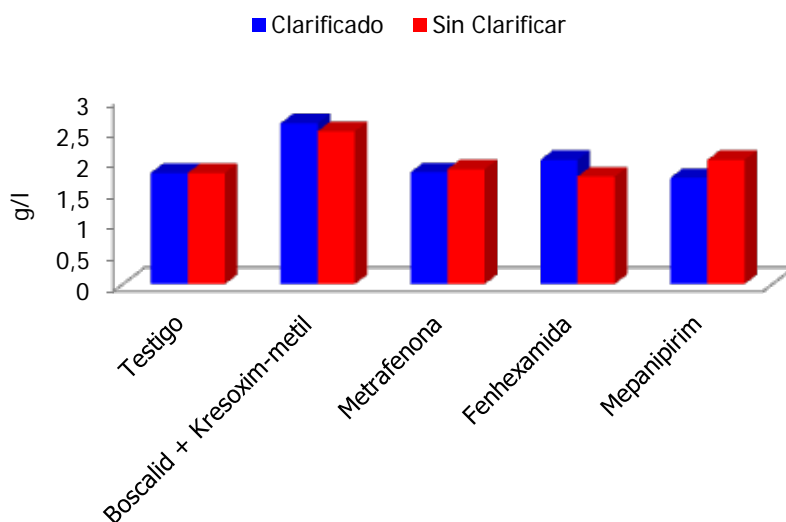
**Figura 4.10.** Polifenoles totales en los vinos Tempranillo y Graciano tratados con los distintos fungicidas estudiados, durante las tres vendimias.

**Tabla 4.14.** Efecto de la clarificación en el contenido en polifenoles totales en vino Tempranillo (2013).

Fungicida añadido	Polifenoles Totales (g/l)	
	Clarificado	Sin clarificar
Testigo	1,79±0,01	1,79±0,01
Boscalid + Kresoxim-metil	2,59±0,01**	2,46±0,03**
Metrafenona	1,80±0,01	1,85±0,10
Fenhexamida	2,00±0,01**	1,73±0,08
Mepanipirim	1,71±0,01**	2,00±0,12**

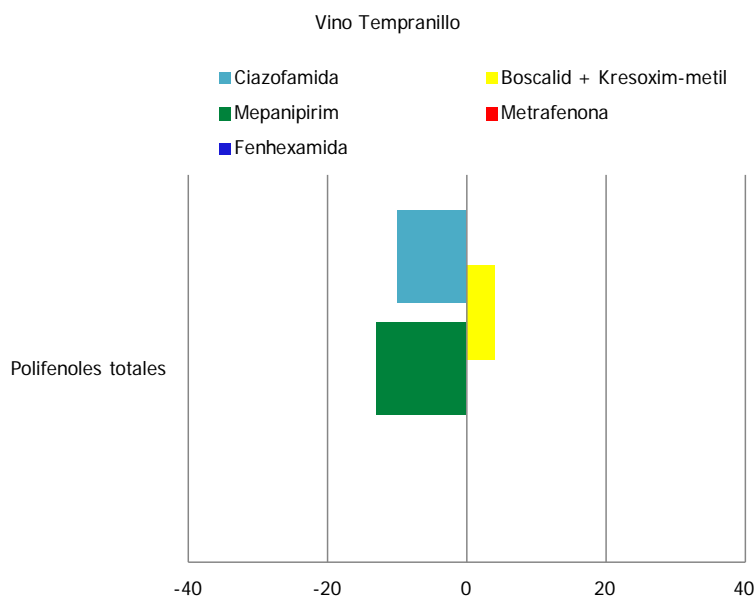
\*\*\* p≤0,001    \*\* p≤0,01    \* p≤0,05

En el caso de los vinos con presencia de residuos de boscalid + kresoxim-metil y fenhexamida los polifenoles totales experimentan un incremento frente al vino sin residuos ( $2,59 \pm 0,01$  y  $2,00 \pm 0,01$ , frente a  $1,79 \pm 0,01$  g/l, respectivamente) (Figura 4.11.).

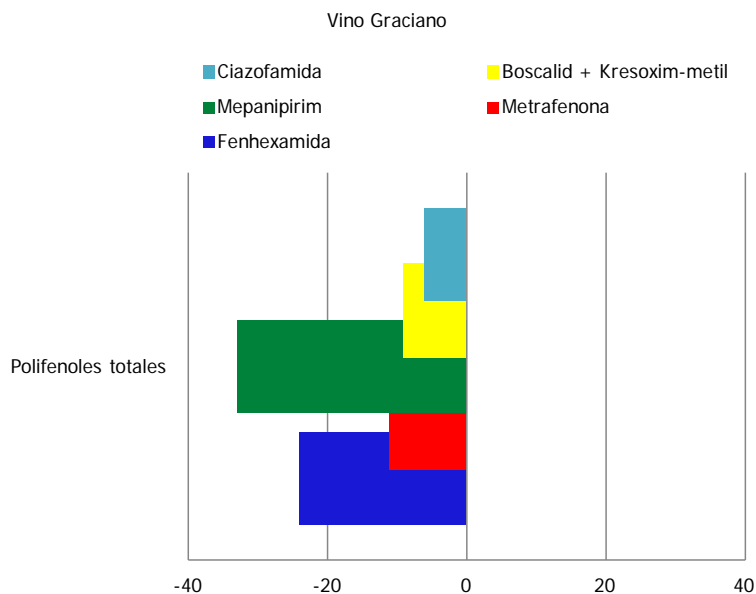


**Figura 4.11.** Efecto de la clarificación en el contenido de polifenoles totales en vino Tempranillo con residuos de fungicidas.

En las Figuras 4.12. y 4.13., se representan los efectos de los distintos fungicidas sobre el contenido de polifenoles totales.



**Figura 4.12.** Variación de polifenoles totales en vino Tempranillo respecto vino testigo.



**Figura 4.13.** Variación de polifenoles totales en vino Graciano respecto vino testigo.

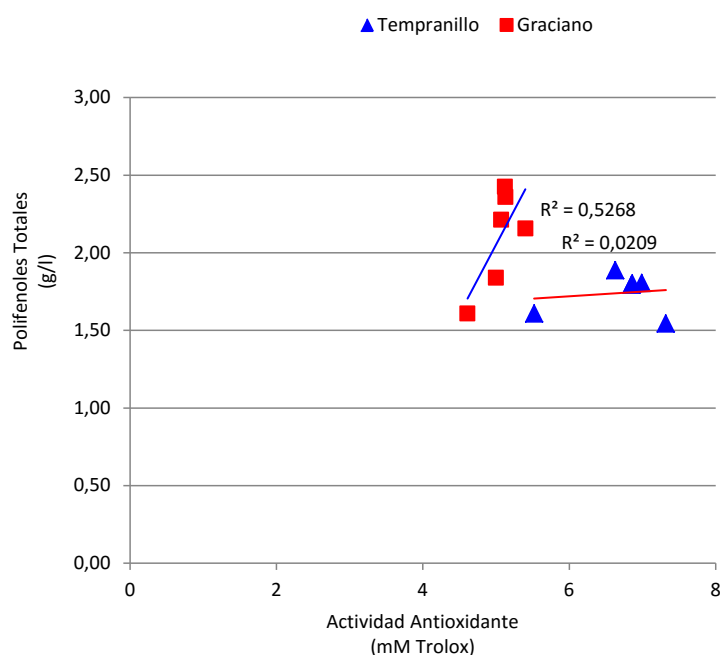
Así en vino Tempranillo la presencia de residuos de ciazofamida y mepanipirim reducen su contenido respecto al testigo; mientras que boscalid+kresoxim-metil lo aumentan ligeramente; por último fenhexamida y metrafenona no afectan su contenido.

En el caso de vinos Graciano la influencia de la variedad es notable, ya que en todos los casos la presencia de fungicidas reduce el contenido de polifenoles totales.

La actividad antioxidante se ha relacionado con el contenido en polifenoles para una amplia variedad de vinos, ya que se ha constatado en diversos estudios que presenta una cierta correlación (Frankel et al., 1995; De Beer et al., 2003; Sánchez-Moreno et al., 2003). La mayoría de los trabajos establecen una fuerte correlación entre ambas medidas (Saxena et al., 2007; Mulero et al., 2009 y 2011; Shen et al., 2009; Tabart et al., 2009; Beserra-Almeida et al., 2011; Chaieb et al., 2011; Szydłowska-Czerniak et al., 2011; Zilic et al., 2011; de Souza et al., 2012; Terpinc et al., 2012); pocos son los que observan una débil relación (Jayasekera et al., 2011; Sulaiman et al., 2011; Tlili et al., 2011).

En nuestro caso (Figura.4.14.) encontramos valores dispares, mientras que para vino Tempranillo la correlación lineal es muy débil con una dispersión notable de los datos ( $R^2 = 0,0209$ ,  $p \leq 0,05$ ), en el caso de Graciano hay una mayor correlación

( $R^2 = 0,5268$ ,  $p \leq 0,05$ ). En todo caso, dicha correlación es poco significativa, lo que puede ser debido a la disparidad y gran diferencia en la calidad y características de las tres vendimias. Hay destacar las importantes diferencias climatológicas entre los años 2012, 2013 y 2014 en La Rioja, sobre todo lluvias y temperaturas medias que incidieron en la producción y maduración de las mismas (CRDOC, 2015).



**Figura 4.14.** Correlación entre polifenoles totales y actividad antioxidante de los vinos.

### 4.2.3.- COMPUESTOS FENÓLICOS.

Los compuestos fenólicos en el vino proceden, lógicamente, de la uva (algunos de ellos se encuentran en el hollejo, otros en la pulpa, en las semillas, y en el raspón) y su composición depende, como hemos dicho anteriormente, de la variedad de uva, ubicación geográfica, características agronómicas y climatológicas del cultivo, etc.

Básicamente responden a cuatro tipos, según sean derivados de flavonoides o no flavonoides, para los primeros destacamos: a) Derivados de ácidos hidroxicinámicos, utilizados para seguir la oxidación del vino, entre los que destacan cumárico y ferúlico, importantes a nivel organoléptico por producir olores muy fuertes. Además, pueden llegar a provocar pardeamiento del líquido; y b) Estilbenos, con un

notable poder antioxidante, especialmente el resveratrol. Se hallan en la semilla y el hollejo de la uva y tienen una notable acción antifúngica en las bayas.

En el caso de los no flavonoides: a) Flavonoles, importantes en la llamada copigmentación, por formar complejos con los antocianos. Se ubican en los hollejos y también en los raspones de uvas tintas y blancas. Su cantidad se ve influenciada por la insolación, cantidad de agua que recibe la vid y el contenido en nitrógeno del suelo; b) Antocianos: Son los principales encargados del color de los vinos tintos. Aparecen en las uvas tintas a partir del envero. La cantidad presente se ve fuertemente influenciada por las restricciones hídricas, los rendimientos, el vigor de la planta, la temperatura, la exposición del follaje y las características del suelo (Zamora, 2003).

Los principales compuestos fenólicos que hemos determinado en los vinos Tempranillo y Graciano son: antocianos, derivados hidroxicinámicos, flavonoles y estilbenos. En la Tabla 4.15. se exponen los valores medios de estos compuestos determinados en ambos vinos en todas las vendimias.

**Tabla 4.15.** Valores medios de compuestos fenólicos (mg/l) para los dos vinos.

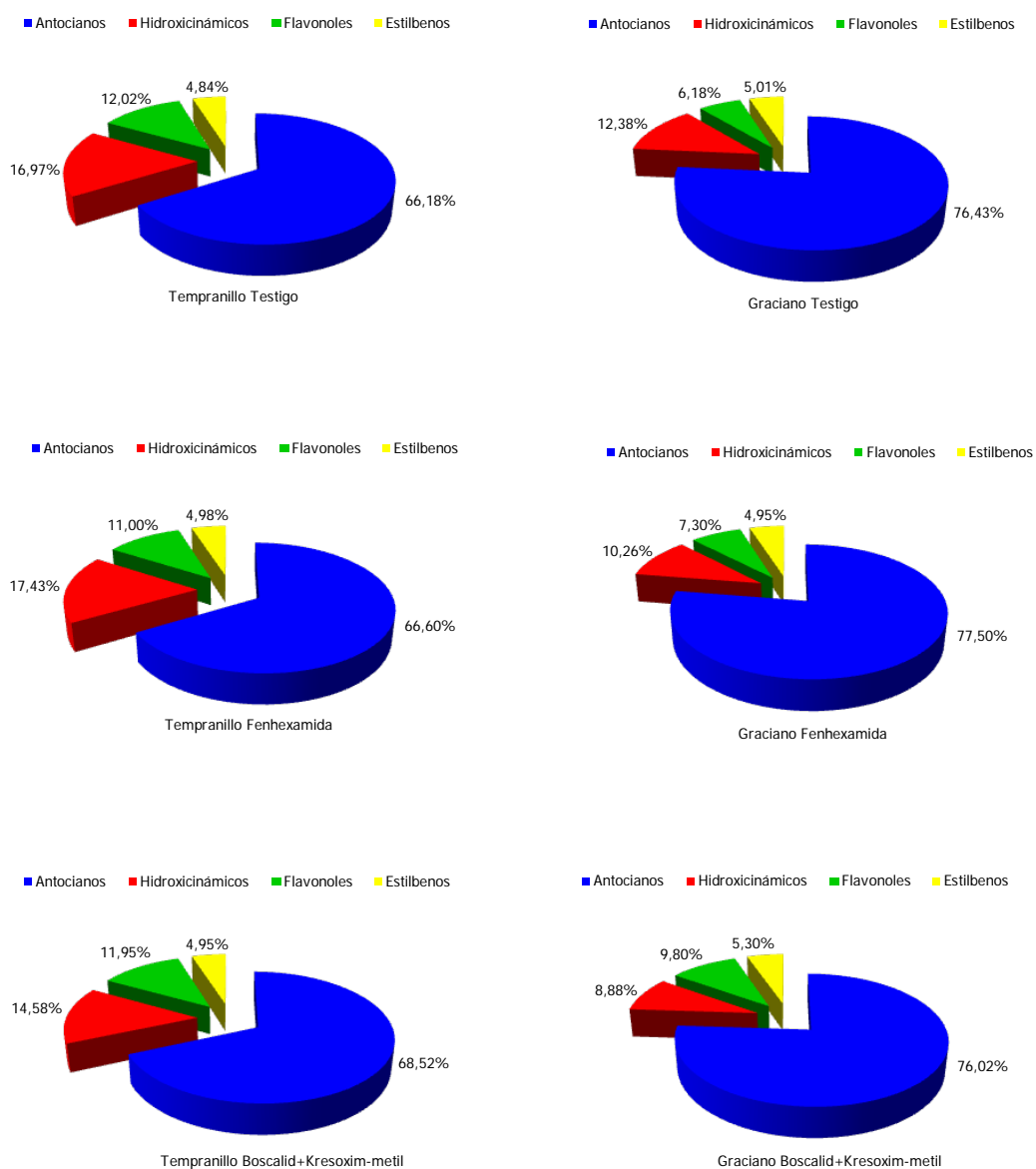
Vino	Compuestos	Antocianos	Hidroxicinámicos	Flavonoles	Estilbenos
Tempranillo	Testigo	596,26	139,57	98,48	43,03
	Fenhexamida	669,61	153,37	107,93	42,46
	Boscalid + Kresoxim-metil	697,61	140,49	116,63	50,12
	Metrafenona	572,53	143,88	98,33	38,39
	Mepanipirim	576,33	154,49	119,18	40,96
	Ciazofamida	701,93	146,67	100,84	46,93
Graciano	Testigo	678,13	108,55	55,24	44,55
	Fenhexamida	698,54	92,46	65,77	44,58
	Boscalid + Kresoxim-metil	623,40	73,00	80,33	43,41
	Metrafenona	594,28	107,97	59,00	41,90
	Mepanipirim	626,61	111,84	81,6	52,03
	Ciazofamida	532,87	94,09	45,21	31,01



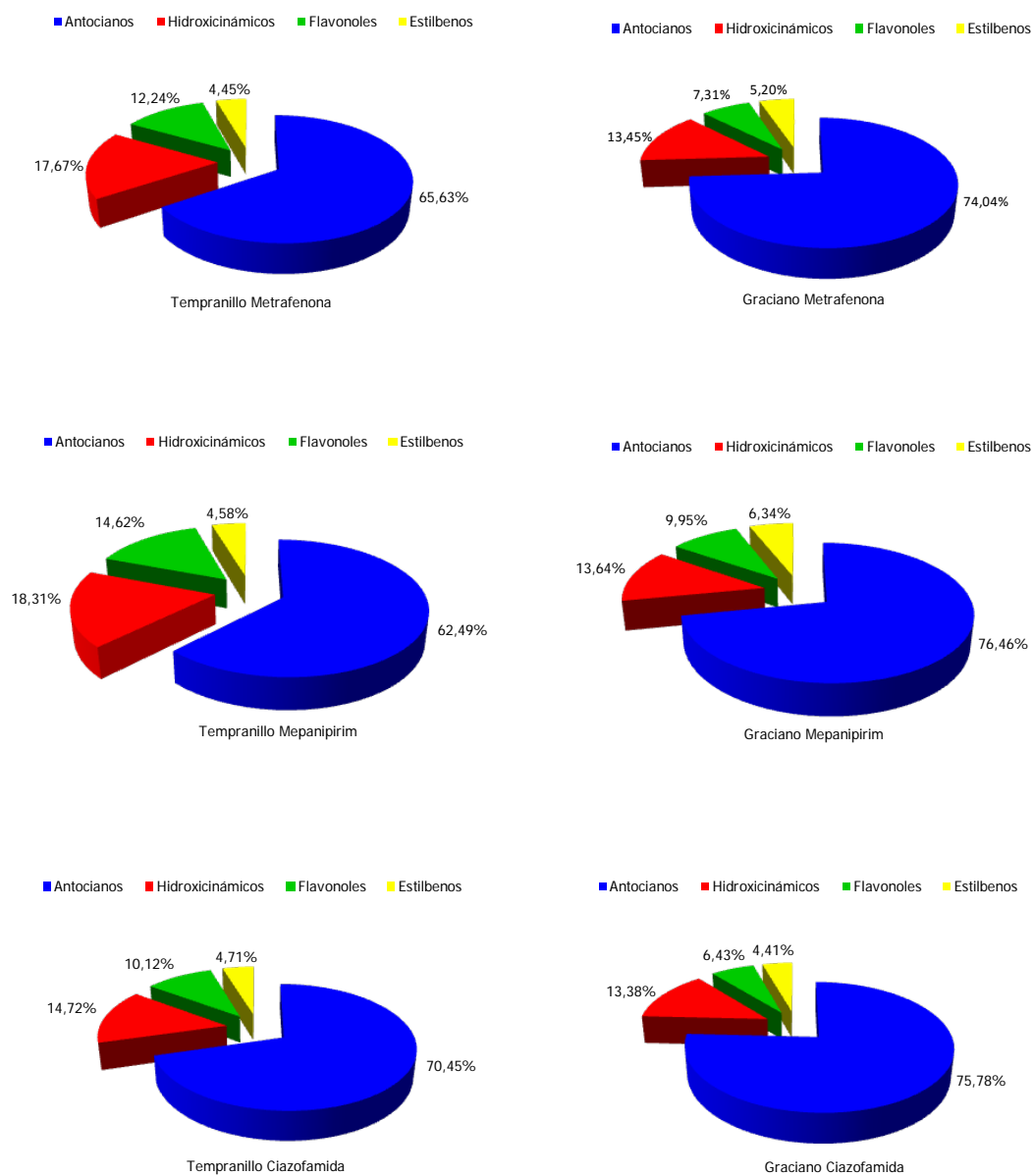
Los antocianos presenta un valor medio de 596,26 mg/l en vino testigo de tempranillo frente a 678,13 mg/l en Graciano. Obteniendo el valor más alto en los vinos Tempranillo con ciazofamida (701,93 mg/l) y el más bajo en vino Graciano con ciazofamida (532,87 mg/l). La concentración de compuestos hidroxicinámicos fluctúan entre 73,00 mg/l en vino Graciano con boscalid+kresoxim-metil y 154,49 mg/l para vino Tempranillo con mepanipirim. Los flavonoles se determinaron en menores concentraciones (entre 45,21 y 119,18 mg/l para vino Graciano con ciazofamida y Tempranillo con mepanipirim, respectivamente); por último, los estilbenos oscilan entre 31,01 y 52,03 mg/l, encontrados para vinos Graciano con ciazofamida y mepanipirim, respectivamente.

La fracción fenólica más destacada en Tempranillo y Graciano es la de antocianos (70,45 y 77,50 % respectivamente) seguidos de los derivados hidroxicinámicos (18,31 y 13,64 %); flavonoles (14,62 y 9,95 %). En el caso de los estilbenos en vinos Graciano el porcentaje es ligeramente superior que en Tempranillo (6,34 frente al 4,98%) (Figuras 4.15. y 4.16.).

En los vinos Tempranillo la presencia de residuos de fungicidas influye en el contenido de compuestos fenólicos. Así vemos como el porcentaje de antocianos se incrementa con fenhexamida, ciazofamida y boscalid+kresoxim-metil, mientras que disminuye con metrafenona y mepanipirim. Los derivados hidroxicinámicos se incrementan con fenhexamida, metrafenona y mepanipirim, se reducen con boscalid+kresoxim-metil y ciazofamida. Los flavonoles se incrementan en la presencia de metrafenona y mepanipirim y se reducen con el resto de fungicidas. Por último los estilbenos se incrementan con fenhexamida y boscalid+kresoxim-metil y se reducen con el resto.



**Figura 4.15.** Porcentajes medios de compuestos fenólicos en cada una de los vinos estudiados procedentes de uvas tratadas en campo.



**Figura 4.16.** Porcentajes medios de compuestos fenólicos en cada una de los vinos tratados en bodega antes de la vinificación.

En los vinos Graciano la presencia de residuos de fungicidas también influye en el contenido de compuestos fenólicos. Así, vemos como el porcentaje de antocianos se incrementa con fenhexamida y mepanipirim y disminuye con boscalid+kresoxim-metil, metrafenona y ciazofamida. Los derivados hidroxicinámicos se incrementan con metrafenona, mepanipirim y ciazofamida, se reducen con los otros fungicidas. Flavonoles aumentan con la presencia de los seis fungicidas. Por último los estilbenos se incrementan con boscalid+kresoxim-metil, metrafenona y mepanipirim y se reducen con el resto.

Como era de esperar los antocianos son la mayor fracción de los compuestos fenólicos, ya que el color del vino tinto se debe a su presencia en el hollejo de la uva. La segunda fracción en importancia son los derivados hidroxicinámicos, presentes en la pulpa de la uva. Los flavonoles procedentes de la piel de la uva, formados básicamente por glucósidos y glucurónidos de quercitina, kaempferol y mireicitina, no superan en nuestros ensayos más de 20% del total determinado. Por último, se encuentran también pequeñas proporciones de estilbenos, del que resveratrol es el componente mayoritario de las uvas de *Vitis vinifera* (Cantos et al., 2003 y Carery et al., 2003; Mulero, 2005).

En las Tablas 4.16. y 4.17., se muestran las concentraciones de compuestos fenólicos en los vinos procedentes de uvas Tempranillo y Graciano, tratadas en campo con los productos comerciales Collis® (boscalid+kresoxim-metil) y Vivando® (metrafenona); así como vinos fortificados en bodega con Frupica® (mepanipirim) y Teldor® (fenhexamida) en la vendimia de 2012.

**Tabla 4.16.- Compuestos fenólicos de vinos Tempranillo (mg/l) (2012).**

Compuestos	Testigo	Fenhexamida	Boscalid + Kresoxim-metil	Metrafenona	Mepanipirim
Antocianos	762,98±22,83	776,37±32,51	762,21±45,60	671,70±11,47**	649,30±7,67**
Hidroxicinámicos	150,25±5,75	148,61±12,51	146,85±8,36	229,26±25,61**	140,30±15,67
Flavonoles	116,13±31,18	93,43±12,65	98,67±6,34	120,40±14,32	109,22±4,83
Estilbenos	56,66±6,22	51,32±2,96	53,30±2,99	44,07±1,02***	45,57±0,81***

\*\*\* p≤0,001    \*\* p≤0,01    \* p≤0,05

**Tabla 4.17.- Compuestos fenólicos de vinos Graciano(mg/l) (2012).**

Compuestos	Testigo	Fenhexamida	Boscalid + Kresoxim-metil	Metrafenona	Mepanipirim
Antocianos	755,30±13,94	698,54±55,27**	609,22±23,14**	632,56±36,40**	626,61±34,04**
Hidroxicinámicos	108,98±1,45	92,46±6,80**	65,01±5,66**	110,82±0,45**	111,84±3,68**
Flavonoles	64,95±9,26	65,77±3,33**	81,52±4,74**	74,73±0,32**	81,60±4,90**
Estilbenos	50,47±0,60	44,58±1,94**	44,89±1,52**	49,06±2,48**	52,03±1,41*

\*\*\* p≤0,001    \*\* p≤0,01    \* p≤0,05

En los vinos Tempranillo de la vendimia 2012 que contienen residuos de metrafenona, se produce una disminución significativa del contenido en antocianos y estilbenos y un aumento significativo de derivados hidroxicinámicos. Para los vinos con presencia de mepanipirim todos los compuestos fenólicos determinados disminuyen en su concentración respecto al testigo, apreciando diferencias significativas en el caso de antocianos y estilbenos. En el caso de la presencia de la mezcla boscalid+kresoxim-metil y fenhexamida se comprueba que no afecta significativamente al perfil fenólico.

En los vinos Graciano de la vendimia 2012, se ha determinado que la presencia de los fungicidas influye en los compuestos fenólicos. Encontrando diferencias significativas en los valores de derivados hidroxicinámicos y flavonoles (inferiores a los encontrados en vino Tempranillo), antocianos y estilbenos (valores similares). Mostrando los fungicidas estudiados un efecto muy similar al descrito anteriormente para vino Tempranillo sobre el contenido de las distintas fracciones fenólicas.

Cuando estudiamos las diferencias significativas entre parejas de tratamientos (Tablas 4.18. y 4.19.), se observa que éstas existen en la mayoría de los casos, mostrando ciertas diferencias entre las dos variedades estudiadas. El análisis ANOVA de la vendimia 2012 en vino Tempranillo muestra que para la pareja fenhexamida y boscalid+kresoxim-metil el perfil fenólico no presenta diferencias significativas. La pareja fenhexamida/mepanipirim no afecta a los contenidos de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles; mientras que boscalid+kresoxim-metil/mepanipirim a los ácidos hidroxicinámicos y la metrafenona/mepanipirim tampoco a estilbenos y flavonoles.

Al estudiar las diferencias significativas entre parejas de tratamientos en los vinos Graciano 2012, se observa que éstas existen, en general, para todas ellas. Únicamente no se ve afectado el contenido de antocianos para la pareja metrafenona y

la mezcla boscalid+kresoxim-metil y flavonoles para las parejas fenhexamida/mepanipirim y boscalid+kresoxim-metil/mepanipirim.

**Tabla 4.18.** *Relación entre compuestos fenólicos y fungicidas en vino Tempranillo (2012).*

Fungicidas	Antocianos	Hidroxicinámicos	Flavonoles	Estilbenos
MET-FEN	**	**	*	***
MET-BOSC	**	**	**	***
MET-MEP	*	**		
FEN-BOSC				
FEN-MEP	**			**
BOSC-MEP	**		*	***

\*\*\* $p \leq 0,001$  \*\* $p \leq 0,01$  \* $p \leq 0,05$ .  
 MET=Metrafenona, FEN=Fenhexamida, BOSC= Boscalid+kresoxim-metil; MEP= Mepanipirim

**Tabla 4.19.** *Relación entre compuestos fenólicos y fungicidas en vino Graciano (2012).*

Fungicidas	Antocianos	Hidroxicinámicos	Flavonoles	Estilbenos
MET-FEN	**	**	**	
MET-BOSC		*	**	**
MET-MEP	**	**	**	**
FEN-BOSC	**	**	**	**
FEN-MEP	**	**		**
BOSC-MEP	**	**		**

\*\*\* $p \leq 0,001$  \*\* $p \leq 0,01$  \* $p \leq 0,05$ .  
 MET=Metrafenona, FEN=Fenhexamida, BOSC= Boscalid+kresoxim-metil; MEP= Mepanipirim

En la vendimia 2013 se estudió el efecto del proceso de clarificación en la fracción fenólica de vino Tempranillo tratado en campo con metrafenona y boscalid+kresoxim-metil y fortificados en bodega con fenhexamida y mepanipirim. Constatando que para la mayoría de los vinos clarificados y sin clarificar existen diferencias significativas en los niveles de compuestos fenólicos para todos los fungicidas estudiados (Tablas 4.20. y 4.21.); únicamente la presencia de metrafenona y fenhexamida en el vino sin clarificar no afecta al contenido en flavonoles. En el vino con metrafenona clarificado no se encuentra afección en los niveles de antocianos, derivados hidroxicinámicos y flavonoles.

**Tabla 4.20.-** *Compuestos fenólicos de vinos Tempranillo clarificados (mg/l) (2013).*

Compuestos	Testigo	Fenhexamida	Boscalid + Kresoxim-metil	Metrafenona	Mepanipirim
Antocianos	419,14±1,82	562,84±62,83***	888,71±42,1***	394,19±14,66	503,37±5,35***
Hidroxicinámicos	126,69±1,89	158,12±8,21***	141,35±26,5**	136,13±7,37	168,68±4,77***
Flavonoles	91,55±3,09	122,43±5,71***	185,05±12,6***	98,50±5,70	129,15±17,86***
Estilbenos	31,86±1,41	33,59±0,73*	71,71±2,71**	31,36±2,00***	36,35±1,27***

\*\*\*  $p \leq 0,001$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*  $p \leq 0,05$

**Tabla 4.21.** *Compuestos fenólicos de vinos Tempranillo sin clarificar (mg/l) (2013).*

Compuestos	Testigo	Fenhexamida	Boscalid + Kresoxim-metil	Metrafenona	Mepanipirim
Antocianos	419,14±1,82	565,65±39,2***	841,45±6,75***	396,89±12,81	491,06±12,02***
Hidroxicinámico	126,69±1,89	182,67±2,08***	196,75±3,79***	142,13±6,12*	166,92±5,03***
Flavonoles	91,55±3,09	92,52±1,16	182,73±3,73***	94,27±1,55	141,38±0,93***
Estilbenos	31,86±1,41	56,56±1,18***	65,89±2,92***	26,87±1,10***	38,19±0,44***

\*\*\*  $p \leq 0,001$  \*\*  $p \leq 0,01$  \*  $p \leq 0,05$

Cuando no se clarifica el vino, solamente antocianos y flavonoles en el vino tratado con metrafenona y flavonoles en el tratado con fenhexamida, no presentan diferencias significativas.

Cuando estudiamos las diferencias significativas entre parejas de tratamientos (Tablas 4.22.), se observa que éstas existen en la mayoría de los casos, mostrando ciertas diferencias entre los vinos clarificados o sin clarificar.

El análisis estadístico nos muestra diferencias significativas en estilbenos para todas las parejas. En flavonoles no hay diferencias significativas para metrafenona clarificada y sin clarificar, metrafenona/fenhexamida sin clarificar, fenhexamida/mepanipirim, la mezcla boscalid+kresoxim-metil clarificada y sin clarificar y metrafenona sin clarificar/fenhexamida sin clarificar. En ácidos hidroxicinámicos no hay diferencias significativas para las parejas metrafenona/boscalid+kresoxim-metil, metrafenona clarificada y sin clarificar, fenhexamida con boscalid+kresoxim-metil, mepanipirim, metrafenona sin clarificar, y mepanipirim sin clarificar, boscalid+kresoxim-metil/metrafenona sin clarificar, mepanipirim clarificado y sin clarificar. Finalmente el contenido de los antocianos no presenta diferencias significativas inducidas por el proceso de clarificación en los vinos con fungicidas.

**Tabla 4.22.** Relación entre compuestos fenólicos y fungicidas en vino Tempranillo clarificado y sin clarificar (2014).

Fungicidas	Antocianos	Hidroxicinámicos	Flavonoles	Estilbenos
MET-FEN	***	***	***	*
MET-BOSC	***		***	***
MET-MEP	***	***	***	***
MET-METSC				***
MET-MEPSC	***	***	***	***
MET-FENSC	***	***		***
MET-BOSCSC	***	***	***	***
FEN-BOSC	***		***	***
FEN-MEP	**			*
FEN-METSC	***		***	***
FEN-MEPSC	***		***	***
FEN-FENSC		***	***	***
FEN-BOSSC	***	***	***	***
BOSC-MEP	***	***	***	***
BOSC-METSC	***		***	***
BOSC-MEPSC	***	***	***	***
BOSC-FENSC	***	***	***	***
BOSC-BOSCSC		***		***
MEP-METSC	***	***	***	***
MEP-MEPSC			*	*
MEP-FENSC	**	*	***	***
MEP-BOSCSC	***	***	***	***
METSC-MEP-SC	***	***	***	***
METSC-FENSC	***	***		***
METSC-BOSCSC	***	***	***	***
MEPSC-FENSC	***	**	***	***
MEPSC-BOSCSC	***	***	***	***
FENSC-BOSCSC	***	*	***	***

\*\*\*p≤0,001 \*\*p≤0,01 \*p≤0,05.

MET=Metrafenona, FEN=Fenhexamida, BOSC= Boscalid+kresoxim-metil; MEP= Mepanipirim. SC=Sin Clarificar

El estudio del efecto del tratamiento en campo de boscalid+kresoxim-metil y metrafenona, en condiciones de BPA y CPA sobre variedades de uva Tempranillo y Graciano en 2014, puso de manifiesto diferencias significativas con el vino testigo en los contenidos de antocianos, derivados hidroxicinámicos, estilbenos y flavonoles (Tablas 4.23. y 4.24.). En concreto, en vino Tempranillo no hay diferencias significativas en el contenido de derivados hidroxicinámicos y flavonoles con la



presencia de boscalid+kresoxim-metil BPA, ni en el de estilbenos en los vinos con metrafenona CPA y boscalid+kresoxim-metil CPA.

En el caso de vinos Graciano, no hay incidencia en el contenido de antocianos por la presencia de metrafenona CPA y boscalid+kresoxim-metil CPA. Flavonoles no se ven afectados por ciazofamida y por último, los estilbenos tampoco por metrafenona BPA y CPA y boscalid+kresoxim-metil CPA.

**Tabla 4.23.** Valores medios de compuestos fenólicos (mg/l) en vino Tempranillo (2014).

Compuestos	Testigo	Ciazofamida	Metrafenona BPA	Metrafenona CPA	Boscalid + Kresoxim-metil BPA	Boscalid + Kresoxim-metil CPA
Antocianos	606,67±0,67	701,93±1,93***	645,83±1,63***	578,41±0,64***	554,10±0,93***	585,43±1,55***
Hidroxicinámicos	141,78±0,73	146,67±1,38**	126,41±2,15***	83,71±1,58***	144,43±6,22	129,32±1,61***
Flavonoles	87,76±0,51	100,84±1,26***	90,61±1,84*	83,80±1,29**	87,92±5,09	94,87±1,33***
Estilbenos	40,56±0,65	46,93±1,01***	38,77±0,72*	39,35±0,84	34,74±1,68***	40,71±1,67

\*\*\* p≤0,001 \*\* p≤0,01 \* p≤0,05

**Tabla 4.24.** Valores medios de compuestos fenólicos (mg/l) en vino Graciano (2014).

Compuestos	Testigo	Ciazofamida	Metrafenona BPA	Metrafenona CPA	Boscalid + Kresoxim-metil BPA	Boscalid + Kresoxim-metil CPA
Antocianos	600,95±9,60	532,87±32,62***	546,58±2,90***	603,69±1,53	672,41±18,42***	588,58±2,19
Hidroxicinámicos	108,12±0,82	94,09±1,79***	95,51±1,54***	117,59±1,36***	83,83±1,50***	70,17±1,20***
Flavonoles	45,53±0,66	45,21±1,23	51,92±1,21***	50,36±0,46***	84,27±0,52***	75,20±0,84***
Estilbenos	38,63±0,52	31,01±1,15***	37,30±1,41	39,33±1,05	45,64±1,01***	39,69±0,92

\*\*\* p≤0,001 \*\* p≤0,01 \* p≤0,05

En las Tablas 4.25. y 4.26. se exponen las comparaciones entre las distintas parejas de vinos con fungicidas, tratados en campo bajo BPA y CPA, así como la fortificación de ciazofamida en bodega durante la vendimia de 2014. Como se observa, se pone de manifiesto que en Tempranillo aparecen diferencias significativas en el contenido de antocianos entre todas las parejas de plaguicidas. En el caso de los derivados hidroxicinámicos no se encuentran diferencias significativas para metrafenona BPA/boscalid+kresoxim-metil CPA y ciazofamida/boscalid+kresoxim-metil BPA. Para los flavonoles tampoco hay diferencias significativas con metrafenona BPA/ boscalid+kresoxim-metil BPA y boscalid+kresoxim-metil BPA y CPA. Por último, el

efecto del tratamiento en BPA y CPA para metrafenona, así como los tratamientos boscalid+kresoxim-metil CPA/metrafenona CPA no afectan significativamente al contenido de estilbenos

**Tabla 4.25.** Relación entre compuestos fenólicos y fungicidas en vino Tempranillo BPA y CPA (2014).

Fungicidas	Antocianos	Hidroxicinámicos	Flavonoles	Estilbenos
MET BPA-CIAZO	***	***	***	***
MET BPA-BOSC BPA	***	***		***
MET BPA-BOSC CPA	***		*	**
MET BPA-MET CPA	***	***	***	
CIAZO-BOSC BPA	***		***	***
CIAZO-BOSC CPA	***	***	***	***
CIAZO-MET CPA	***	***	***	***
BOSC BPA-BOSC CPA	***	***		***
BOSC BPA-MET CPA	***	***	**	***
BOSC CPA-MET CPA	***	***	***	

\*\*\*p≤0,001 \*\*p≤0,01 \*p≤0,05.

MET=Metrafenona, FEN=Fenhexamida, BOSC= Boscalid+kresoxim-metil; MEP= Mepanipirim.

**Tabla 4.26.** Relación entre compuestos fenólicos y fungicidas en vino Graciano BPA y CPA (2014).

Fungicidas	Antocianos	Hidroxicinámicos	Flavonoles	Estilbenos
MET BPA-CIAZO			***	***
MET BPA-BOSC BPA	***	***	***	***
MET BPA-BOSC CPA	***	***	***	***
MET BPA-MET CPA	***	***	*	**
CIAZO-BOSC BPA	***	***	***	***
CIAZO-BOSC CPA	***	***	***	***
CIAZO-MET CPA	***	***	***	***
BOSC BPA-BOSC CPA	***	***	***	***
BOSC BPA-MET CPA	***	***	***	***
BOSC CPA-MET CPA		***	***	

\*\*\*p≤0,001 \*\*p≤0,01 \*p≤0,05.

MET=Metrafenona, FEN=Fenhexamida, BOSC= Boscalid+kresoxim-metil; MEP= Mepanipirim.

En la variedad Graciano, no observamos diferencias significativas en los contenidos de antocianos y derivados hidroxicinámicos entre la pareja de vinos tratados con metrafenona BPA y ciazofamida. Asimismo, la pareja boscalid+kresoxim-metil CPA/metrafenona CPA no afecta al contenido de antocianos y estilbenos.

En las Figuras 4.17. a 4.20., se muestra la variación de los compuestos fenólicos respecto al vino testigo en la vendimia 2012, así como sus tendencias porcentuales de variación. Podemos observar un comportamiento diferente entre vino Tempranillo y Graciano.

Así en Tempranillo, encontramos que boscalid+kresoxim-metil y mepanipirim reducen el contenido en compuestos fenólicos frente al del vino testigo. Metrafenona reduce los estilbenos y antocianos e incrementa los derivados hidroxicinámicos y flavonoles. Fenhexamida sólo reduce los flavonoles y estilbenos respecto vino testigo.

En Graciano, mepanipirim y metrafenona incrementan frente al vino testigo, el contenido de ácidos hidroxicinámicos y flavonoles; boscalid+kresoxim-metil sólo flavonoles.

Cuando estudiamos el efecto de los fungicidas en la fracción fenólica respecto al vino testigo (Figuras 4.19. y 4.20.), se puede observar que en vino Graciano los valores de los contenidos de las diferentes fracciones fenólicas están prácticamente dentro del intervalo del  $\pm 20\%$ ; mientras que en Tempranillo, metrafenona supera dicho rango.

En los vinos Graciano de esta misma vendimia el comportamiento difiere respecto Tempranillo. Boscalid+kresoxim-metil en este caso aumenta los flavonoles y sigue disminuyendo el resto. Mepanipirim aumenta estilbenos, flavonoles y derivados hidroxicinámicos. Metrafenona mantiene un efecto similar al de Tempranillo y fenhexamida disminuye todos menos flavonoles que se mantienen respecto al testigo.

En las Figuras 4.21. a 4.24., se representan las diferencias entre los contenidos de compuestos fenólicos de los vinos Tempranillo clarificados y no clarificados frente a los del vino testigo.

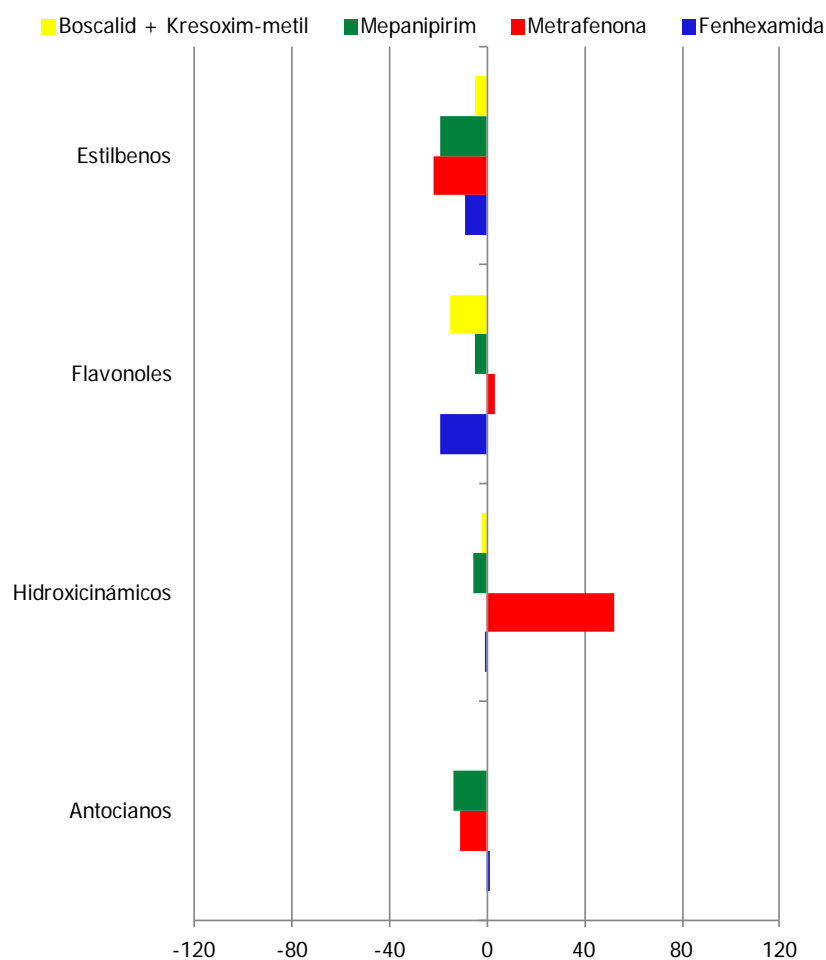


Figura 4.17. Variación de los compuestos fenólicos (%) respecto al vino control en variedad Tempranillo (2012).

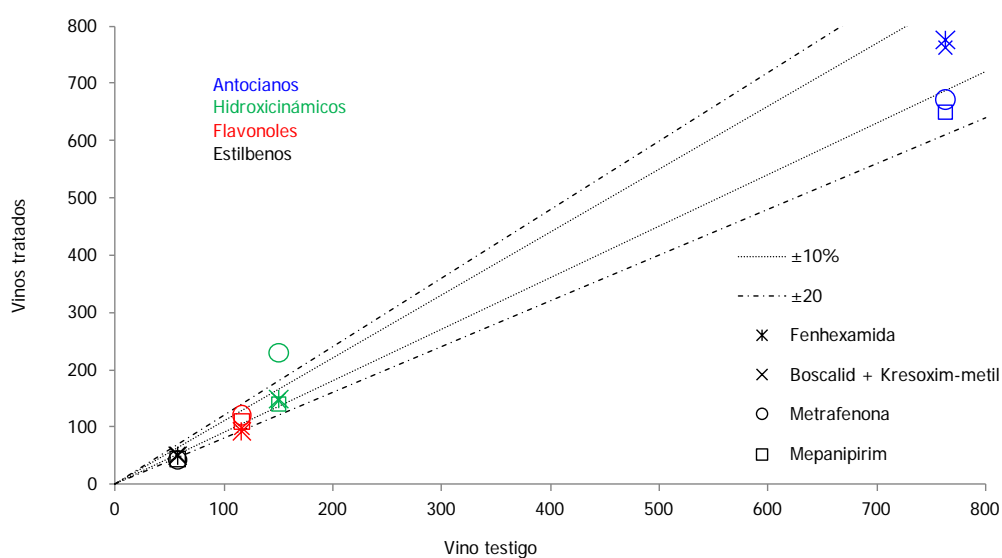
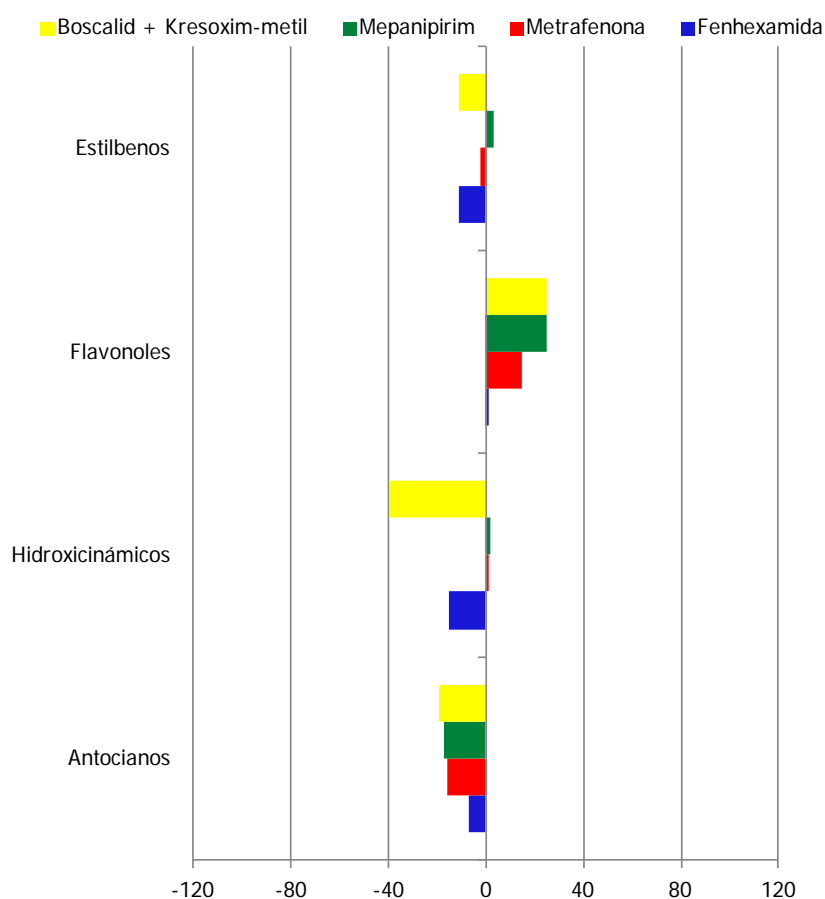
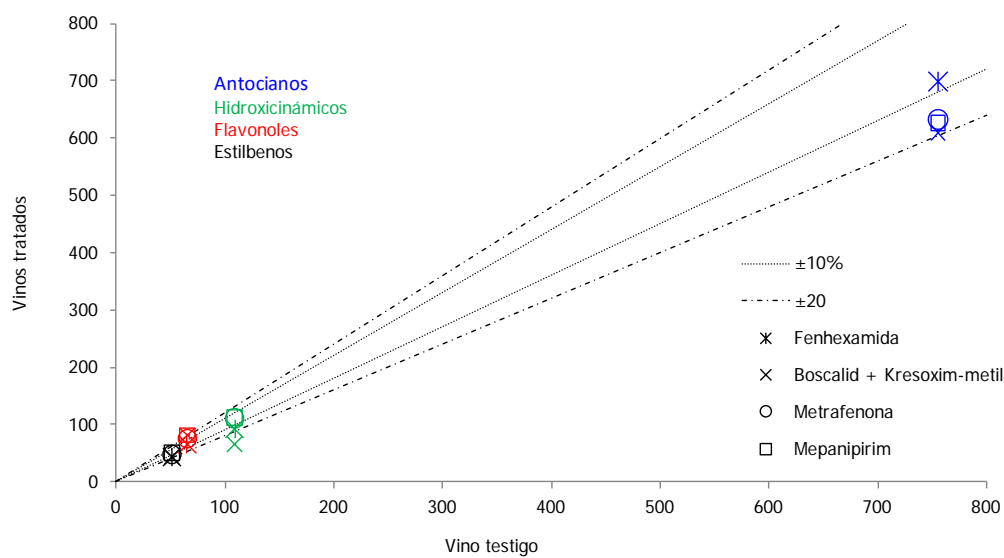


Figura 4.18. Relación entre fungicidas y compuestos fenólicos, frente al vino testigo, variedad Tempranillo (2012).



**Figura 4.19** Variación de los compuestos fenólicos respecto al vino control, variedad Graciano (2012).



**Figura 4.20** Relación entre fungicidas y compuestos fenólicos, frente al vino testigo, variedad Graciano (2012).

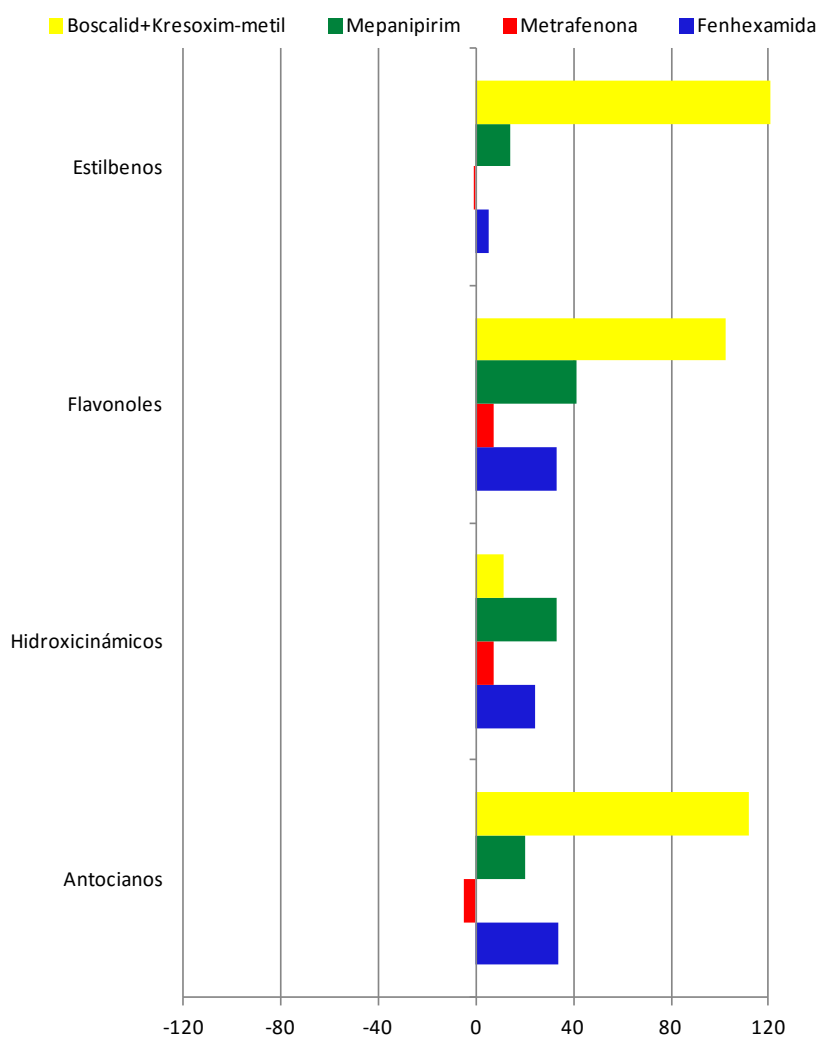


Figura 4.21. Variación de los compuestos fenólicos respecto al vino testigo clarificado, Tempranillo (2013).

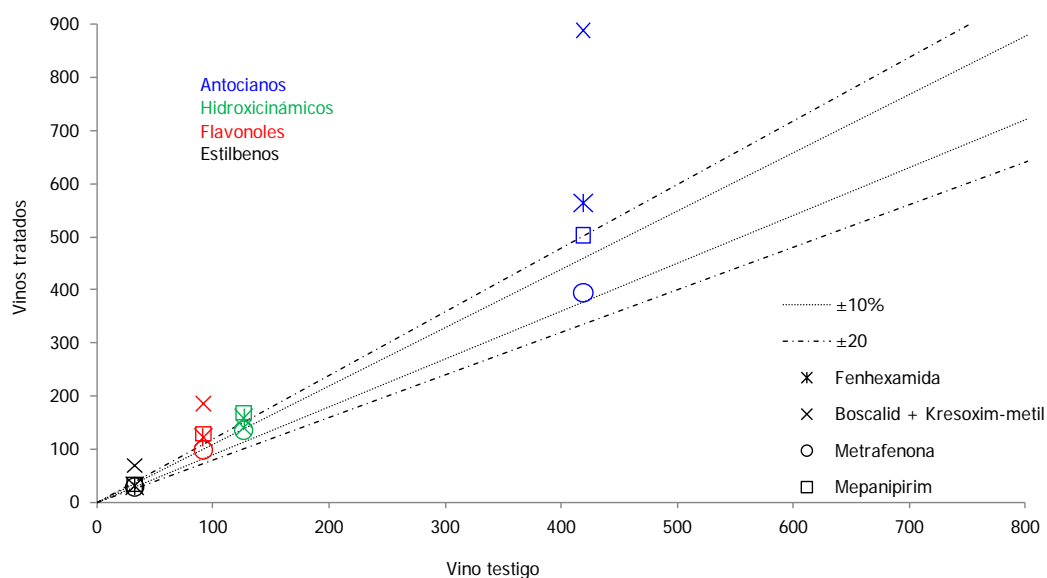


Figura 4.22. Relación entre fungicidas y compuestos fenólicos, frente al vino testigo clarificado. Tempranillo (2013).

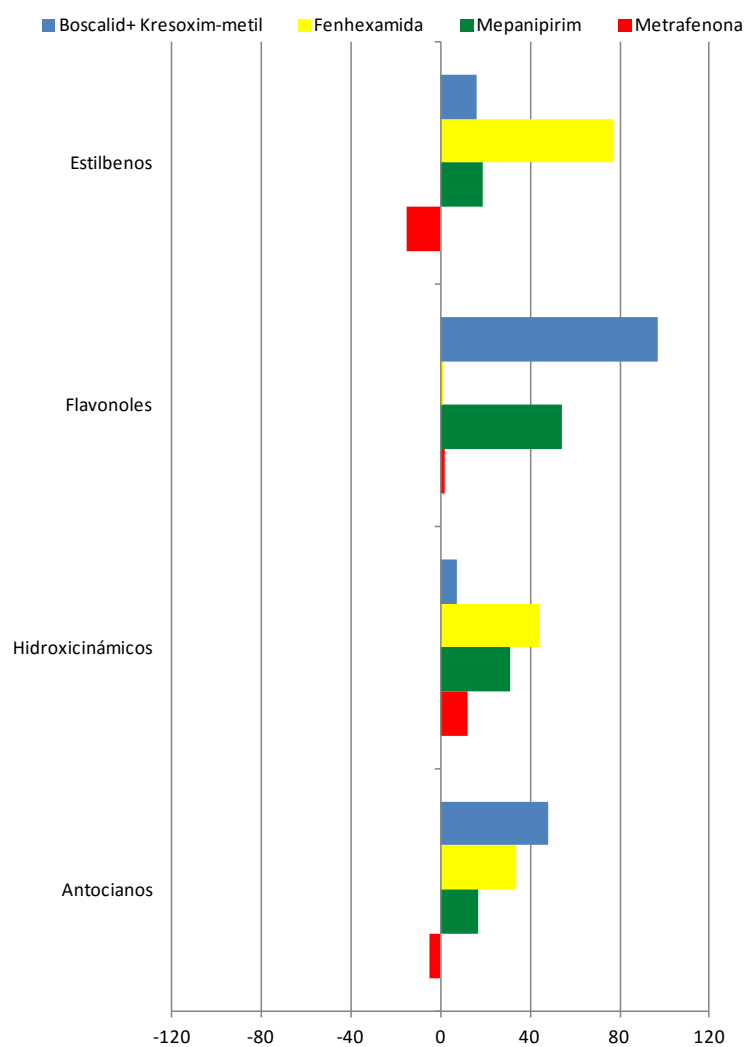


Figura 4.23. Variación de los compuestos fenólicos respecto al vino testigo sin clarificar. Tempranillo (2013).

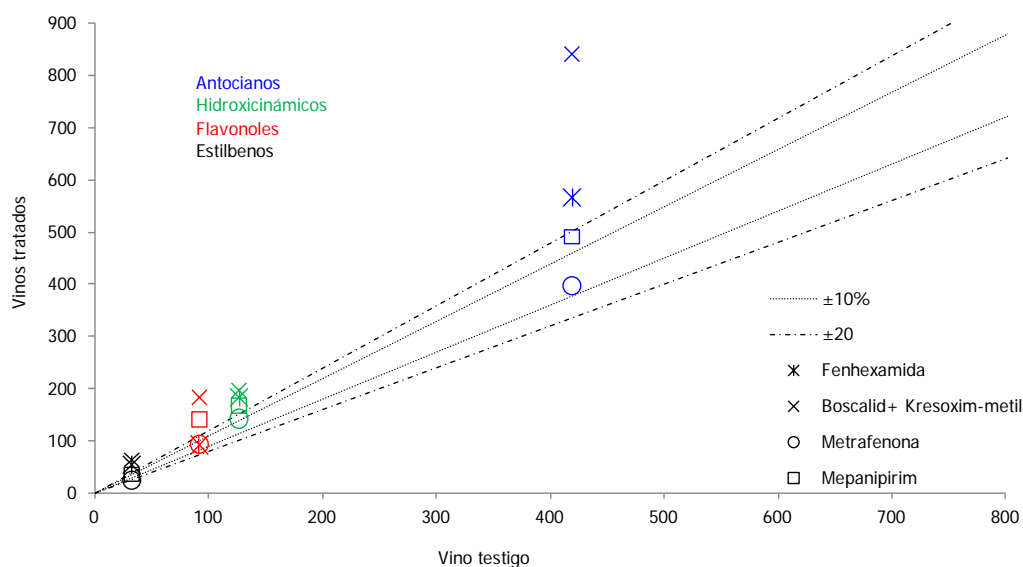
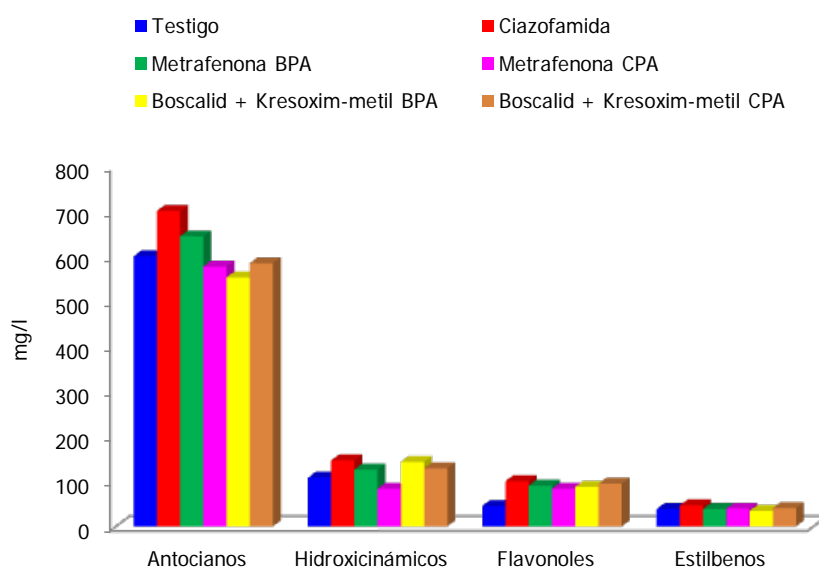


Figura 4.24. Relación entre fungicidas y compuestos fenólicos, frente al vino testigo sin clarificar. Tempranillo (2013).

En todos los casos, el comportamiento es similar en vino clarificado y sin clarificar, solamente con vinos con residuos de metrafenona se produce una disminución del contenido de antocianos en el vino tanto antes como después del proceso de clarificación y en el vino sin clarificar que también se reducen los contenidos de estilbenos respecto al vino testigo.

Por último, se han estudiado los efectos que sobre la calidad y composición de los vinos tienen los tratamientos fitosanitarios según se realicen bajo condiciones de Buenas o Críticas Prácticas Agrícolas (BPA o CPA) durante la vendimia de 2014. Al mismo tiempo, estudiamos la interacción del fungicida ciazofamida añadido durante la vinificación sobre los compuestos fenólicos en los vinos de las dos variedades. En las Figuras 4.25. y 4.26. se representan las concentraciones de los compuestos fenólicos encontrados en los vinos Tempranillo y Graciano estudiados.

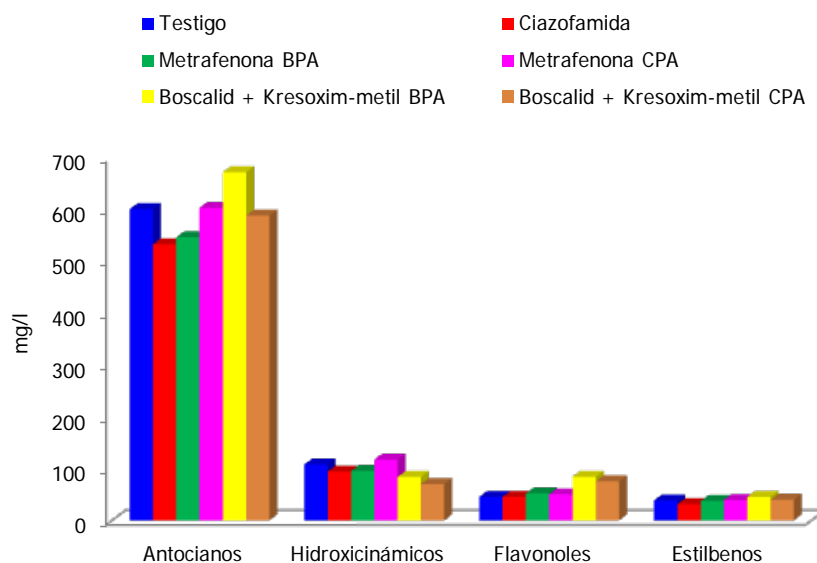


**Figura 4.25.** *Compuestos fenólicos en vino Tempranillo (2014).*

Se observa claramente como en los dos casos, tal como ya habíamos comentado anteriormente, los antocianos son los componentes mayoritarios de la fracción fenólica, seguidos de ácidos hidroxicinámicos, flavonoles y estilbenos.

La presencia de residuos incrementa los contenidos de flavonoles y estilbenos; en el caso de hidroxicinámicos ocurre lo mismo excepto con metrafenona CPA. Por último, los antocianos sólo se ven aumentados con la presencia de ciazofamida y metrafenona BPA.





**Figura 4.26.** *Compuestos fenólicos en vino Graciano (2014).*

En las Figuras 4.27. a 4.30., se representan las diferencias entre los contenidos en compuestos fenólicos de los vinos Tempranillo y Graciano procedentes de uvas tratadas en campo con boscalid+kresoxim-metil y metrafenona, en condiciones de BPA y CPA durante la cosecha de 2014, así como los obtenidos después de fortificar la uva con ciazofamida en bodega, así como las relaciones entre fungicidas y fracción fenólica frente al vino testigo. En la variedad Tempranillo la fracción fenólica se encuentra en el intervalo de  $\pm 20\%$  respecto al testigo excepto en el caso de la presencia de metrafenona CPA para los compuestos hidroxicinámicos. En Graciano este hecho sólo ocurre con los antocianos (Figura.4.28. y 4.30.).

En vino Tempranillo se produce un incremento de antocianos en los vinos con ciazofamida y metrafenona BPA. Los ácidos hidroxicinámicos disminuyen con todos excepto con ciazofamida y boscalid+kresoxim-metil BPA; flavonoles sólo disminuyen en los vinos tratados con metrafenona CPA. Por último los estilbenos sólo aumentan con la presencia de ciazofamida.

En los vinos Graciano encontramos que los antocianos sólo aumentan con la presencia de boscalid+kresoxim-metil BPA. Los derivados hidroxicinámicos igualmente sólo aumentan con la presencia de metrafenona CPA; al contrario, los flavonoles aumentan con la presencia de todos los fungicidas excepto ciazofamida. Finalmente los estilbenos solamente presentan una disminución en presencia de metrafenona BPA y ciazofamida.

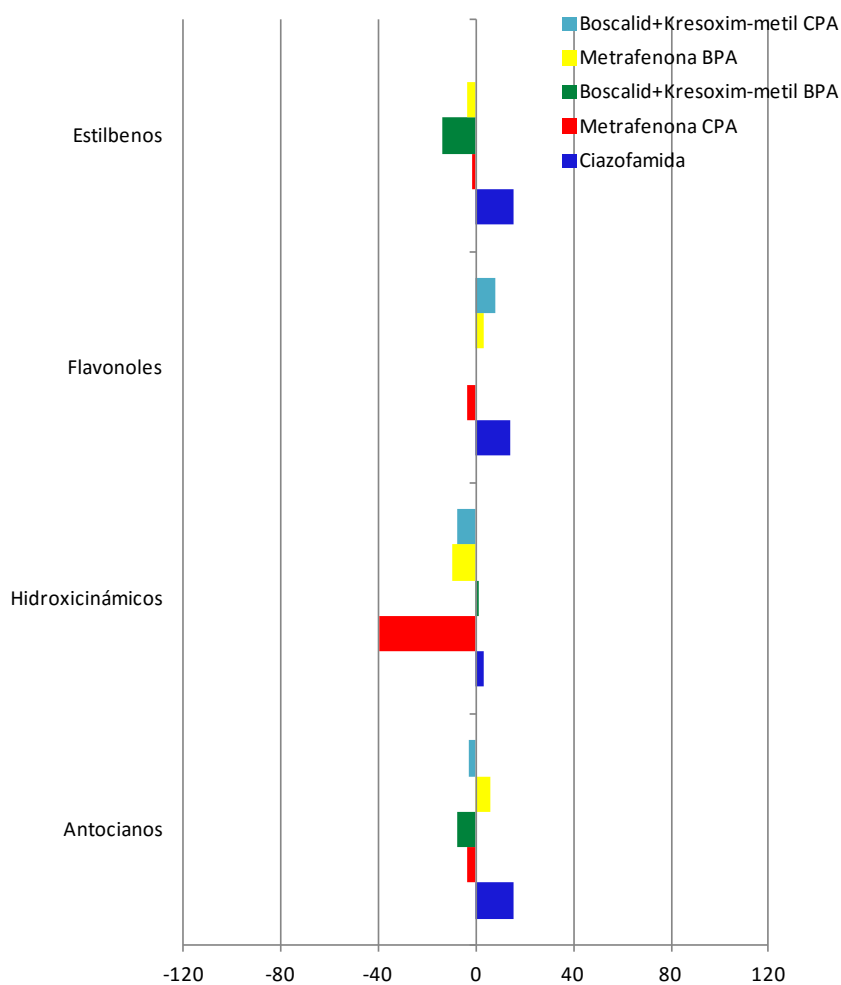


Figura 4.27. Variación de compuestos fenólicos respecto al vino Tempranillo control (2014).

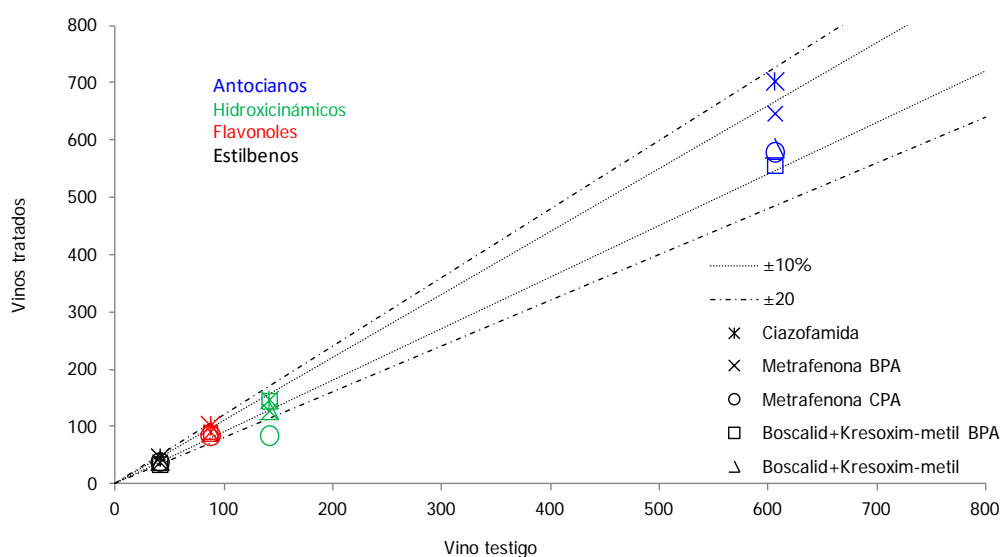


Figura 4.28. Diferencias entre compuestos fenólicos respecto al vino Tempranillo control. (2014).

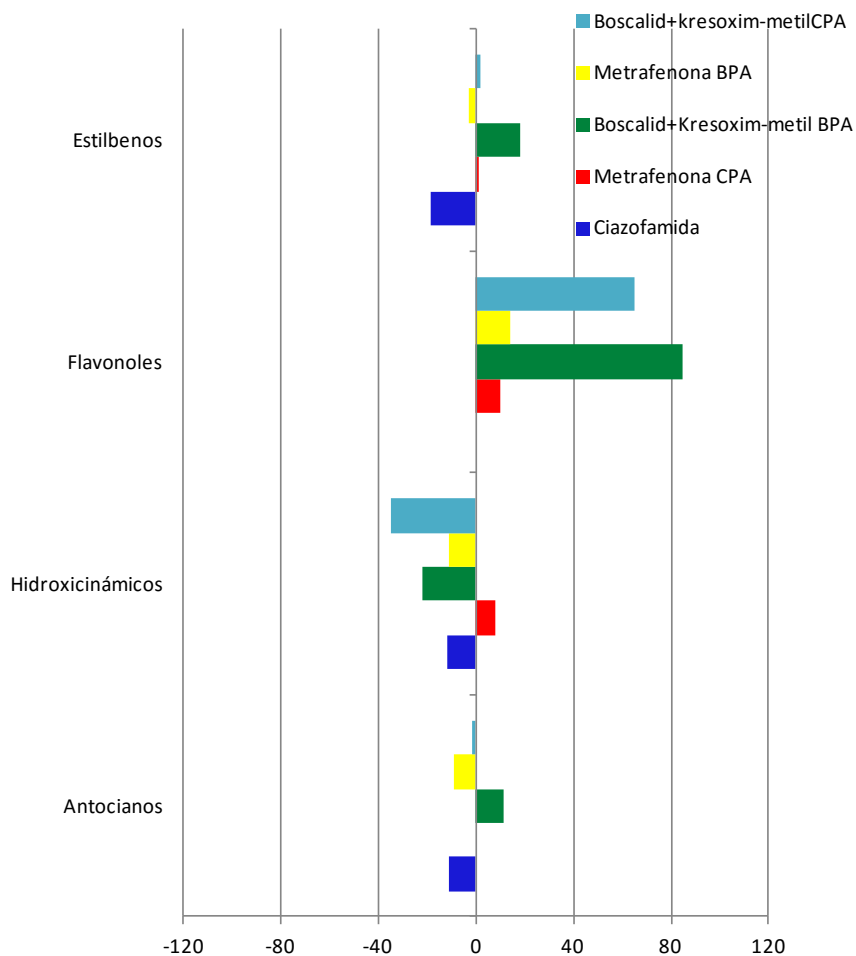


Figura 4.29. Variación de compuestos fenólicos respecto al vino Graciano control (2014).

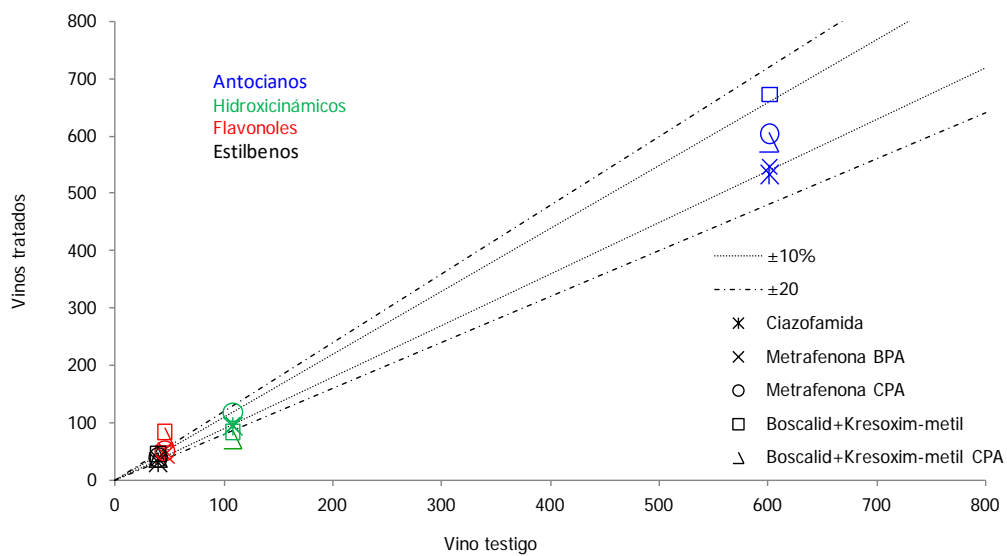


Figura 4.30. Diferencias entre compuestos fenólicos respecto al vino Graciano control (2014).

Estos resultados están en concordancia con diferentes estudios que ponen de manifiesto que en vinos tintos, los compuestos fenólicos pueden llegar a presentar concentraciones superiores a 1- 2 g/l, y que en general los valores obtenidos dependen de diferentes parámetros como variedad uva, condiciones agronómicas de la vid, condiciones edafoclimáticas, metodología analítica empleada, etc. (González-Paramás et al., 2004, Soleas et al., 2002; Pérez-Magariño y González-Sanjosé, 2004).

### 4.3. BIODISPONIBILIDAD.

#### 4.3.1. BIODISPONIBILIDAD DE FUNGICIDAS.

##### 4.3.1.1. Efecto de la matriz y de la concentración.

Para comprobar la influencia de la matriz y de la concentración sobre el proceso de biodisponibilidad en las pruebas *in vitro* de los residuos de fungicidas, se utilizaron 6 niveles de concentración para cada uno de ellos, tanto en agua (control), como en uva y vino (0,1; 0,5; 1; 2; 5; y 10 ppm). Todas las muestras se fortificaron con una disolución patrón multirresiduos para que los fungicidas alcanzaran las concentraciones antes citadas.

En la tabla 4.27. se exponen los resultados encontrados expresados como concentración de cada plaguicida en el dializado. En uva y vino el proceso de dialización en membrana semipermeable comienza a producirse a partir de concentraciones superiores a 2 ppm, y en agua a partir de 5 ppm,

**Tabla 4.27.** Concentración en el dializado de cada fungicida en las tres matrices estudiadas.

Fungicida	Agua			Uva			Vino		
	2 ppm	5 ppm	10 ppm	2 ppm	5 ppm	10 ppm	2 ppm	5 ppm	10 ppm
Boscalid	<0,01	0,22	1,00	<0,01	0,36	0,56	0,19	0,57	0,64
Ciazofamida	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,10	0,31	<0,01	0,28	0,36
Fenhexamida	<0,01	0,36	1,27	0,13	0,39	0,66	0,19	0,56	0,72
Kresoxim-metil	<0,01	<0,01	0,91	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,20
Mepanipirim	<0,01	0,25	1,01	<0,01	0,27	0,57	0,14	0,52	0,61
Metrafenona	<0,01	<0,01	0,68	<0,01	<0,01	0,41	<0,01	0,44	0,50

Los resultados obtenidos muestran un claro efecto de la matriz sobre la capacidad de biodisponibilidad de los seis fungicidas estudiados. Así cuando se utiliza la

disolución control, es decir agua, encontramos que no se produce dialización alguna para ningún fungicida a concentraciones inferiores a 2 ppm. Ciazofamida no se dializa a ninguna de las concentraciones ensayadas; boscalid, fenhexamida y mepanipirim presentan diálisis a 5 y 10 ppm. Por último, kresoxim-metil y metrafenona sólo se dializan a la concentración de 10 ppm.

En el caso de uva, kresoxim-metil no se dializa a ninguna de las concentraciones estudiadas; mientras que metrafenona lo hace sólo a 10 ppm. Boscalid, ciazofamida y mepanipirim presentan diálisis para las concentraciones de 5 y 10 ppm. Fenhexamida se dializan a partir de la concentración de 2 ppm.

Cuando se utiliza vino como matriz, los resultados difieren de los de uva. Así, a la concentración de 10 ppm todos los fungicidas son dializados en mayor o menor grado y a 5 ppm solo kresoxim-metil no presenta este proceso. Ciazofamida y metrafenona tampoco dializan a la concentración de 2 ppm. Boscalid, fenhexamida y mepanipirim se dializan desde el nivel de 2 ppm.

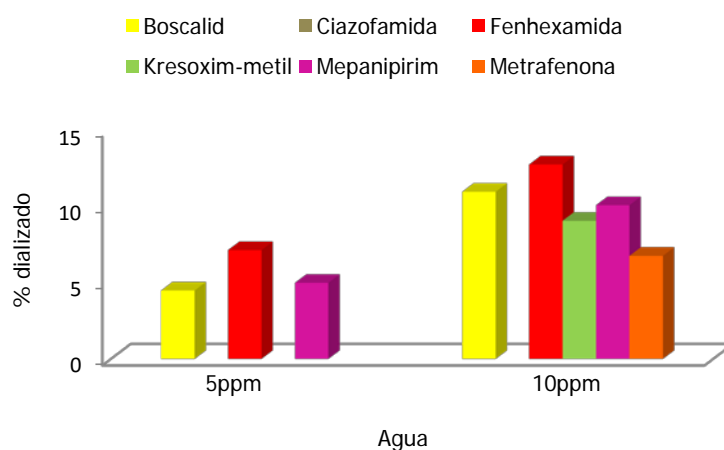
En la Tabla 4.28., se exponen los porcentajes de cada plaguicida dializados en cada matriz ensayada.

**Tabla 4.28.** Porcentajes de dialización de cada fungicida en las tres matrices estudiadas.

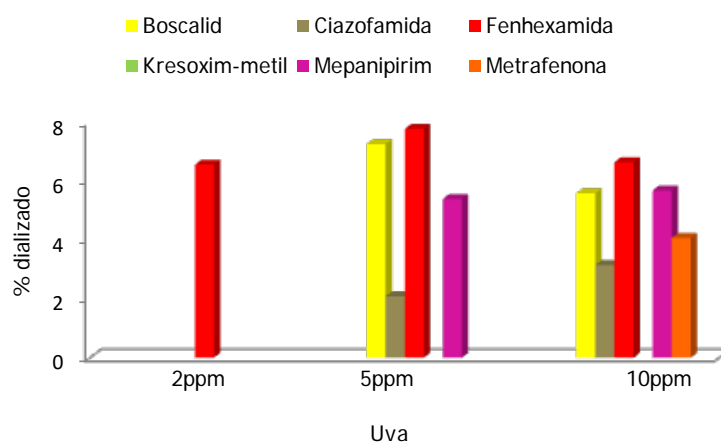
Fungicida	Agua			Uva			Vino		
	2 ppm	5 ppm	10 ppm	2 ppm	5 ppm	10 ppm	2 ppm	5 ppm	10 ppm
Boscalid	--	4,49	10,96	--	7,26	5,59	9,37	11,51	6,41
Ciazofamida	--	--	--	--	2,09	3,15	--	5,69	3,62
Fenhexamida	--	7,14	12,75	6,56	7,77	6,64	9,7	11,22	7,2
Kresoxim-metil	--	--	9,06	--	--	--	--	--	1,96
Mepanipirim	--	4,99	10,08	--	5,39	5,68	7,09	10,4	6,08
Metrafenona	--	--	6,76	--	--	4,07	--	8,82	5,03

En las Figuras 4.31. a 4.33., se representan los porcentajes de dialización de los fungicidas, por separado en las tres matrices ensayadas, a partir de la concentración de 5 ppm en agua y de 2 ppm en uva y vino.

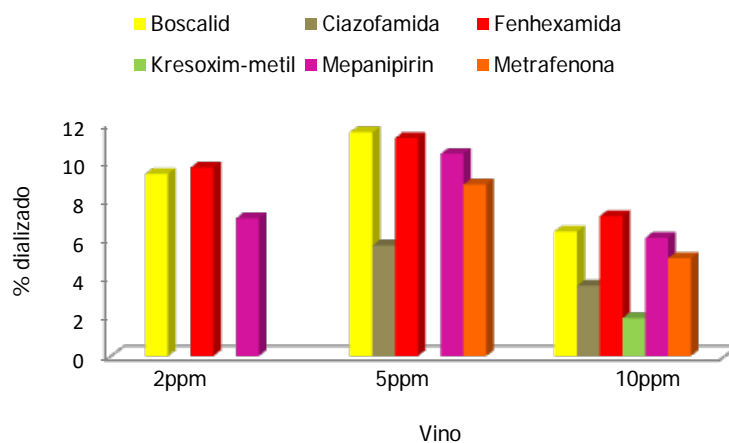
Los fungicidas que presentan mayor dialización son y por este orden: fenhexamida, boscalid y mepanipirim, en vino y en agua.



**Figura 4.31.** *Porcentajes dializados en agua.*



**Figura 4.32.** *Porcentajes dializados en uva.*



**Figura 4.33.** *Porcentajes dializados en vino.*

Boscalid, fenhexamida, mepanipirim y metrafenona presentan valores de dialización parecidos en todas las matrices. Ciazofamida, presenta muy bajas concentraciones de dialización en uva y vino, y solo a concentraciones superiores a 5 ppm. Kresoxim-metil sólo presenta dialización en medio líquido (agua y vino).

Fenhexamida, presenta porcentajes de dialización parecidos en los tres niveles en uva, mientras que en vino disminuye sensiblemente a 10 ppm, sin embargo en agua casi lo duplica. Kresoxim-metil, solamente se dializa en agua y vino para la concentración de 10 ppm. Mepanipirim, presenta dializaciones parecidas en uva; sin embargo, en vino disminuye sensiblemente en la concentración más alta, al contrario que en agua. Metrafenona, en uva y agua sólo dializa a 10 ppm y en vino disminuye aproximadamente la mitad de 5 a 10 ppm.

En general, debido posiblemente a que en la uva solamente existe fase acuosa y azúcares, el porcentaje de dialización en todos los casos es menor que en vino. En vino, existe fase acuosa-etanólica, y se observa que a partir de 5 ppm disminuye el porcentaje de dialización. En agua, siempre aumenta la dialización con la concentración.

Podemos finalizar afirmando que la matriz ejerce un efecto directo en el proceso de diálisis. Para concentraciones inferiores a 5 ppm, vemos que la presencia de uva y vino potencian la biodisponibilidad de boscalid, fenhexamida y mepanipirim. En el caso de muestras de vino a la concentración de 10 ppm se consiguen dializar todos los fungicidas y por tanto la capacidad de absorción en el proceso digestivo se refuerza.

En el proceso de diálisis en membrana semipermeable de plaguicidas, la composición química de las matrices, polaridad de sus componentes, mezclas, densidad, etc., pueden influir en el bloqueo de la membrana. Asimismo, se ha puesto de manifiesto que el etanol y otros alcoholes pueden ejercer interacciones inespecíficas con la membrana, produciendo un aumento en la fluidez de la misma (Taraschi & Rubin, 1985). Ello podría explicar los mayores valores encontrados en el proceso de diálisis en vino que en uva para todos los fungicidas. Además, la relación tamaño de partícula/polaridad podría ser la causante de las variaciones en los porcentajes

dializados que se producen entre las distintas matrices estudiadas (Monteiro et al., 2004).

También se observa una disminución en la capacidad de diálisis para la mayoría de los fungicidas estudiados cuando se utiliza la dosis de 10 ppm. Así, boscalid, fenhexamida, kresoxim-metil, mepanipirim y metrafenona presentan menor porcentaje de dialización en uva y vino que en agua; mientras que para ciazofamida la capacidad de diálisis se incrementa. Esto podría estar asociado tanto a las características moleculares de los plaguicidas como a la saturación de las membranas.

#### 4.3.1.2. Estudio de la biodisponibilidad de los fungicidas en vino.

En este apartado se exponen los resultados de los estudios de biodisponibilidad de los fungicidas estudiados, durante los tres años, aplicados en campo según criterios de BPA y CPA, así como añadidos al mosto en los depósitos de la bodega antes de la vinificación.

Al comparar los datos obtenidos al realizar el estudio de los vinos Tempranillo y Graciano el primer año (2012), debemos señalar los bajos niveles residuales encontrados. Los resultados se exponen en la Tabla 4.29.

**Tabla 4.29.** Concentraciones y porcentajes dializados de cada fungicida en los vinos Tempranillo y Graciano (2012).

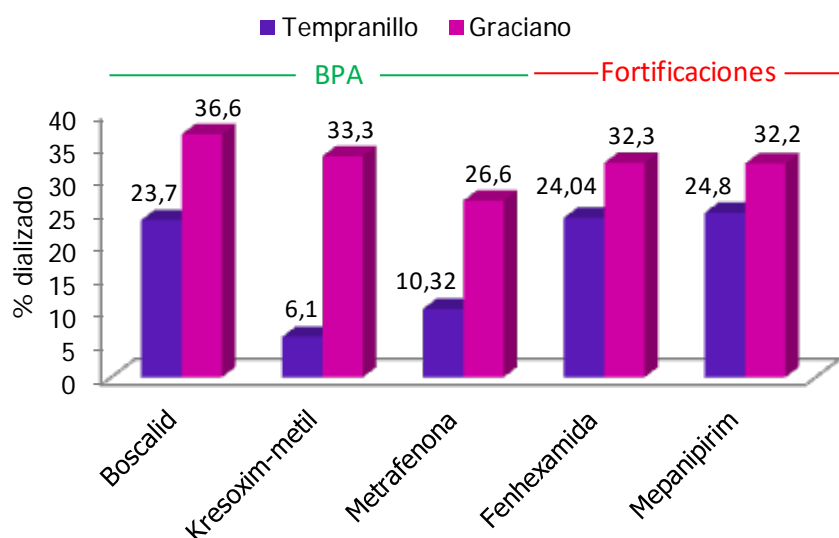
Vino	BPA						Fortificaciones			
	Boscalid		Kresoxim-metil		Metrafenona		Fenhexamida		Mepanipirim	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Tempranillo	0,26	23,7	0,02	6,1	0,02	10,3	0,61	24,04	0,06	24,8
Graciano	0,56	36,6	0,19	33,3	0,05	26,6	0,69	32,3	0,07	32,2

Como podemos observar, el vino elaborado con uva Graciano presenta un efecto matriz positivo, respecto al realizado con Tempranillo, aumentando el porcentaje dializado; circunstancia que puede ser debida a la distinta constitución de la matriz de ambas variedades de uva y por tanto de sus vinos (acidez total, azúcares residuales y grado alcohólico alcanzado) y por la concentración de los fungicidas en los vinos, ya que la diálisis está influenciada por la misma.



Los porcentajes de diálisis oscilan entre un mínimo de 6,1% para kresoxim-metil en vino de Tempranillo, hasta un máximo de 36,6% para boscalid en el de Graciano. En los vinos de Tempranillo el plaguicida que más se dializa es mepanipirim, en cambio en Graciano es boscalid el que presenta una mayor biodisponibilidad.

En la Figura 4.34., se representan gráficamente los porcentajes de dialización de los fungicidas estudiados en ambos vinos.



**Figura 4.34.** Porcentajes de biodisponibilidad de los residuos de fungicidas en vinos (2012).

También se constata que las diferencias estructurales y de las propiedades físico-químicas entre los distintos fungicidas influyen en el porcentaje dializado, sobre todo para kresoxim-metil.

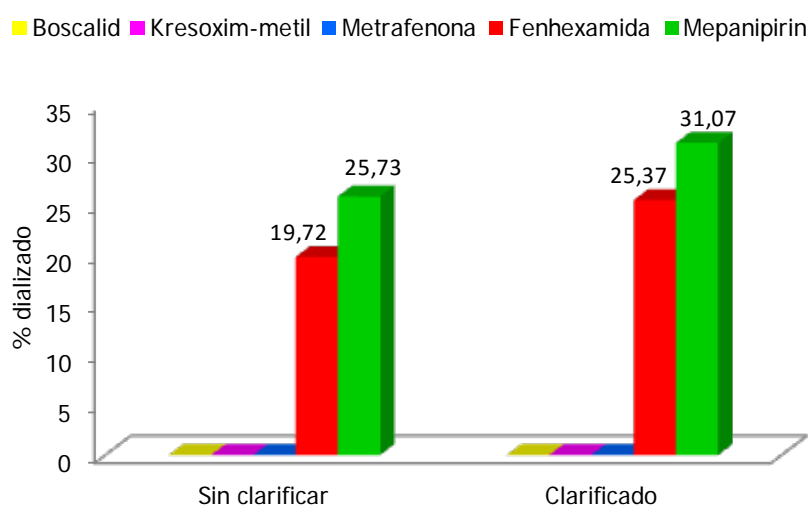
Durante el segundo año (2013), se estudió el efecto del proceso de clarificación en la biodisponibilidad de fungicidas en vinos variedad Tempranillo. En la Tabla 4.30., se exponen las cantidades de los fungicidas dializadas y sus correspondientes porcentajes, en vinos Tempranillo sin clarificar y clarificados.

**Tabla 4.30.** Cantidades y porcentajes de los fungicidas dializados en vinos sin clarificar y clarificados (2013).

Vino Tempranillo	BPA						Fortificaciones			
	Boscalid		Kresoxim-metil		Metrafenona		Fenhexamida		Mepanipirim	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Sin clarificar	<0,01	--	<0,01	--	<0,01	--	0,45	19,72	0,10	25,73
Clarificado	<0,01	--	<0,01	--	<0,01	--	0,59	25,37	0,11	31,07

Se comprueba que la clarificación tiene un ligero efecto positivo en la biodisponibilidad de los fungicidas; posiblemente debido a la eliminación de parte de sólidos en suspensión del vino, que facilita la dialización de los residuos; aunque como vimos anteriormente el proceso de clarificación no afectaba a su contenido residual final. En los vinos procedentes del tratamiento BPA y al no detectarse residuos de fungicidas, no se realizaron los ensayos de biodisponibilidad.

Vemos que en los vinos Tempranillo fortificados en bodega con fenhexamida y mepanipirim se observan diferencias en la capacidad de diálisis, según el vino esté o no clarificado; 19,72% no clarificado frente al 25,37% clarificado para fenhexamida y 25,73% sin clarificar frente al 31,07% clarificado para mepanipirim, encontrando una mayor posibilidad de absorción de los residuos por el organismo (más del 22%) para el clarificado ya que se incrementa la capacidad de diálisis de los fungicidas y en consecuencia su biodisponibilidad (Figura 4.35.).



**Figura 4.35.** Porcentajes dializados en vinos Tempranillo sin clarificar y clarificados (2013).

Las diferencias entre los vinos con tratamientos BPA y los fortificados en bodega, pueden deberse también a que en el proceso de vinificación la clarificación puede reducir los residuos de plaguicidas y dado que las concentraciones iniciales en los vinos son muy bajas, este proceso puede provocar que las determinaciones analíticas se sitúen por debajo de su límite de cuantificación. En el caso de la fortificación en bodega, las cantidades residuales iniciales y su determinación se sitúa en niveles más altos (Navarro et al., 1999; Oliva et al., 1999; Fernández et al., 2002 y 2005b; Oliva et al., 2007b).

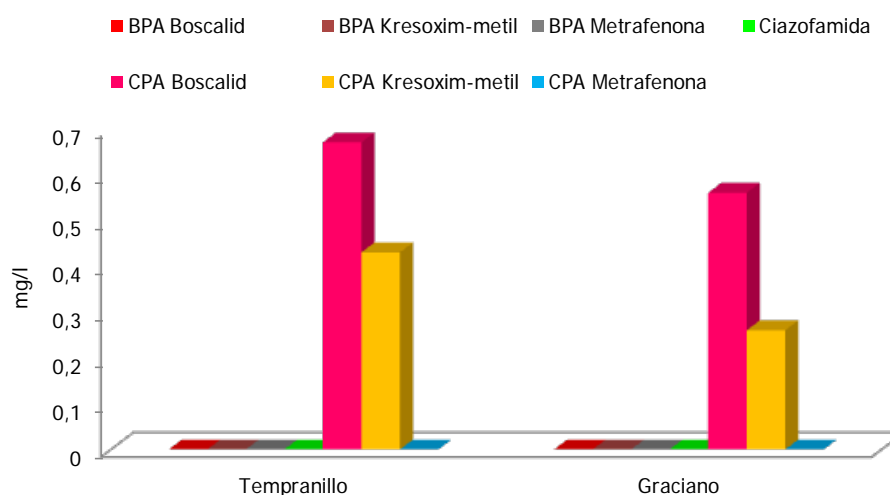
Finalmente y durante el último año (2014), se estudió la biodisponibilidad de dos fungicidas aplicados en campo la mezcla boscalid+kresoxim-metil (Collis®) y metrafenona (Vivando®), bajo BPA y CPA; así como de ciazofamida (Mildicut®) añadida al mosto en bodega.

En la Tabla 4.31., se exponen las concentraciones de residuos en los dializados de los vinos analizados y sus porcentajes de dialización.

**Tabla 4.31.** Porcentajes dializados y concentraciones de los fungicidas estudiados (2014).

Vino	BPA						Fortificaciones		CPA					
	Boscalid		Kresoxim-metil		Metrafenona		Ciazofamida		Boscalid		Kresoxim-metil		Metrafenona	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Tempranillo	<0,01	--	<0,01	--	<0,01	--	<0,01	--	0,67	21,34	0,43	28,95	<0,01	--
Graciano	<0,01	--	<0,01	--	<0,01	--	<0,01	--	0,56	26,87	0,26	31,76	<0,01	--

En las Figuras 4.36. y 4.37., se muestran sus representaciones gráficas para una más fácil comprensión.



**Figura 4.36.** Concentración de los fungicidas dializados en vinos (2014).

En condiciones de BPA los vinos no presentan residuos cuantificables y por lo tanto no se realizaron las pruebas de biodisponibilidad *in vitro*. Para los tratados bajo CPA, los porcentajes de dialización de boscalid y kresoxim-metil se sitúan entre el 21-31%, mientras que metrafenona no presenta dialización. En el caso de la ciazofamida añadida al mosto no se produce dialización de la materia activa.

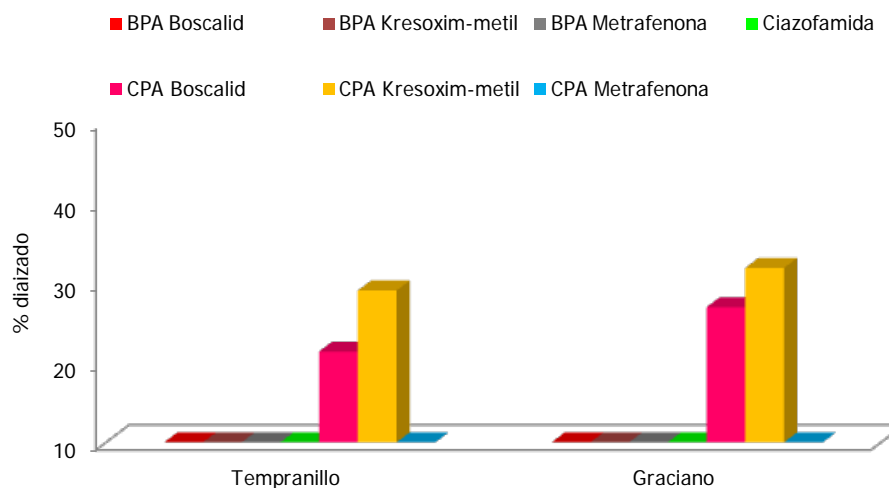


Figura 4.37. Porcentajes de los fungicidas dializados en vinos (2014).

## 4.3.2. BIODISPONIBILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

### 4.3.2.1. Biodisponibilidad de la actividad antioxidante.

Se ha estudiado el efecto del proceso de biodisponibilidad *in vitro* de la actividad antioxidante de los mismos vinos en los que se estudiaron residuos de fungicidas y el resto de las medidas de compuestos fenólicos.

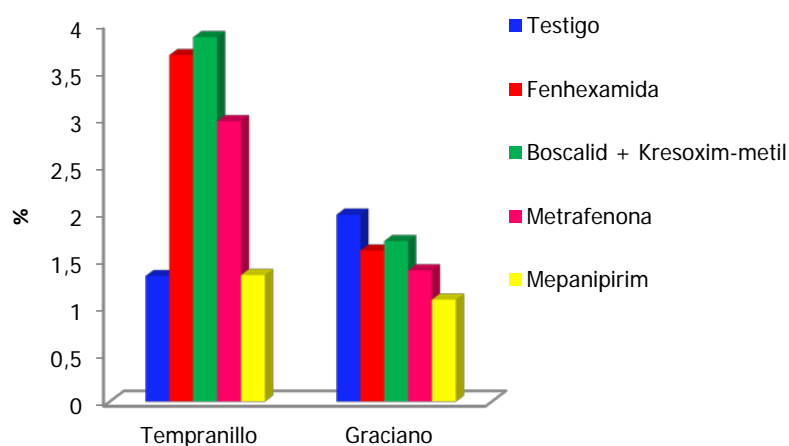
Así, en el primer año se compararon los valores de la actividad antioxidante antes y después de haber realizado la biodisponibilidad *in vitro* de los vinos Tempranillo y Graciano, con las aplicaciones en campo y las fortificaciones en bodega (Tabla 4.32.).

Tabla 4.32.- Biodisponibilidad de actividad antioxidante (DPPH) (mM Trolox/ml) y porcentaje dializado en vino Tempranillo y Graciano (2012).

Vino	Testigo		Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Metrafenona		Mepanipirim	
	AA	%	AA	%	AA	%	AA	%	AA	%
Tempranillo	0,1	1,33	0,26	3,67	0,28	3,86	0,25	2,97	0,1	1,34
Graciano	0,1	1,98	0,08	1,60	0,07	1,70	0,07	1,39	0,05	1,08

La presencia de residuos de fenhexamida, mezcla de boscalid y kresoxim-metil y metrafenona, provocan un ligero aumento en la biodisponibilidad de la actividad antioxidante de los vinos Tempranillo; cosa que no ocurre en el vino Graciano, donde

los valores prácticamente no varían, aunque en los correspondientes vinos testigo los valores de Graciano son ligeramente superiores. En la Figura 4.38., se representan gráficamente los porcentajes dializados de la actividad antioxidante de ambos vinos.



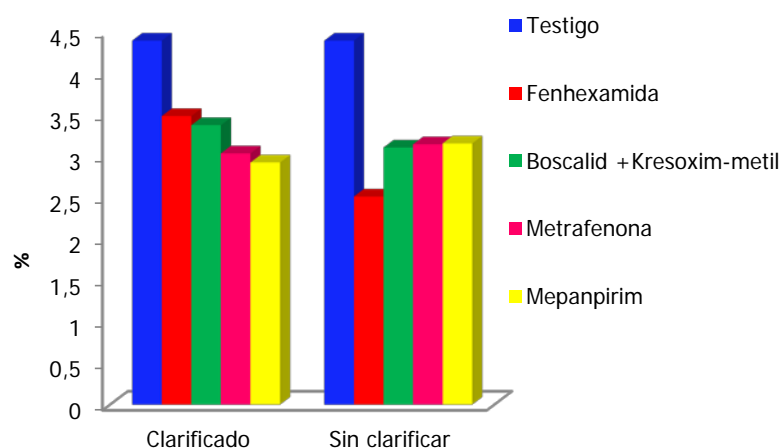
**Figura 4.38.** Porcentajes dializados de la actividad antioxidante de vinos Tempranillo y Graciano (2012).

Al año siguiente se realizaron los mismos cálculos con los vinos Tempranillo, antes y después del proceso de clarificación. En la Tabla 4.33., se exponen los valores de la actividad antioxidante encontrada en los dializados de ambos vinos, así como los porcentajes obtenidos.

**Tabla 4.33.** Biodisponibilidad de actividad antioxidante (DPPH) (mM Trolox/ml) y porcentaje dializado en vino Tempranillo clarificado y sin clarificar (2013).

Tempranillo	Testigo		Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Metrafenona		Mepanipirim	
	AA	%	AA	%	AA	%	AA	%	AA	%
Clarificado	0,32	4,39	0,24	3,48	0,25	3,37	0,20	3,03	0,21	2,92
Sin clarificar	0,32	4,39	0,19	2,51	0,23	3,10	0,21	3,14	0,23	3,15

Como se observa, el proceso de clarificación no afecta a la biodisponibilidad de la actividad antioxidante y para todos los casos los valores presentan muy pequeñas diferencias. En la Figura 4.39., se representan gráficamente los porcentajes dializados del vino Tempranillo clarificado y sin clarificar.



**Figura 4.39.** Porcentajes dializados de la actividad antioxidante de vinos Tempranillo clarificados y sin clarificar (2013).

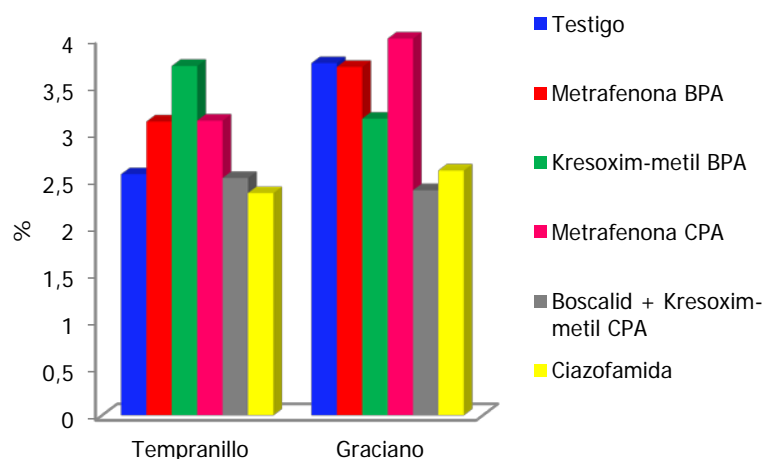
Finalmente, se analizó la actividad antioxidante de los vinos Tempranillo y Graciano, a los que se aplicó las formulaciones de fenhexamida y boscalid + kresoxim-metil, en condiciones de BPA y CPA; así como fortificados en bodega con ciazofamida. En la Tabla 4.34., se exponen los valores de actividad antioxidante dializada junto con los porcentajes que suponen respecto a los valores iniciales encontrados.

**Tabla 4.34.-** Biodisponibilidad de actividad antioxidante (DPPH) (mM Trolox/ml) y porcentaje dializado en vinos Tempranillo y Graciano tratados bajo BPA y CPA (2014).

Vino	Testigo		BPA				CPA				Fortificación	
			Metrafenona		Boscalid + Kresoxim-metil		Metrafenona		Boscalid + Kresoxim-metil		Ciazofamida	
	AA	%	AA	%	AA	%	AA	%	AA	%	AA	%
Tempranillo	0,15	2,56	0,17	3,12	0,19	3,71	0,17	3,13	0,14	2,52	0,13	2,36
Graciano	0,19	3,74	0,21	3,70	0,19	3,15	0,24	4,00	0,12	2,39	0,13	2,60

Si analizamos cómo ha afectado el proceso de digestión *in vitro* al potencial efecto antioxidante de los distintos vinos con presencia de residuos de fungicidas, podemos destacar como el dializado de las muestras con metrafenona y con la mezcla de boscalid + kresoxim-metil aumentan ligeramente el porcentaje de dialización de Tempranillo frente al testigo. La presencia de ciazofamida en ambos vinos provoca una disminución de su biodisponibilidad.

En la Figura 4.40., se representan gráficamente los porcentajes de la actividad antioxidante dializados para los vinos de este año.



**Figura 4.40.** Porcentajes dializados de actividad antioxidante de vinos Tempranillo y Graciano, tratados bajo BPA y CPA (2014).

Los datos expuestos, parecen estar en consonancia con los publicados por diversos autores, aunque estudiaran materiales diferentes. Así, se comprobó que diversos zumos de frutas infantiles presentaban valores de actividad antioxidante significativamente menores (19% del valor inicial) al someterlos a digestiones gastrointestinales *in vitro* (Perales et al., 2008).

En trabajos realizados con fresas y moras se observaron también valores de actividad antioxidante del 50% del valor inicial en fresas y de hasta un 84% en moras, cuando se sometían a digestión; aunque estos valores varían también dependiendo del método de medida que se utilice (Cerezo et al., 2010; Tavares et al., 2012).

La bibliografía consultada, corrobora que influye en la biodisponibilidad de la capacidad antioxidante, tanto su valor inicial (pérdidas de solo el 25% en té), como el tipo de matriz estudiado (Record y Lane, 2001; Gawlik-Dziki et al., 2009; Cilla et al., 2011; Wootton-Beard et al., 2011; Chandrasekara y Shahidi, 2012).

#### 4.3.2.2. Biodisponibilidad de polifenoles totales.

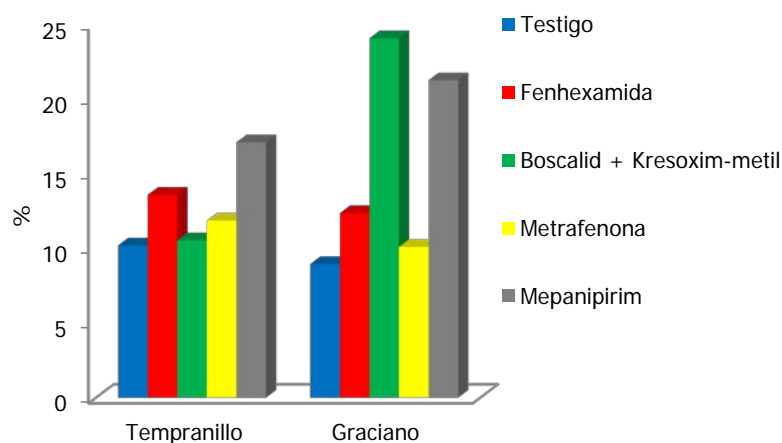
En este apartado se exponen los resultados de los estudios de biodisponibilidad de los valores de polifenoles totales de todos los vinos estudiados.

En la Tabla 4.35., se presentan los resultados de los vinos Tempranillo y Graciano, tratados bajo BPA y fortificados en bodega en el primer año (2012), expresados los polifenoles totales (Pf Tot) en g/l.

**Tabla 4.35.** Biodisponibilidad de polifenoles totales (g/l) y porcentajes dializados en vino Tempranillo y Graciano (2012).

Vino	Testigo		Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Metrafenona		Mepanipirim	
	Pf Tot	%	Pf Tot	%	Pf Tot	%	Pf Tot	%	Pf Tot	%
Tempranillo	0,1	10,20	0,26	13,59	0,28	10,55	0,25	11,86	0,1	17,10
Graciano	0,1	8,95	0,08	12,36	0,07	24,07	0,07	10,10	0,05	21,26

En la Figura 4.41. se representan los porcentajes dializados de los polifenoles totales.



**Figura 4.41.** Porcentajes de polifenoles totales dializados en vinos Tempranillo y Graciano (2012).

Se observa que en los vinos testigo y en los que proceden de uvas tratadas con fenhexamida y metrafenona, los porcentajes dializados son ligeramente superiores en Tempranillo; para los tratamientos con boscalid+kresoxim-metil y mepanipirim, los mayores porcentajes se dan en Graciano. En ningún caso se supera un porcentaje de biodisponibilidad del 25%.

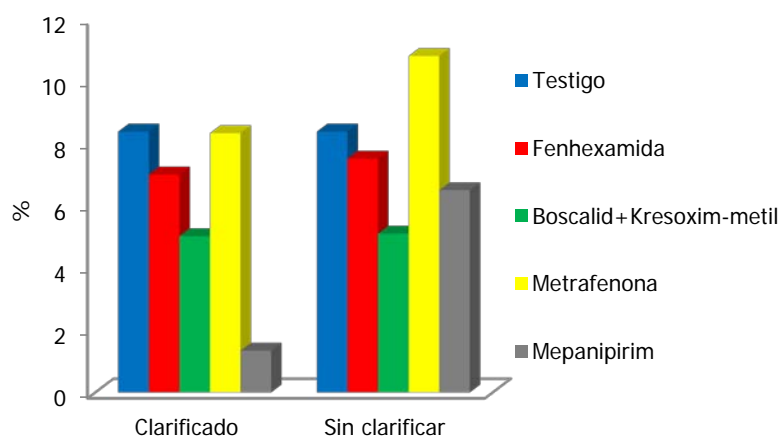
En la Tabla 4.36., se exponen los resultados para vino Tempranillo, clarificado y sin clarificar, elaborados el segundo año (2013).



**Tabla 4.36.** Biodisponibilidad de polifenoles totales (g/l) y porcentajes dializados en vino Tempranillo clarificado y sin clarificar (2013).

Tempranillo	Testigo		Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Metrafenona		Mepanipirim	
	Pf Tot	%	Pf Tot	%	Pf Tot	%	Pf Tot	%	Pf Tot	%
Clarificado	0,15	8,38	0,14	7,00	0,13	5,02	0,15	8,33	0,10	1,34
Sin clarificar	0,15	8,38	0,13	7,51	0,12	5,10	0,10	10,81	0,13	6,50

En la Figura 4.42., se representa gráficamente la comparación de los porcentajes dializados. Se observa un comportamiento similar para los vinos testigo y tratados con fenhexamida y boscalid+kresoxim-metil y una clara reducción del proceso en el vino clarificado que contiene metrafenona y mepanipirim.



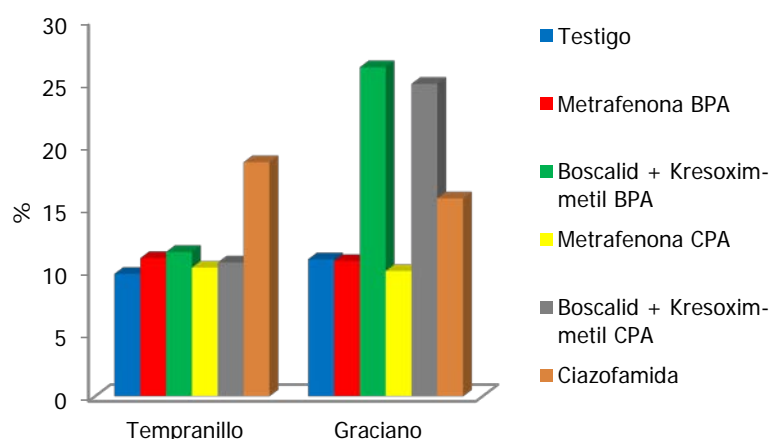
**Figura 4.42.** Porcentajes de polifenoles totales dializados en vinos Tempranillo clarificados y sin clarificar (2013).

Por último en la Tabla 4.37., se muestran los resultados de los vino Tempranillo y Graciano, en cuyo cultivo se aplicaron BPA y CPA (2014).

**Tabla 4.37.** Biodisponibilidad de polifenoles totales (g/l) en vinos Tempranillo y Graciano tratados bajo BPA y CPA (2014).

Vino	Testigo		BPA				CPA				Fortificación	
			Metrafenona		Boscalid + Kresoxim-metil		Metrafenona		Boscalid + Kresoxim-metil		Ciazofamida	
	Pf Tot	%	Pf Tot	%	Pf Tot	%	Pf Tot	%	Pf Tot	%	Pf Tot	%
Tempranillo	0,16	9,76	1,65	11,01	0,17	11,5	0,17	10,25	0,17	10,66	0,30	18,65
Graciano	0,26	10,92	0,26	10,78	0,65	26,22	0,25	9,98	0,64	24,89	0,37	15,77

El contenido en polifenoles totales, después del proceso de digestión *in vitro* del vino, descendió una media de un 10% respecto a su contenido inicial en vino Tempranillo tratado en campo y algo más de un 18% en el caso de ciazofamida añadida antes de la vinificación. Análogamente ocurre en el caso de Graciano, aunque el tratamiento con la mezcla boscalid y kresoxim-metil hace que aumente la biodisponibilidad de los polifenoles hasta un 25%. En la Figura 4.43., se muestran los porcentajes obtenidos.



**Figura 4.43.** Porcentajes de polifenoles totales dializados en vinos Tempranillo y Graciano tratados bajo BPA y CPA (2014).

Resultados similares se han encontrado en otros productos alimentarios en consonancia con los presentados en esta memoria. Así, Pérez-Vicente et al. (2002), obtuvieron resultados similares a los nuestros al determinar la biodisponibilidad *in vitro* de fenoles totales en zumo de granada. El zumo después de la digestión presentaba únicamente el 29% de fenoles respecto al zumo inicial. Igualmente, Bouayed et al. (2012), obtuvieron pérdidas de hasta el 75% en el contenido en fenoles de la manzana, las mismas que McDougall et al. (2007), en col lombarda y Tarko et al. (2009), en diferentes frutas, mientras que Fazzari et al. (2008), encontraron pérdidas de entre el 70 y el 74% en cerezas.

Otros autores obtuvieron resultados en los que observaban una menor biodisponibilidad de fenoles en diferentes alimentos (Dinnella et al., 2007; Stevenson et al., 2007; Tavares et al., 2012). Es el caso de McDougall et al. (2005a y b), quienes obtuvieron una biodisponibilidad del 10,3% de fenoles totales en frambuesas y del 7,2% en vino tinto. En sentido contrario, Tagliacruz et al. (2010), obtuvieron una

pérdida de fenoles únicamente del 37% después de someter a uva a una digestión simulada. En este último caso en el que la biodisponibilidad de fenoles es mayor hay que subrayar, por un lado, que sometieron a la uva a una etapa adicional en la que se simulaba la masticación y, por otro lado, que el método de medida empleado no fue el de Folin-Ciocalteu, sino un método enzimático.

De igual forma, Bouayed et al. (2011), encontraron porcentajes de recuperación de fenoles comprendidos entre el 44,6% y el 62,7% en diferentes variedades de manzanas. Mientras que Cilla et al. (2011), obtuvieron valores de recuperación de fenoles en diferentes zumos de frutas de entre el 74 y el 96%. Existen también trabajos en los que se ha mantenido el contenido en fenoles (Vallejo et al., 2004), e incluso algunos en los que se han encontrado mayores contenidos en fenoles totales después de la digestión *in vitro* (Noguer et al., 2008; Tarko et al., 2009; Wootton-Beard et al., 2011; Chandrasekara y Shahidi, 2012).

#### 4.3.2.3. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos.

Se determinaron las concentraciones de los diversos grupos de compuestos fenólicos en vinos Tempranillo y Graciano, tratados bajo condiciones de BPA y fortificados en bodega el primer año (2012), tras el proceso de biodisponibilidad *in vitro*. En la Tabla 4.38., se muestran las cantidades y porcentajes dializados tras el proceso, en vino Tempranillo y en la Figura 4.44., se representan gráficamente dichos porcentajes.

**Tabla 4.38.** Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentaje dializado en vino Tempranillo (2012).

Compuesto	Testigo		Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Metrafenona		Mepanipirim	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Antocianos	84,41	11,06	40,93	5,27	94,02	12,34	74,84	11,14	56,61	8,72
Hidroxicinámicos	29,66	19,74	29,53	19,87	30,98	21,10	39,54	17,25	33,19	23,66
Flavonoles	11,51	9,91	10,77	11,53	11,6	11,76	11,34	9,42	12,65	11,58
Estilbenos	28,04	49,49	23,74	46,26	27,05	50,75	26,67	60,52	25,24	55,39

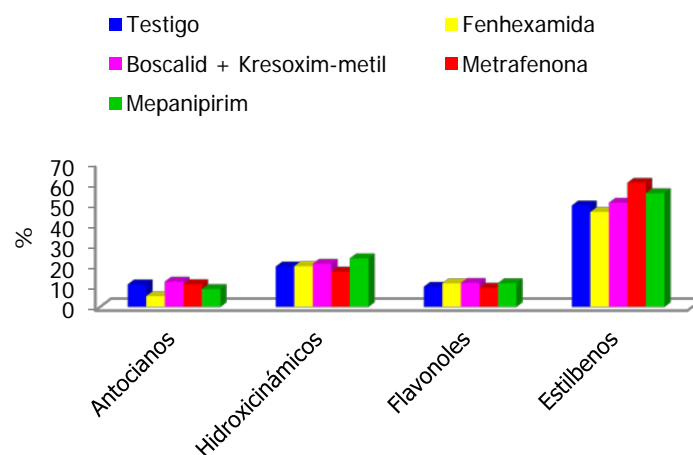


Figura 4.44. Porcentajes de compuestos fenólicos dializados en vino Tempranillo (2012).

En la Tabla 4.39. y en la Figura 4.45., se exponen los valores correspondientes para vino Graciano en el mismo año.

Tabla 4.39. Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentaje dializado en vino Graciano (2012).

Compuesto	Testigo		Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Metrafenona		Mepanipirim	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Antocianos	143,96	19,06	112,53	16,11	89,87	14,75	83,72	13,24	101,80	16,25
Hidroxicinámicos	37,92	34,80	22,84	24,70	14,22	21,87	18,59	16,77	29,05	25,97
Flavonoles	21,31	32,81	11,53	17,53	9,49	11,64	6,7	8,97	11,65	14,28
Estilbenos	27,08	53,66	22,34	50,11	20,04	44,64	21,8	44,44	25,05	48,15

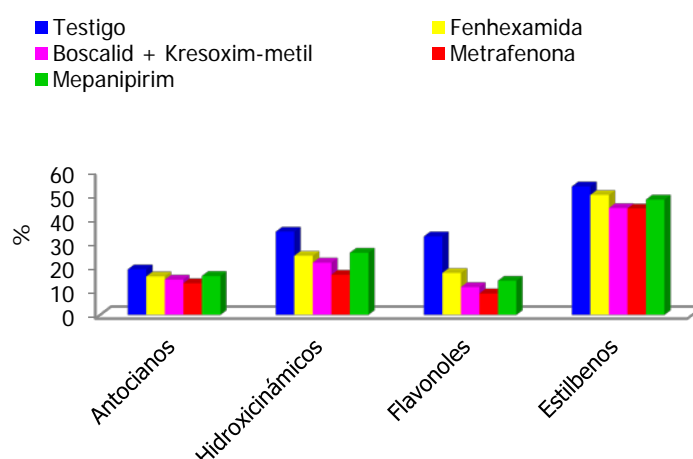


Figura 4.45. Porcentajes de compuestos fenólicos dializados en vino Graciano (2012).

Como se observa, no existen claras diferencias entre la dialización de los vino de ambas variedades de uva. Para los dos vinos, los estilbenos son los compuestos

fenólicos que presentan mayor porcentaje de dialización (cercano al 50%). Esta elevada dialización de los estilbenos, compuestos altamente beneficiosos para la salud, es indicativa de que la mitad de cantidad ingerida pasa al torrente sanguíneo, llegando a los objetivos diana.

En la Tabla 4.40. y 4.41., se exponen los porcentajes de dialización de los compuestos fenólicos en vino Tempranillo testigo y conteniendo residuos de fungicidas, clarificados y sin clarificar (2013).

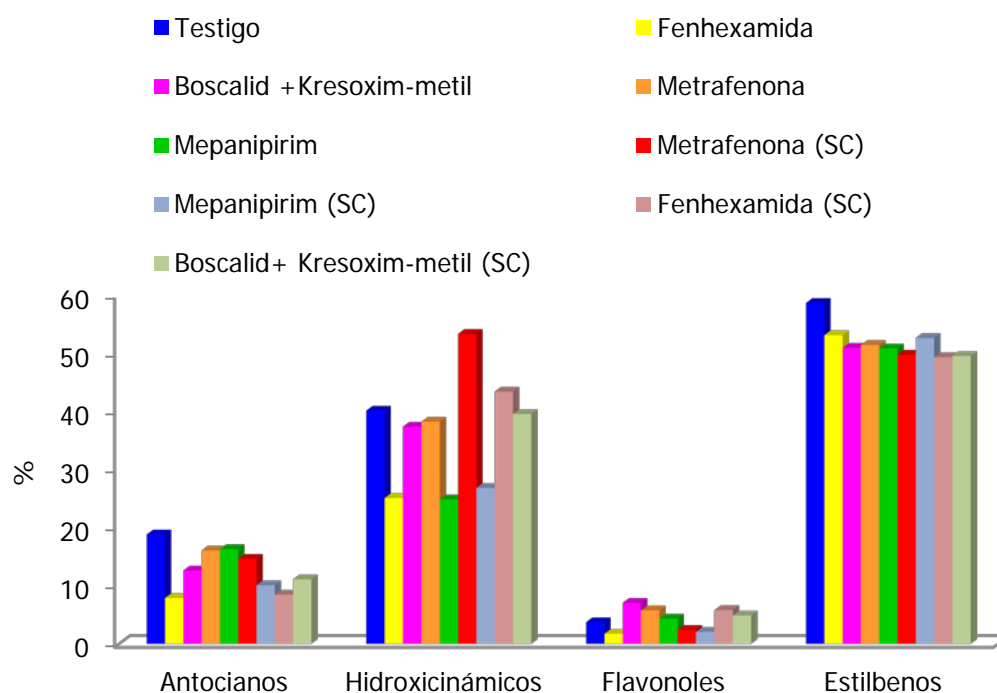
**Tabla 4.40.** Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentaje dializado en vinos Tempranillo, clarificados (2013).

Compuesto	Testigo		Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Metrafenona		Mepanipirim	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Antocianos	78,84	18,81	44,35	7,88	112,07	12,61	63,26	16,05	82,05	16,30
Hidroxicinámicos	50,84	40,13	39,65	25,08	52,79	37,35	52,03	38,22	41,92	24,85
Flavonoles	3,40	3,72	2,10	1,72	13,05	7,05	5,65	5,74	5,58	4,32
Estilbenos	18,69	58,67	17,84	53,12	36,53	50,94	16,12	51,41	18,47	50,82

**Tabla 4.41.** Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentaje dializado en vinos Tempranillo, sin clarificar (2013).

Compuesto	Testigo		Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Metrafenona		Mepanipirim	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Antocianos	78,84	18,81	47,85	8,46	93,23	11,08	54,08	14,62	49,45	10,07
Hidroxicinámicos	50,84	40,13	79,26	43,39	77,81	39,55	75,81	53,34	44,77	26,82
Flavonoles	3,40	3,72	5,36	5,79	8,82	4,86	2,24	2,38	2,88	2,04
Estilbenos	18,69	58,67	27,90	49,33	32,65	49,55	14,26	49,75	20,10	52,63

En la Figura 4.46., se muestran los porcentajes dializados en ambos vinos. Como ocurría en los vinos del primer año para la variedad tempranillo, los mayores porcentajes se producen en los estilbenos, manteniéndose el resto de grupos en rangos similares. La clarificación no parece afectar al porcentaje de dialización.



**Figura 4.46.** Porcentajes de compuestos fenólicos dializados en vinos Tempranillo, clarificados y sin clarificar (SC) (2013).

Finalmente, se estudió la biodisponibilidad de los grupos de compuestos fenólicos en los vinos de 2014, que fueron obtenidos de uvas tratadas bajo condiciones de BPA y CPA.

En las Tablas 4.42. y 4.43, se exponen las cantidades dializadas de las distintas familias de compuestos estudiadas en los dos vinos, así como los porcentajes resultantes.

**Tabla 4.42.** Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentajes dializados en vinos Tempranillo tratados bajo BPA y CPA (2014).

Vino Tempranillo	Testigo		BPA				CPA				Fortificación	
			Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Ciazofamida	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Antocianos	98,31	16,36	52,72	8,17	83,67	15,10	53,03	9,17	86,42	14,76	115,03	16,39
Hidroxicinámicos	25,64	23,72	28,78	19,61	31,72	22,12	18,20	21,75	28,21	21,81	30,94	21,08
Flavonoles	3,33	7,31	5,80	5,75	3,53	4,01	4,32	5,15	4,09	4,32	7,18	7,12
Estilbenos	21,14	54,72	24,78	52,81	17,65	51,12	19,81	50,33	21,19	52,01	29,63	53,15

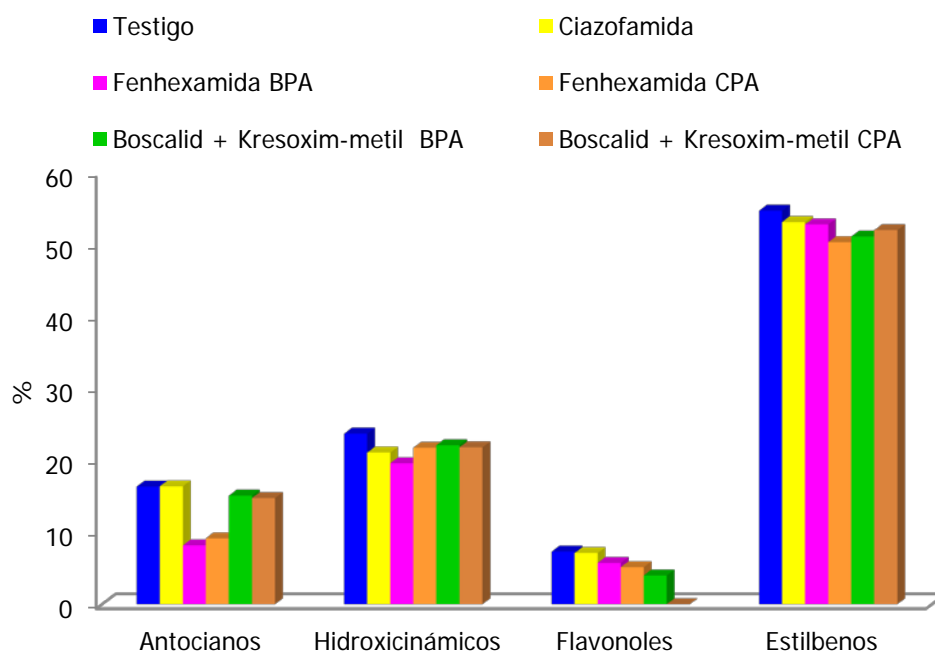
**Tabla 4.43.** Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentajes dializados en vinos Graciano tratados bajo BPA y CPA (2014).

Vino Tempranillo	Testigo		BPA				CPA				Fortificación	
			Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Fenhexamida		Boscalid + Kresoxim-metil		Ciazofamida	
	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%	mg/l	%
Antocianos	128,06	21,31	105,32	19,27	125,13	18,61	119,41	19,78	110,42	18,76	83,87	14,39
Hidroxicinámicos	38,65	35,75	25,94	27,16	21,10	25,17	31,92	27,15	18,78	26,77	20,09	21,35
Flavonoles	13,73	30,15	9,45	18,21	12,07	14,32	7,09	14,09	10,76	14,31	3,64	8,57
Estilbenos	21,51	55,67	19,14	51,32	22,55	49,41	19,73	50,16	20,39	51,37	16,17	52,14

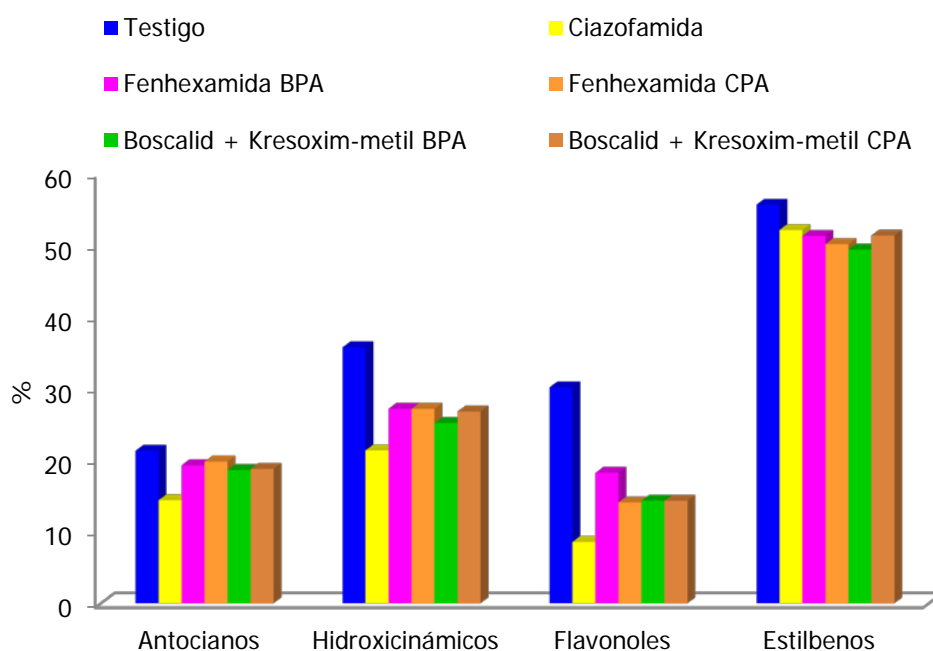
En los vinos Tempranillo y en general, la presencia de residuos de fungicidas minoriza ligeramente las cantidades dializadas, destacando las disminuciones provocadas para flavonoles en el caso de los tratamientos de campo. Ciazofamida no varía su porcentaje de biodisponibilidad.

En los vinos Graciano, se producen efectos análogos, destacando la disminución producida en el grupo de flavonoles para todos los casos.

En la Figura 4.47. y 4.48., se representan gráficamente las variaciones porcentuales de los diferentes grupos de compuestos fenólicos en los vinos Tempranillo y Graciano tras el proceso de biodisponibilidad *in vitro*.



**Figura 4.47.** Porcentajes de compuestos fenólicos dializados en los vinos Tempranillo tratados en condiciones de BPA y CPA (2014).



**Figura 4.48.** Porcentajes de compuestos fenólicos dializados en los vinos Graciano tratados bajo condiciones de BPA y CPA (2014).

Diferentes estudios han presentado resultados similares en otras matrices alimentarias. Así, en un estudio de comparación de la biodisponibilidad *in vitro* de los compuestos fenólicos de diferentes zumos, encontraron pérdidas entre el 64,5 y el 70,1% en el contenido en flavan-3-oles (Laurent et al., 2007; Cilla et al., 2009).

Bouayed et al. (2011), tras someter diferentes variedades de manzanas a una digestión *in vitro*, obtuvieron recuperaciones del 44% en el contenido en flavonoides, justificando las pérdidas por la inestabilidad que presentan las antocianinas en el medio alcalino del intestino.

Tagliacruzchi et al. (2010), observaron una biodisponibilidad en los flavonoides de la uva del 56,1%. Estudiando la biodisponibilidad *in vitro* de diferentes catequinas, se obtuvieron pérdidas entre el 71-91% en epigalocatequina galato, entre el 72-100% en epigalocatequina y entre el 60-61% en epicatequina galato. Sin embargo, catequina y epicatequina obtuvieron pérdidas de tan sólo un 8% (Neilson et al., 2007).

La baja biodisponibilidad *in vitro* que presentan los flavonoides, puede deberse a su naturaleza polimérica y su alto peso molecular, que hacen difícil su absorción a través de la barrera intestinal (Spencer et al., 2001; Manach et al., 2004 y 2005; Serrano et al., 2009; Fernandes et al., 2012).



Por otra parte y en sentido contrario, en algunos estudios sobre la fracción biodisponible del cacao, no solo no se encontraron pérdidas, sino que el contenido en catequina y epicatequina era mayor; planteando la hipótesis del papel protector que la grasa podía tener al formar estructuras micelares durante la digestión enzimática (Ortega et al., 2009).

Resultados similares se obtuvieron en algunos estudios en los que el grado de polimerización de las procianidinas provocaban que no fueran absorbidas por ratones alimentados con extractos de uva (Baba et al., 2002; Donovan et al., 2002; Nakamura y Tonogai, 2003 y Tsang et al., 2005).

Se ha observado una fuerte degradación de las catequinas del té, en medios ácidos y alcalinos, lo que permitiría explicar la pobre absorción encontrada en nuestro estudio (Chen et al., 2011).

En otros estudios coincidentes con nuestros resultados, se observó cómo tras una digestión simulada de manzanas, el medio ácido del estómago degradaba la mayoría de las catequinas, mientras que en presencia de los jugos duodenales se isomerizaban (Kahle et al., 2007 y 2011).



**5. RESUMEN Y CONCLUSIONES.**

A la vista de los resultados expuestos en la presente Memoria podemos resumir el trabajo realizado en las siguientes consideraciones y conclusiones.

Se ha estudiado la influencia de los residuos de seis fungicidas (metrafenona, mezcla boscalid+kresoxim-metil, ciafozamida, fenhexamida y mepanipirim) aplicados en campo según BPA y CPA y añadidos en bodega antes de la vinificación, en la actividad antioxidante, compuestos fenólicos y su biodisponibilidad en vinos Tempranillo y Graciano (DO Rioja), durante las vendimias 2012, 2013 y 2014.

En este sentido se ha validado la metodología analítica necesaria para la identificación y cuantificación de los fungicidas utilizados para su determinación en uva y vino. Para ello se empleó el método de extracción multiresiduos QuEChERS con acetonitrilo y análisis por CL-MS/MS (QqQ).

También se ha determinado en los vinos, la actividad antioxidante, polifenoles totales y compuestos fenólicos (antocianos, derivados hidroxicinámicos, flavonoles y estilbenos), comprobando la influencia de los residuos de fungicidas.

Por último, se estudió la biodisponibilidad *in vitro*, de los distintos fungicidas encontrados en los vinos, comprobando el efecto matriz (uva y vino). Así mismo, se realizó un estudio similar para comprobar la biodisponibilidad de la fracción fenólica y su relación con la presencia de los fungicidas.

En base a estas consideraciones y a los resultados obtenidos, podemos exponer las siguientes conclusiones:

1. La determinación de los residuos de fungicidas mediante extracción con acetonitrilo (QuEChERS) y análisis por cromatografía líquida con detector

espectrométrico de masas-masas (triple cuadrupolo) utilizando una columna Poroshell 120 y gradiente de flujo, es suficientemente precisa y exacta. Alcanzando un límite de cuantificación de 0,01 ppm, una linealidad de respuesta ( $R^2 > 0,998$ ) y exactitud (70-110%) y precisión con desviaciones estándar menores del 20%. Estos valores cumplen las especificaciones establecidas en la guía SANCO y norma UNE/ISO 17025.

2. En los vinos procedentes de uvas tratadas en campo bajo Buenas Prácticas Agrícolas en ningún caso se superan los LMR establecidos en uva. Sólo en los vinos Tempranillo procedentes de tratamientos CPA, kresoxim-metil y metrafenona superan ligeramente el LMR en uva (1,48 y 0,84 frente a 1 y 0,5 ppm, respectivamente).
3. En los vinos fortificados en bodega antes de la vinificación (fenhexamida, mepanipirim y ciazofamida) en ningún caso se supera los LMR en uva.
4. No se han observado diferencias significativas entre los contenidos de residuos de fungicidas en el vino Tempranillo, antes y después de la clarificación, ni en el procedente de uva tratada en campo ni fortificada en bodega.
5. La actividad antioxidante (DPPH) determinada en los vinos testigo variedad Tempranillo es superior a la Graciano. La presencia de residuos de fungicidas en los vinos Tempranillo no influyen significativamente en su actividad antioxidante en comparación con los vinos sin tratar. En el caso del vino Graciano, boscalid+kresoxim-metil y metrafenona, presentan diferencias significativas en su capacidad antioxidante.
6. En general no se aprecian diferencias significativas en la actividad antioxidante en el vino Tempranillo sometido al proceso de clarificación.
7. En vino Tempranillo la presencia de mepanipirim y fenhexamida incrementa su actividad antioxidante frente al testigo, mientras que el resto de fungicidas la disminuye. En vino Graciano, metrafenona la aumenta, mepanipirim y fenhexamida la reducen y ciazofamida y boscalid+kresoxim-metil prácticamente no influyen.

8. Los polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) determinados en los vinos testigo Graciano son ligeramente superiores a Tempranillo. La presencia de residuos de boscalid+kresoxim-metil, fenhexamida y ciazofamida disminuyen el contenido de polifenoles totales en vino Tempranillo. Por el contrario, en vino Graciano, metrafenona incrementa ligeramente su contenido.
9. El proceso de clarificación en vino Tempranillo tiene efectos significativos en los valores de polifenoles totales, encontrando que la presencia de los fungicidas fenhexamida, boscalid+kresoxim-metil y metrafenona incrementaban sus contenidos frente al vino testigo.
10. No se ha establecido una correlación lineal entre actividad antioxidante y polifenoles totales, posiblemente debido a la disparidad en la calidad y características climatológicas de las tres vendimias.
11. Se han determinado las fracciones fenólicas. Antocianos, derivados hidroxicinámicos, flavonoles y estilbenos por cromatografía líquida y detector espectrofométrico DAD. La fracción fenólica más destacada en Tempranillo y Graciano es la de antocianos (70,45 y 77,50 % respectivamente) seguidos de los derivados hidroxicinámicos (18,31 y 13,64 %); flavonoles (14,62 y 9,95 %). En el caso de los estilbenos en vinos Graciano el porcentaje es ligeramente superior que en Tempranillo (6,34 frente al 4,98%).
12. Los antocianos presentan un valor medio de 596,26 mg/l en vino testigo de tempranillo frente a 678,13 mg/l en Graciano. Obteniendo el valor más alto en los vinos Tempranillo con ciazofamida (701,93 mg/l) y el más bajo en vino Graciano con ciazofamida (532,87 mg/l).
13. La concentración de compuestos hidroxicinámicos fluctúan entre 73,00 mg/l en vino Graciano con boscalid+kresoxim-metil y 154,49 mg/l para vino Tempranillo con mepanipirim.
14. Los flavonoles se determinaron en menores concentraciones (entre 45,21 y 119,18 mg/l para vino Graciano con ciazofamida y Tempranillo con mepanipirim,

respectivamente); los estilbenos oscilan entre 31,01 y 52,03 mg/l, encontrados para vinos Graciano con ciazofamida y mepanipirim, respectivamente.

15. En los vinos Tempranillo el porcentaje de antocianos se incrementa con fenhexamida, ciazofamida y boscalid+kresoxim-metil, mientras que disminuye con metrafenona y mepanipirim. Los derivados hidroxicinámicos se incrementan con fenhexamida, metrafenona y mepanipirim, se reducen con boscalid+kresoxim-metil y ciazofamida. Los flavonoles se incrementan en la presencia de metrafenona y mepanipirim y se reducen con el resto de fungicidas. Por último los estilbenos se incrementan con fenhexamida y boscalid+kresoxim-metil y se reducen con el resto.
16. En los vinos Graciano, el porcentaje de antocianos se incrementa con fenhexamida y mepanipirim y disminuye con boscalid+kresoxim-metil, metrafenona y ciazofamida. Los derivados hidroxicinámicos se incrementan con metrafenona, mepanipirim y ciazofamida, se reducen con los otros fungicidas. Flavonoles aumentan con la presencia de los seis fungicidas. Los estilbenos se incrementan con boscalid+kresoxim-metil, metrafenona y mepanipirim y se reducen con el resto.
17. En la mayoría de los vinos Tempranillo clarificados y sin clarificar existen diferencias significativas en los niveles de compuestos fenólicos para todos los fungicidas; únicamente la presencia de metrafenona y fenhexamida no afecta al contenido en flavonoles. Metrafenona en vinos clarificados no afecta a los niveles de antocianos, derivados hidroxicinámicos y flavonoles. Cuando no se clarifica el vino, no hay diferencias significativas en antocianos y flavonoles en el vino tratado con metrafenona y tampoco en flavonoles en el tratado con fenhexamida.
18. Los tratamientos en campo de boscalid+kresoxim-metil y metrafenona, en condiciones de BPA y CPA en Tempranillo y Graciano en 2014, puso de manifiesto diferencias significativas con el vino testigo en los contenidos de antocianos, derivados hidroxicinámicos, estilbenos y flavonoles. En vino Tempranillo no hay diferencias significativas en el contenido de derivados hidroxicinámicos y flavonoles con la presencia de boscalid+kresoxim-metil BPA, ni en el de estilbenos en los vinos con metrafenona CPA y boscalid+kresoxim-metil CPA. En

el caso de vinos Graciano, no hay incidencia en el contenido de antocianos por la presencia de metrafenona CPA y boscalid+kresoxim-metil CPA. Flavonoles no se ven afectados por ciazofamida y por último, los estilbenos tampoco por metrafenona BPA y CPA y boscalid+kresoxim-metil CPA.

19. Al estudiar la biodisponibilidad in vitro de los seis fungicidas se comprueba un claro efecto de la matriz sobre el proceso. Así, en agua no se produce dialización para ningún fungicida a concentraciones inferiores a 2 ppm. Ciazofamida no se dializa a las concentraciones ensayadas; boscalid, fenhexamida y mepanipirim presentan diálisis a 5 y 10 ppm y kresoxim-metil y metrafenona, sólo se dializan a la concentración de 10 ppm. En uva, kresoxim-metil no se dializa a las concentraciones estudiadas; metrafenona lo hace sólo a 10 ppm y boscalid, ciazofamida y mepanipirim a 5 y 10 ppm; fenhexamida dializa a partir de 2 ppm. En vino, todos los fungicidas son dializados en mayor o menor grado a 10 ppm y sólo kresoxim-metil no lo hace a 5 ppm; ciazofamida y metrafenona no dializan a 2 ppm y boscalid, fenhexamida y mepanipirim lo hacen desde 2 ppm.
20. Los fungicidas que presentan mayor dialización son y por este orden: fenhexamida, boscalid y mepanipirim, en vino y en agua. Boscalid, fenhexamida, mepanipirim y metrafenona presentan valores parecidos en todas las matrices. Ciazofamida, alcanza muy bajas concentraciones de dialización en uva y vino, y sólo a concentraciones superiores a 5 ppm. Kresoxim-metil sólo presenta dialización en medio líquido (agua y vino).
21. En general, debido posiblemente a que en la uva solamente existe fase acuosa y azúcares, el porcentaje de dialización en todos los casos es menor que en vino. En vino, existe fase acuosa-etanólica, y se observa que a partir de 5 ppm disminuye el porcentaje de dialización. En agua, siempre aumenta la dialización con la concentración.
22. El vino elaborado con uva Graciano presenta un efecto matriz positivo, respecto al realizado con Tempranillo, aumentando el porcentaje dializado. Los porcentajes de diálisis oscilan entre un mínimo de 6,1% para kresoxim-metil en vino de Tempranillo, hasta un máximo de 36,6% para boscalid en el de Graciano. Los

plaguicidas que presentan mayor biodisponibilidad son mepanipirim en Tempranillo y boscalid en Graciano.

23. Se comprueba que la clarificación tiene un ligero efecto positivo en la biodisponibilidad de los fungicidas. Así, en los vinos Tempranillo fortificados en bodega con fenhexamida y mepanipirim se observan diferencias en la capacidad de diálisis (19,72% no clarificado frente al 25,37% clarificado para fenhexamida y 25,73% sin clarificar frente al 31,07% clarificado para mepanipirim).
24. En los vinos procedentes de uvas tratadas bajo CPA, los porcentajes de dialización de boscalid y kresoxim-metil se sitúan entre el 21-31%, mientras que metrafenona no presenta dialización. En el caso de la ciazofamida añadida al mosto no se produce dialización de la materia activa.
25. La presencia de residuos de fenhexamida, mezcla de boscalid y kresoxim-metil y metrafenona, provocan un ligero aumento en la biodisponibilidad de la actividad antioxidante de los vinos Tempranillo; cosa que no ocurre en el vino Graciano, donde los valores prácticamente no varían, aunque en los correspondientes vinos testigo los valores de Graciano son ligeramente superiores.
26. El proceso de clarificación no afecta a la biodisponibilidad de la actividad antioxidante y para todos los casos sus valores no presentan diferencias significativas.
27. Al analizar la actividad antioxidante de los vinos procedentes de aplicaciones en campo bajo BPA y CPA, así como de los fortificados en bodega, se comprueba que las muestras con metrafenona y con la mezcla boscalid+kresoxim-metil, aumentan ligeramente el porcentaje de dialización de Tempranillo frente al testigo. La presencia de ciazofamida en ambos vinos provoca una disminución de su biodisponibilidad.
28. Al estudiar la biodisponibilidad de los polifenoles totales, se observa que en los vinos testigo y en los que proceden de uvas tratadas con fenhexamida y metrafenona, los porcentajes dializados son ligeramente superiores en Tempranillo; para los tratamientos con boscalid+kresoxim-metil y mepanipirim,



los mayores porcentajes se dan en Graciano. En ningún caso se supera un porcentaje de biodisponibilidad del 25%.

29. Los resultados para vino Tempranillo, clarificado y sin clarificar, elaborados el segundo año, presentan un comportamiento similar para los vinos testigo y tratados con fenhexamida y boscalid+kresoxim-metil y una clara reducción del proceso en el vino clarificado que contiene metrafenona y mepanipirim.
30. El contenido en polifenoles totales, después del proceso de digestión *in vitro* del vino, descendió una media de un 10% respecto a su contenido inicial en vino Tempranillo tratado en campo y algo más de un 18% en el caso de ciazofamida añadida antes de la vinificación. Análogamente ocurre en el caso de Graciano, excepto en los tratados con la mezcla boscalid y kresoxim-metil en los que aumenta la biodisponibilidad de los polifenoles hasta un 25%.
31. Finalmente, podemos afirmar que la presencia de residuos de plaguicidas afecta a la biodisponibilidad tanto de la fracción fenólica como de la actividad antioxidante de los vinos estudiados, no encontrando claras diferencias en la dialización de la fracción fenólica de los vinos de ambas variedades de uva. Los estilbenos son los compuestos fenólicos que presentan mayor porcentaje de dialización (cerca del 50%), manteniéndose el resto en rangos similares. La clarificación no parece afectar al porcentaje de dialización.

En los vinos Tempranillo y en general, la presencia de residuos de fungicidas disminuye ligeramente las cantidades dializadas, destacando las disminuciones provocadas para flavonoles en el caso de los tratamientos de campo; la presencia de ciazofamida no varía prácticamente dichos porcentajes. En los vinos Graciano, se producen efectos análogos, destacando la disminución producida en el grupo de flavonoles para todos los casos.

32. Por último, se ha constatado que para todos los plaguicidas estudiados la biodisponibilidad *in vitro*, en general, no supera el 37 % dializado respecto a la concentración inicialmente presente en el vino, lo que indica un claro margen de seguridad desde el punto de vista toxicológico.



## **6. BIBLIOGRAFÍA.**

**ABRAMOVIC, H., KOSMERL, T., POKLAR, U.N., CIGIC, B.** 2015. *Contribution of SO<sub>2</sub> to antioxidant potential of white wine.* Food Chemistry, 174: 147-153.

**AGUIRREZABAL, F., CIBRIÁIN, J.F., SAGUÉS, A., SUBERVIOLA, R.** 2002. *Evaluación de clones de seis variedades de vid en Navarra. Gobierno de Navarra.* Departamento de Desarrollo Rural, Industria, Empleo y Medio Ambiente. Sección de Viticultura. Navarra, España.

**ALAIN, G., BALDI, I., MARCAL, J.** 2012. *The use of pesticides in French viticulture: a badly controlled technology transfer.* Work, 1:19-25.

**ALBERTONI, G., SCHOR, N.** 2015. *Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease-mini-review.* Journal Brasileiro de Nefrologia, 37(1): 106-114.

**ANDRÉ, C.M., EVERS, D., ZIEBEL, J., GUIGNARD, C., HAUSMAN, J.F., BONIERBALE, M., FELDE, T.Z., BURGOS, G.** 2015. *In vitro bioaccessibility and bioavailability of iron from potatoes with varying vitamin C, carotenoid and phenolic concentrations.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, doi: 10.1021/acs.jafc.5b02904.

**ANGIONI, A., DEDOLA, F., GARAU, V.L., SCHIRRA, M., CABONI, P.** 2011. *Fate of iprovalicarb, indoxacarb, and boscalid residues in grapes and wine by GC-ITMS analysis.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(12):6806-6812.

**ANGIONI, A., GARAU, A., CABONI, P., RUSSO, M.T., FARRIS, G.A, ZARA, S., CABRAS, P.** 2005. *Gas chromatographic ion trap mass spectrometry determination of zoxamide residues in grape, grape processing, and in the fermentation process.* Journal of Chromatography A, 1097:165-170.

**ANTALICK, G., PERELLO, M.C., REVEL, G.** 2012. *Characterization of fruity aroma modifications in red wines during malolactic fermentation.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(50):12371-12383.

**APOLINAR-VALIENTE, R., ROMERO-CASCALES, I., WILLIAMS, P., GÓMEZ-PLAZA, E., LÓPEZ-ROCA, J.M., ROS-GARCÍA, J.M., DOCO, T.** 2015. *Oligosaccharides of Cabernet Sauvignon, Syrah and Monastrell red wines.* Food Chemistry, 179:311-317.

**ARIAS-ESTÉVEZ, M., LÓPEZ-PERIAGO, E., MARTÍNEZ-CARBALLO, E., SIMAL-GÁNDARA, J., MEJUTO, J.C., GARCÍA-RÍO, L.** 2008. *The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources.* Agriculture, Ecosystems and Environment, 123:247-260.

**ARTURSSON, P.** 1990. *Epithelial transport of drugs in cell culture.I. A model for studying the passive diffusion of drugs over intestinal absorptive Caco-2 cells.* European Journal of Pharmaceutical Sciences, 79:476-482.

**ARTURSSON, P., BORCHARDT, R.** 1997. *Intestinal drug absorption and metabolism in cell cultures: Caco-2 and beyond.* Journal of Pharmacy Research, 14:1655-1657.

**ARTURSSON, P., KARLSSON, J.** 1991. *Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 175:880-885.

**AUDUS, K.L., BARTEL, R.L., HIDALGO, I.J., BORCHARDT, R.T.** 1990. *The use of cultured epithelial and endothelial cells for drug transport and metabolism studies.* Journal of Pharmacy Research, 7:435-451.

**BABA, S., OSAKABE, N., NATSUME, M., TERAQ, J.** 2002. *Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4 $\beta$ -8)-epicatechin] in rats.* Free Radical Biology and Medicine, 33(1):142-148.

**BADII, M.H., VARELA, S.** 2008. *Insecticidas Organofosforados: Efectos sobre la Salud y el Ambiente.* Cultura Científica y Tecnológica, 28:5-18.

**BASCONES, D., KHAYYAT, N., ARROYO, V.** 1981. *Evolución de la microflora de levaduras de los mostos de la uva de Jumilla.* Microbiología Española, 34:61-68.

**BASTIANETTO, S., MENARD, C., QUIRON, R.** 2015. *Neuroprotective action of resveratrol .* Biochimica et Biophysica Acta-Molecul Basis of Disease, 1852(6):1195-1201.

**BAUTISTA-ORTIN, A.B., PÉREZ-PRIETO, L.J., ROMERO-CASCALES, I., FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, J.I., LÓPEZ-ROCA, J.M., GÓMEZ-PLAZA, E.** 2003. *Influencia del estado de maduración de la uva de la variedad Monastrell en el color de los vino.* II Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Orihuela. Alicante (España)

**BENITO, A., CALDERÓN, F., PALOMERO, F., BENITO, S.** 2015. *Combine Use of Selected Schizosaccharomyces pombe and Lachancea thermotolerans Yeast Strains as an Alternative to the Traditional Malolactic Fermentation in Red Wine Production.* Molecules, 20(6):9510-9523.

**BESERRA –ALMEIDA, M.M., MACHADO- DESOUSA, P.H., CAMPOS-ARRIAGA, A.M., DO-PRADO, G.M., DE CARVALHO-MAGALHAES, C.E., MAIA, G.A., LEDA-GOMES, T.** 2011. *Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil.* Food Research International, 44(7):2155-2159.

**BLOUIN, J.** 2003. *Enología práctica: conocimiento y elaboración del vino.* Ed. MundiPrensa, Madrid, España.

**BOE.** 1983. Boletín Oficial del Estado. Nº 20. Real Decreto 3349/1983. Por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, comercialización y utilización de plaguicidas.pp 1850-1856

**BOE.** 1994a. Boletín Oficial del Estado. Nº 58. Real Decreto 280/1994. Por el que se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas y su control en determinados productos vegetales.pp 7723-7726

**BOE.** 1994b. Boletín Oficial del Estado. Nº 276. Real Decreto 2163/1994. Por el que se implanta el sistema armonizado comunitario de autorización para comercializar y utilizar productos fitosanitarios.pp 35452-35463

**BOE.** 2012. Boletín Oficial del Estado. Nº 223, Real Decreto 1311/2012. Por el que se establece el marco de actuación para conseguir un uso sostenible de los productos fitosanitarios.pp 65127-65171

**BOLLINGER, D.W., TSUNODA, A., LEDOUX, D., ELLERSIECK, M.R., VEUM, T.L.** 2005. *A comparison of the test tube and the dialysis tubing in vitro methods for estimating the bioavailability of phosphorus in feed ingredients for swine.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:3287-3294.

**BONDET, V., BRAND-WILLIAM, W., BERSET, C .** 1997. *Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity using the DPPH Free Radical Method.* Lebensmittel Wissenschaft und Technologie, 30:609-615.

**BOUAYED, J., DEUSSER, H., HOFFMANN, L., BOHN, T.** 2012. *Bioaccessible and dialyzable polyphenols in selected apple varieties following in vitro digestion vs. their native patterns.* Food Chemistry, 131(4):1466-1472.

**BOUAYED, J., HOFFMANN, L., BOHN, T.** 2011. *Total phenolics, flavonoids, anthocyanins and antioxidant activity following simulated gastro-intestinal digestion and dialysis of apple varieties: Bioaccessibility and potential uptake.* Food Chemistry, 128(1):14-21.

**BOULTON, R.B., SINGLETON, V.L., BISSON, L.F., KUNKEE, R.E.** 2002. *Teoría y práctica de la elaboración del vino*. Ed. Acribia S.A. Zaragoza, España.

**BOURZEIX, M., WEYLAND, D., HEREDIA, N.** 1986. *Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vigne*. Bulletin d'OIV, 669670:1171-1253.

**BOYDENS, C., PAUWELS, B., DECALUWÉ, K., BROUCKAERT, P., VAN DE VOORDE, J.** 2015. *Relaxant and antioxidant capacity of the red wine polyphenols, resveratrol and quercetin, on isolated mice corpora cavernosa*. Journal of Sexual Medicine, 12(2):303-312.

**BRANAS, J.** 1974. *Journal of Viticulture*. Imp. Déhan, Montpellier.

**CABANIS, J.C.** 2000. *Ácidos orgánicos, sustancias minerales, vitaminas y lípidos*. Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. Ed. Mundi-Prensa. Madrid, España, 49-52.

**CABANIS, J.C., COOPER, J.F.** 1991. *Résidus de produits phytosanitaires dans les vins*. Revue Française d'Oenologie, 130:43-50.

**CABONI, P., CABRAS, P.** 2010. *Pesticides' influence on wine fermentation*. Advances in Food and Nutrition Research, 59:43-62.

**CABRAS, P. GARAU, V.L. MELIS, M., PIRISI, F.M. CUBEDDU, M. y CABITZA, F.** 1994a. *Residui di dimetoato e clorpirifos nell'uva en el vino*. Atti Giornate Fitopatologiche, 1:27-32.

**CABRAS, P. y ANGIIONI, A.** 2000. *Pesticide residues in grapes, wine and their processing products*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48(4):967-973.

**CABRAS, P., ANGIIONI, A., GARAU, V.L., MINELLI, E.V., CABITZA, F. y PALA, M.** 1998a. *Pesticide residues in raisin processing*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(6):2309-2312.

**CABRAS, P., ANGIONI, A., GARAU, V.L., PIRISI, F.M., CABITZA, F., PALA, M., FARRIS, G.A.** 2000. *Fate of quinoxifen in grapes, wine and their processing products.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48(12):6128-6131.

**CABRAS, P., ANGIONI, A., GARAU, V.L., PIRISI, F.M., CABITZA, F., PALA, M., FARRIS, G.A.** 2001. *Fenhexamid residues in grapes and wine.* Food Additives and Contaminants, 18(7):625-629.

**CABRAS, P., ANGIONI, A., GARAU, V.L.** 1997. *Fate of some new fungicides (cypronidil, fludioxonil, pyrimethanil and tebuconazole) from vine to wine.* Journal of Agricultural and food chemistry, 45:2708-2710.

**CABRAS, P., ANGIONINI, A., GARAU, V.L., PIRISI, F.M. ESPINOZA, J., MENDOZA, A., CABITZA, F., PALA, M. y BRANDOLINI, V.** 1998b. *Fate of azoxystrobin, fluazinam, kresoxim-methyl, mepanipirim and tetraconazole from vine to wine.* Journal Agricultural Food Chemistry, 46:3249-3251.

**CABRAS, P., GARAU, V.L., ANGIONI, A.** 1999. *Pesticides in Fermentative Processes of Wine.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47:3854-3857.

**CABRAS, P., MELONI, M., MELIS, M., FARRIS, G.A., BUDRONI, M. y SATTA, T.** 1994b. *Interactions between lactic bacteria and fungicides during lactic fermentation.* Journal of Wine Research, 5(1):53-59.

**CABRAS, P., MELONI, M., PIRISI, F.M.** 1987. *Pesticide fate from vine to wine.* Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 99:83-117.

**CACHO, J., FERNÁNDEZ, P., FERREIRA, V., CASTELLS, J.E.** 1992. *Evolution of five anthocyanidin-3 glucosides in the skin of the Tempranillo, Moristel and Garnacha grape varieties and influence of climatological variables.* American Journal of Enology and Viticulture, 43:244-248.



**CALABRISO, N., SCODITTI, E., MASSARO, M., PELLEGRINO, M., STORELLI, C., INGROSSO, I., GIOVINAZZO, G., CARLUCCIO, M.A.** 2015. *Multiple anti-inflammatory and anti-atherosclerotic properties of red wine polyphenolic extracts: differential role of hydroxycinnamic acids, flavonols and stilbenes on endothelial inflammatory gene expression*. European Journal of Nutrition, 1-13.

**CALHELHA, R.C., ANDRADE, J.V., FERREIRA, I.C., ESTEVINHO, L.M.** 2006. *Toxicity effects of fungicide residues on the wine-producing process*. Food Microbiology, 23(4):393-398.

**CALVO-GARRIDO, C., USALL, J., VIÑAS, I., ELMER, P.A., CASES, E., TEIXIDÓ, N.** 2014. *Potential secondary inoculum sources of Botrytis cinerea and their influence on bunch rot development in dry Mediterranean climate vineyards*. Pest Management Science, 70(6):922-930.

**CAMENISCH, G., ALSENZ, J., WATERBEEMD, H., FOLKERS, G.** 1998a. *Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayer using the drugs' lipophilicity and molecular weight*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 6:313-319.

**CAMENISCH, G., FOLKERS, G., WATERBEEMD, H.** 1998b. *Shapes of membrane permeability-lipophilicity curves; extension of theoretical models with an aqueous pore pathway*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 6:321-329.

**CANTOS, E., ESPIN, J., FERNANDEZ, M.J., OLIVA, J., TOMAS-BARBERAN, F.A.** 2003. *Postharvest uv-c-irradiated grapes as a potential source of producing stilbene-enriched red wines*. Journal Agricultural and Food Chemistry, 51: 1208-1214.

**CARERY, M., CORRADINI, C. ELVIRI, L., NICOLETTI, I., ZAGNONI, I.** 2003. *Direct HPLC analysis of quercetin and trans-resveratrol in red wine, grape, and winemaking by products*. Journal Agricultural and Food Chemistry, 51: 5226-5231.

**CARISSE, O.** 2010. *Fungicides*. Ed. InTech, 347-468, Croacia.

**CARRETÉ, R., REGUANT, C., ROZÉS, N., CONSTANTÍ, M., BORDONS, A.** 2006. *Analysis of Oenococcus oeni in simulated microvinifications with some stress compounds.* American Journal of Enology and Viticulture, 57(3):356-362.

**CARRETÉ, R., VIDAL, M.T., BORDONS, A., CONSTANTÍ, M.** 2002. *Inhibitory effect of sulfur dioxide and other stress compounds in wine on the ATPase activity of Oenococcus oeni.* FEMS Microbiology Letters, 211(2):155-159.

**CASASSA, L.F., HARBERTSON, J.F.** 2014. *Extraction, evolution, and sensory impact of phenolic compounds during red wine maceration.* Annual Review of Food Science and Technology, 5:83-109.

**CASIDA, J.E., QUISTAD, G.B.** 1998. *Golden age of insecticide research: past, present, or future?* Annual Review Entomology, 43:1-16.

**CASTAÑEDA-OVANDO, A., PACHECO-HERNÁNDEZ, M.L., PAÉZ-HERNÁNDEZ, M.E., RODRÍGUEZ, J.A., GALÁN-VIDAL, C.A.** 2009. *Chemical studies of anthocyanins: A review.* Food Chemistry, 113:859-871.

**CASTILLO-MUÑOZ, N., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M., GÓMEZ-ALONSO, S., GARCÍA-ROMERO, E., HEMOSÍN-GUTIÉRREZ, I.** 2009. *Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (Vitis vinifera L.) grapes and red wines.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(17):7883-7891.

**CASTILLO-MUÑOZ, N., GÓMEZ-ALONSO, S., GARCÍA-ROMERO, E., HERMOSIN-GUTIÉRREZ, I.** 2007. *Flavonol profiles of Vitis vinifera red grapes and their single-cultivar wines.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55:992-1002.

**CEDRÓN, M.T.** 2004. *Estudio analítico de compuestos volátiles en vino. Caracterización quimiométrica de distintas denominaciones de origen.* Trabajo fin de grado, Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e informáticos, Universidad de La Rioja.

**CEE.** 1991. Directiva 91/414/CEE del Consejo, de 15 de julio de 1991, relativa a la comercialización de productos fitosanitarios.

**CEE.** 1986a. Directiva 86/362/CEE del Consejo, de 24 de julio de 1986, relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas en y sobre los cereales

**CEE.** 1986b. Directiva 86/363/CEE del Consejo, de 24 de julio de 1986, relativa a la fijación de contenidos máximos para los residuos de plaguicidas sobre y en los productos alimenticios de origen animal.

**CEE.** 1990. Directiva 90/642/CEE del Consejo, de 27 de noviembre de 1990, relativa a la fijación de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en determinados productos de origen vegetal, incluidas las frutas y hortalizas.

**CEE.** 2005. Reglamento (CE) N° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo.

**CEE.** 2006. Reglamento (CE) N° 178/2006 de la Comisión, de 1 de febrero de 2006, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo con vistas a establecer el anexo I que incluye la lista de alimentos y piensos a los que se aplican contenidos máximos de residuos de plaguicidas.

**CEE.** 2008. Reglamento (CE) N° 260/2008 de la Comisión, de 18 de marzo de 2008, por el que se modifica el Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, estableciendo el anexo VII con la lista de combinaciones de sustancia activa y producto a las que se aplica la excepción respecto al tratamiento por fumigación posterior a la cosecha.

**CEE.** 2009a. Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, por la que se establece el marco de la actuación comunitaria para conseguir un uso sostenible de los plaguicidas.

**CEE.** 2009b. Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo

**CEREZO, A.B., CUEVAS, E., WINTERHALTER, P., GARCÍA-PARRILLA, M.C., TRONCOSO, A.M.** 2010. *Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in amara strawberry*. Food Chemistry, 123(3):574-582.

**CERMEÑO, S., MARTÍNEZ, G., MULERO, J., OLIVA, J., CÁMARA, M.A., BARBA, A.** 2015. *Biodisponibilidad in vitro de compuestos fenólicos y actividad anti-oxidante en vinos tintos (var. Tempranillo y Graciano)*. Enología 2.015. Innovación Vitivinícola (ISBN: 978-84-8424-378-6 (OT02)), 451-454.

**CHAIEB, N., LUIS-GONZÁLEZ, J., LÓPEZ-MESAS, M., BOUSLAMA, M., VALIENTE, M.** 2011. *Polyphenols content and antioxidant capacity of thirteen faba bean (Vicia faba L.) genotypes cultivated in Tunisia*. Food Research International, 44(4):970-977.

**CHANDRASEKARA, A., SHAHIDI, F.** 2012. *Bioaccessibility and antioxidant potential of millet grain phenolics as affected by simulated in vitro digestion and microbial fermentation*. Journal of Functional Food, 4(1):226-237.

**CHEN, Z., ZHU, Q., TSANG, D., HUANG, Y.** 2001. *Degradation of green tea catechins in tea drinks*. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 49:477-482.

**CHIOU, W.L., BARVE, A.** 1998. *Linear correlation of the fraction absorbed of 64 drugs between humans and rats*. Pharmaceutical Research, 15:1792-1795.

**CILLA A, PERALES S, JESUS LAGARDA M, BARBERÁ R, CLEMENTE G, FARRE R.** 2011. *Influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion on total antioxidant capacity of fruit beverages*. Journal of Food Composition and Analysis, 24(1):87-94.

**CILLA, A., GONZÁLEZ-SARRIAS, A., TOMÁS-BARBERÁN, F.A., ESPÍN, J.C., BARBERÁ, R.** 2009. *Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells*. Food Chemistry, 114(3):813-820.

**COLOGRANDE, O., MAZZOLENI, V., SILVA, A.** 1988. *Generi degli odori e sapori anormali dei vini*. Vitevini, 15(7-8):23-29.

**COMM.** 2006. Communication 2006/0372 from the Commission to the Council, the European Parliament, the European Economic and Social Committee and the Committee of the Regions: A thematic strategy on the sustainable use of pesticides, Bruselas.

**COMITINI, F., CIANI, M.** 2008. *Influence of fungicide treatments on the occurrence of yeast flora associated with wine grapes.* Annals of Microbiology, 58(3):489-493.

**COSCOLLÁ, R.** 1993. *Residuos de plaguicidas en productos elaborados.* En: Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. España. 205 pp.

**CRANDLES, M., REYNOLDS, A.G., KHAIRALLAH, R., BOWEN, A.** 2015. *The effect of yeast strain on odor active compounds in Riesling and Vidal blanc icewines.* LWT-Food Science and Technology, 64:243-258.

**CRDOC RIOJA.** 2015. CONSEJO REGULADOR DE LA D.O. CALIFICADA RIOJA. Valoración oficial de las cosechas 2012, 2013 y 2014. Recuperado el 12 de diciembre de 2015 de: <http://es.riojawine.com/es/>

**CUGIER, J.P., REULET, P.** 1997. *Enquête sur les résidus de produits phytosanitaires: Congormité aux LMR dans les raisins, résidus dans les vins.* Phytoma, la défense des végétaux, 492:31-36.

**CZIBULYA, Z., HORVÁTH, I., KOLLÁR, L., NIKFARDJAM, M.O., KUNSÁGI-MÁTÉ, S.** 2015. *The effect of temperature, pH, and ionic strength on color stability of red wine.* Tetrahedron, 71(20):3027-3031.

**DAGLIA, M., DI LORENZO, A., NABAVI, S.F., TALAS, Z.S., NABAVI, S.M.** 2014. *Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat!* Current Pharmaceutical Biotechnology, 15(4):362-372.

**DASHKO, S., ZHOU, N., TINTA, T., SIVILOTTI, P., LEMUT, M.S., TROST, K., GAMERO, A., BOEKHOUT, T., BUTINAR, L. VRHOVSEK, J., PISKUR, J.** 2015. *Fermentation, Cell Culture and Bioengineering*. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 42 (7): 997-1010.

**DE MELOS ABREU, S., CABONI, P., PIRISI, F.M., CABRAS, P., ALVÉS, A., GARAU, V.L.** 2006. *Residues of the fungicide famoxadone in grapes and its fate during wine production*. Food Additives and Contaminants, 23(3):289-294.

**DE-BEER, D., JOUBERT, E., GELDERBLUM, W., MANLEY, M.** 2003. *Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging*. Journal of Agricultural Food Chemistry, 51:902-909.

**DEL BARRIO-GALÁN, R., CACERES-MELLA, A., MEDEL-MARABOLI, M., PENA-NEIRA, A.** 2015. *Effect of selected Saccharomyces cerevisiae yeast strains and different aging techniques on the polysaccharide and polyphenolic composition and sensorial characteristics of Cabernet Sauvignon red wines*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(10):2132-2144.

**DELGADO, C.** 1998. *El nuevo libro del vino*. Alianza Editorial, S.A. Madrid, España.

**DE-SOUZA, V.R., PIMENTA-PEREIRA, P.A., QUEIROZ, F., BORGES, S.V., SOUZA-CARNEIRO, J.D.** 2012. *Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits*. Food Chemistry, 134(1):381-386.

**DÍAZ, A.** 1991. *Elaboración de vinos blancos y tintos de calidad*. Viticultura y Enología, 15:48-56.

**DÍAZ-PLAZA, E.M.** 2004. *Estudio de la capacidad de crianza de vinos monovarietales de Monastrell*. Tesis Doctoral, Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal, Universidad de Castilla La Mancha.

**DINNELLA, C., MINICHINO, P., D'ANDREA, A.M., MONTELEONE, E.** 2007. *Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during in vitro digestion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(21):8423-8429.

**DOIGNON, F; ROZES, N.** 1992. *Effect of triazole fungicides on lipid metabolism of Saccharomyces cerevisiae*. Letters in Applied Microbiology, 15(4):172-174.

**DOMÍNGUEZ, J., HERNÁEZ, J.L., OTERO, D., PASTRANA, L., PAZOS, Y.** 1995. *Los residuos antibotróxicos en las fermentaciones vinicas. Incidencias en la calidad del vino*. Vinicultura y Enología Profesional, 14:111-123.

**DONOVAN, J.L., MANACH, C., RÍOS, L., MORAND, C., SCALBERT, A., RÉMÉSY, C.** 2002. *Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3*. British Journal Nutrition, 87(4):299-306.

**DOSHI, P., ADSULE, P., BANERJEE, K., OULKAR, D.** 2015. *Phenolic compounds, antioxidant activity and insulinotropic effect of extracts prepared from grape (Vitis vinifera L) byproducts*. Journal of Food Science and Technology, 52(1):181-190.

**DUGO, G., BELLA, G., SAITTA, M. y CUCINOTTA, G.** 1993. *Determination of pesticide residues in sicilian wines of 1991*. Rivista di Scienza Alimentazione, 22(4):419-427.

**EDDER, P., ORTELLI, D., VIRET, O., COGNARD, E., DE MONTMOLLIN, A., ZALI, O.** 2009. *Control strategies against grey mould (Botrytis cinerea Pers.: Fr) and corresponding fungicide residues in grapes and wines*. Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 26(5):719-25.

**EU PESTICIDES DATABASE.** Recuperado el 2 de diciembre de 2015 de:

[http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=home\\_page&language=EN](http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=home_page&language=EN)

**FAIRBROTHER, A., WENSTEL, R., SAPPINGTON, K., WOOD, W.** 2007. *Framework for Metals Risk Assessment*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68:145-227.

**FAIT, A., COLOSIO, C.** 1998. *Recent advances and current concepts in pesticide hazards*. En: *The yearbook of Occupational and Environmental Medicine*. Ed. Emmet, E.A., Frank, A.L., Gochfeld, M., Hez, S.M., Mosby, St. Louis, USA, 15-29.

**FANZONE, M.** 2012. *Caracterización de la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Malbec (Vitis vinifera L.): Su relación con el origen geográfico, factores vitivinícolas y valor comercial*. Tesis Doctoral, Facultad de enología, Universidad Rovira y Virgili, España. 357 pp.

**FANZONE, M., ZAMORA, F., JOFRÉ, V., ASSO, F., GÓMEZ-CORDOCÉS, C., PEÑA-NEIRA, A.** 2012. *Phenolic characterisation of red wines from different grape varieties cultivated in Mendoza province (Argentina)*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3):704-718.

**FAO.** 2004. Food Agricultural Organization. *Inocuidad y calidad de los alimentos en Europa: Aspectos relacionados con la calidad, el equilibrio nutricional, la importancia de los terrenos agrícolas y el patrimonio cultural (« Terroirs»)*. Montpellier, Francia.

**FAO.** 2014. Food Agricultural Organization. *Codex alimentarius. Normas internacionales de alimentos: Orientaciones para una evaluación sencilla de la exposición alimentaria a aditivos alimentarios*. Roma, Italia.

**FAO/OMS.** 2010. Food Agricultural Organization/Organización Mundial de la Salud. *Código Internacional de Conducta sobre la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Directrices sobre publicidad de plaguicidas*. Roma. Italia.

**FATTOUCH, S., RABOUDI-FATTOUCH, F., PONCE, J.V.G., FORMENT, J.V., LUKOVIC, D., MARZOUKI, N., VIDAL, D.R.** 2010. *Concentration dependent effects of commonly used pesticides on activation versus inhibition of the quince (Cydonia Oblonga) polyphenol oxidase*. *Food and Chemical Toxicology*, 48(3):957-963.



**FAZZARI, M., FUKUMOTO, L., MAZZA, G., LIVREA, M.A., TESORIER, E. L., DI MARCO, L.** 2008. *In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (Prunus avium L.)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(10):3561-3568.

**FERNÁNDEZ-PACHÓN. M.S., VILLANO, D., GARCÍA-PARILLA, M.C., TRONCOSO, A.M.** 2004. *Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition*. Analytica Chimica Acta, 513:113-118.

**FERNANDES, I., NAVE, F., GONÇALVES, R., FREITAS, V., MATEUS, N.** 2012. *On the bioavailability of flavanols and anthocyanins: Flavanol-anthocyanin dimers*. Food Chemistry, 135(2):812-818.

**FERNÁNDEZ, M.J.** 2000. *Influencia del tipo de vinificación en la desaparición de los fungicidas pirimetanil, ciprodinil y fludioxonil*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad de Murcia.

**FERNÁNDEZ, M.J.** 2004. *Influencia de diversos procesos enotécnicos y nuevos productos enológicos en la eliminación de residuos de los fungicidas ciprodinil, fludioxinil, pirimetanil y quinoxifen*. Tesis doctoral, Facultad de química, Universidad de Murcia.

**FERNÁNDEZ M.J., OLIVA, J., BARBA, A., CÁMARA, M.A.** 2005a. *Fungicide dissipation curves in winemaking processes with and without maceration*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:804-811.

**FERNÁNDEZ, M. J., OLIVA, J., RUÍZ, E., CÁMARA, M.A. BARBA, A., PARDO, F.** 2001. *Eliminación de residuos de plaguicidas en función de la técnica de desfogado de mosto blanco*. Enólogos, 12:36-40.

**FERNÁNDEZ, M.J., OLIVA, J., BARBA, A., CÁMARA, M.A.** 2005b. *Effects of clarification and filtration processes on the removal of fungicide residues in red wines (var. Monastrell)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(15):6156-6161.

**FERNÁNDEZ, M<sup>a</sup>. J., OLIVA, J., CÁMARA, M.A., BARBA, A., PARDO, F.** 2002. *Acción de distintos clarificantes sobre la eliminación de fungicidas en vino tinto.* Alimentación, Equipos y Tecnología, 171:53-56.

**FIGUEIREDO-GONZÁLEZ, M., MARTÍNEZ-CARBALLO, E., CANCHO-GRANDE, B., SANTIAGO, J.L., MARTÍNEZ, M.C., SIMAL-GÁNDARA, J.** 2012. *Pattern recognition of three Vitis vinifera L. red grapes varieties based on anthocyanin and flavonol profiles, with correlations between their biosynthesis pathways.* Food Chemistry, 130:9-19.

**FLAMINI, R., MATTIVI, F., ROSSO, M., ARAPITSAS, P., BAVARESCO, L.** 2013. *Advanced Knowledge of Three Important Classes of Grape Phenolics: Anthocyanins, Stilbenes and Flavonols.* International Journal of Molecular Sciences, 14(10):19651-19669.

**FLANZY, C.** 2000. *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos.* A. Madrid Vicente (Eds.). Ed. Mundi-Prensa, 114-136.

**FRANKEL, E.N., WATERHOUSE, A.L., TEISSEDE, P.L.** 1995. *Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins.* Journal of Agricultural Food Chemistry, 43:890-894.

**FUSTER, A.** 2003. *Análisis de residuos de plaguicidas en alimentos de origen vegetal. Control de calidad en los ensayos.* Tesis Doctoral, Facultad de Química, Universidad de Murcia.

**GARAU, V.L., DE MELO-ABREU, S., CABONI, P., ANGIONI, A., ALVES, A., CABRAS, P.** 2009. *Residue-free wines: fate of some quinone outside inhibitor (QoI) fungicides in the winemaking process.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(6):2329-2333.

**GARCÍA-ESTÉVEZ, I., ANDRÉS-GARCÍA, P., ALCALDE-EON, C., GIACOSA, S., ROLLE, L., RIVAS-GONZALO, J.C., QUIJADA-MORÍN, N., ESCRIBANO-BAILÓN, M.T.** 2015. *Relationship between Agronomic Parameters, Phenolic Composition of Grape Skin, and Texture Properties of Vitis vinifera L. cv. Tempranillo.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(35):7663-7669.

**GARCÍA-GUZMÁN, J.J., HERNÁNDEZ-ARTIGA, M.P., PALACIOS-PONCE, L., BELLIDO-MILLA, D.** 2015. *Selective methods for polyphenols and sulphur dioxide determination in wines.* Food and Chemistry, 182:47-54.

**GARCÍA-ROMEYO, J.P.** 1996. *Acidez Volátil y paradas de fermentación . Estudio de factores que las originan y de sus posibles soluciones.* Tesis doctoral, Escuela Politécnica Superior, Universidad de Zaragoza.

**GARCÍA-SARTAL, C., BARCIELA-ALONSO, M.C., MOREDA-PIÑEIRO, A., BERMEJO-BARRERA, P.** 2013. *Study of cooking on the bioavailability of As, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Se and Zn from edible seaweed.* Microchemical Journal, 108:92-99.

**GAWLIK-DZIKI, U., DZIKI, D., BARANIAK, B., LIN, R.** 2009. *The effect of simulated digestion in vitro on bioactivity of wheat bread with Tartary buckwheat flavones addition.* LWT-Food Science and Technology, 42(1):137-143.

**GEVAO, B., SEMPLE, K.T., JONES, K.C.** 2000. *Bound pesticide residues in soils: a review.* Environmental Pollution, 108:3-4.

**GIL-IZQUIERDO, A., ZAFRILLA, P., TOMÁS-BARBERÁN, F.A.** 2002. *An in vitro method to simulate phenolic compound release from the food matrix in the gastrointestinal tract.* European Food Research Technology, 214:155-159.

**GIRAUDON, S., MEDINA, B., MERLE, M.H, y TUSSEAU, D.** 2000. *Análisis y controles. Investigación de los residuos de pesticidas.* AMV (Eds). En: *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos.* Ed. Mundi-Prensa, España, 237-238.

**GIRÓN, F.** 2012. *Disipación y efectos de nuevos fungicidas sobre la fermentación y calidad de vinos tintos de Monastrell*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias de la Salud, de la Actividad física y del Deporte, Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, Universidad Católica de San Antonio.

**GONZÁLEZ, C.F., OTERO, R.R., GRANDE, B.C., GÁNDARA, J.S.** 2003. *Determination of fungicide residues in white grapes for winemaking by gas chromatography with mass spectrometric detection and assessment of matrix effects*. Journal of AOAC International, 86(5):1008-1014.

**GONZÁLEZ, C.V., FANZONE, M.L., CORTÉS, L.E., BOTTINI, R., LIJAVETZKY, D.C., BALLARÉ, C.L., BOCCALANDRO, H.E.** 2015. *Fruit-localized photoreceptors increase phenolic compounds in berry skins of field-grown Vitis vinifera L. cv. Malbec*. Phytochemistry, 110:46-57.

**GONZÁLEZ-PARAMÁS, A., ESTEBAN-RUANO, S., SANTOS-BUELGA, C., DEPASCUAL-TERESA, S., RIVAS-GONZALO, J.** 2004. *Flavanol Content and Antioxidant Activity in Winery Byproducts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:234-238.

**GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R.M., CANCHO-GRANDE, B., SIMAL-GÁNDARA, J.** 2009. *Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid-liquid extraction/clean-up and programable temperatura vaporization inyección with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 121(32):6033-6042.

**GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R.M., CANCHO-GRANDE, B., SIMAL-GÁNDARA, J.** 2011a. *Decay of fungicide residues during vinification of white grapes harvested after the application of some new active substances against downy mildew*. Food Chemistry, 125:549-560.

**GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R.M., NOGUEROL-PATO, R., GONZÁLEZ-BARREIRO, C., CANCHO-GRANDE, B., SIMAL-GÁNDARA, J.** 2011b. *Application of new fungicides under good agricultural practices and their effects on the volatile profile of white wines*. Food Research International, 44:397-403.

**GORMAZ, J.G., QUINTREMIL, S., RODRIGO, R.** 2015. *Cardiovascular Disease: A Target for the Pharmacological Effects of Quercetin*. Current Topics in Medical Chemistry, 15(17):1735-1742.

**GRAZIANO, R., GAMMONE, M.A., TETTAMANTI, G., BERGANTE,S., PLUCHINOTTA, F.R., D´ORAZIO, N.** 2015. *Resveratrol and anti-atherogenic effects*. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 6(66):603-610.

**HAJŠLOVÁ, J., DAVIDEK, J., FIŠEROVÁ, L., VELIŠEK, J.** 1984. *The influence of some pesticides on the quality of apples. I. Enzymatic browning reactions*. Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung, 178(5):382-385.

**HALL, D. Y DE LUCA, V.** 2007. *Mesocarp localization of a bi-functional resveratrol/hydroxycinnamic acid glucosyltransferase of Concord grape (Vitis labrusca)*. The Plant Journal, 49:579-591.

**HARMESEN, J.** 2007. *Measuring bioavailability: from a scientific approach to standard methods*. Journal of Environmental Quality, 36:1420-1428.

**HATZIDIMITRIOU, E., DARRIET, P., BERTRAND, A., DUBOURDIEU, D.** 1997. *Folpet hydrolysis-incidence on the initiation of the alcoholic fermentation*. Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin, 31(1):51-55.

**HE, F., MU, L., GUO-LIANG, Y., LIANG, N., PAN, Q., WANG, J., REEVES, M..J., DUAN, C.** 2010. *Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes*. Molecules, 15:9057:9091.

**HIDALGO, J.** 2010. *Enología I Tratado de enología*. Ed. MundiPrensa. Madrid.

**HIDALGO, L.** 2003. *Tratado de Vinicultura General*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.

**HIXSON, J.L., SLEEP, N.R., CAPONE, D.L., ELSEY, G.M., CURTIN, C.D., SEFTON, M.A., TAYLOR, D.K.** 2012. *Hydroxycinnamic acid ethyl esters as precursors to ethylphenols in wine*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60(9):2293-2298.

**HODGSON, E., LEBLANC, G.A., MEYER, S.A., SMART, R.C.** 2004. *Introduction to Biochemical and Molecular Methods in Toxicology*. En: A textbook of modern toxicology (3<sup>o</sup> Ed.) Hogdson, E. (Ed.). Ed V John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. pp. 13-23.

**HOGAN, S., ZHANG, L., LI, J., ZOECKLEIN, B., ZHOU, K.** 2009. *Antioxidant properties and bioactive components of Norton (Vitis aestivalis) and Cabernet Franc (Vitis vinifera) wine grapes*. LWT-Food Science and Technology, 42(7):1269-1274.

**HONG, Y.S., MARTÍNEZ, A., LIGER-BELAIR, G., JEANDET, P., NUZILLARD, J.M., CILINDRE, C.** 2012. *Metabolomics reveals simultaneous influences of plant defence system and fungal growth in Botrytis cinerea-infected Vitis vinifera cv. Chardonnay berries*. Journal of Experimental Botany, 63(16):5773-5785.

**IBAÑEZ, J., MUÑOZ-ORGANERO, G., ZINELABIDINE, L.H., DE ANDRES, M.T., CABELLO, F., MARTÍNEZ-ZAPATER, J.M.** 2012. *Genetic origin of the grapevine cultivar tempranillo*. American Journal of Enology and Viticulture, 63(4):549-553.

**IVANOVA-PETROPULOS, V., RICCI, A., NEDELKOVSKI, D., DIMOVSKA, V., PARPINELLO, G.P., VERSARI, A.** 2015. *Targeted analysis of bioactive phenolic compounds and antioxidant activity of Macedonian red wines*. Food Chemistry, 171:412-420.

**IVASHCHENKO, A.V., IAMANUSHKIN, P.M., MITKIN, O.D., EZHOVA, E.V., KORZINOV, O.M., SHEVKUN, N.A., KORIAKOVA, A.G., KARAPETIAN, R.N., BYCHKO, V.V., IVASHCHENKO, A.A., AGRBA, V.Z., LAPIN, B.A., ORLO, S.V.** 2014. *Preclinical study of AV0012 early stage inhibitor of hepatitis C virus infection: I. In vitro ADME and pharmacokinetics*. Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologija, 77(4):33-41.

**IZQUIERDO, P.M, GARCÍA, E., GÓMEZ, S., PALOP, M.L.L.** 2008. *Changes in the aromatic composition of Tempranillo wines during spontaneous malolactic fermentation.* Journal of Food Composition and Analysis, 21:724-730.

**JAYASEKERA, S., MOLAN, A.L., GARG, M., MOUGHAN, P.J.** 2011. *Variation in antioxidant potential and total polyphenol content of fresh and fully-fermented Sri Lankan tea.* Food Chemistry, 125(2):536-541.

**JMPR.** 2007. *Join Meeting Pesticides Residues conjunto FAO/OMS CX/PR09/41/11*

**JOHNSON, L.R.** 1997. *Peptides of the Gastrointestinal tract.* En: Gastrointestinal Physiology (5<sup>o</sup> Ed.). L.R. Johnson (Ed.), St. Louis. pp. 1-14.

**JUBAN, Y.** 1996. *Límites máximos de residuos de pesticidas en uvas.* Viticultura-Enología Profesional, 47:6-11.

**JUHASZ, A.L., HERDE, P., HERDE, C., BOLAND, J., SMITH, E.** 2015. *Predicting Arsenic Relative Bioavailability Using Multiple in Vitro Assays: Validation of in Vivo-in Vitro Correlations.* Environmental Science and Technology, 49(18):11167-11175.

**KAHLE, K., HUEMMER, W., KEMPF, M., SCHEPPACH, W., ERK, T., RICHLING, E.** 2007. *Polyphenols are intensively metabolized in the human gastrointestinal tract after apple juice consumption.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 5(26):10605-14.

**KAHLE, K., KEMPF, M., SCHREIER, P., SCHEPPACH, W., SCHRENK,D., KAUTENBURGER, T., HECKER, D., HUEMMER, W., ACKERMANN, M., RICHLING, E.** 2011. *Intestinal transit and systemic metabolism of apple polyphenols.* European Journal of Nutrition, 50(7):507-22.

**KATAYAMA, A., BHULA, R., BURNS, G.R., CARAZO, E., FELSOT, A., HAMILTON, D., HARRIS, C., KIM, Y.H., KLETER, G., KOEDEL, W., LINDERS, J., PEIJNENBURG, J.G.M.W., SABLJIC, A.,STEPHESON, R.G., RACKE, D.K., RUBIN, B., TANAKA, K., UNSWORTH, J., WAUCHOPE, R.D.** 2010. *Bioavailability of xenobiotics in the soil environment*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 203:1-86.

**KHAN, S.U.** 1980. *Pesticides in the soil environment*. Elsevier (Ed.), Amsterdam.

**KHIRE, A., VALVIA, P.** 2014. *Bioavailability, bioequivalence, and in vitro-in vivo correlation of oxybutynin transdermal patch in rabbits*. Drug Delivery and Translational Research, 4(2):105-115.

**KIBRIA, G., YOUSUF HAROON, A.K., NUGEGODA, D., ROSE, G.** 2010. *Climate change and chemicals*. Environmental and biological aspects. New India Publishing Agency, Pitam Pura, New Delhi.

**KOCH, M., KÖPPEN, R., SIEGEL, D., WITT, A., NEHLS, I.** 2010. *Determination of total sulfite in wine by ion chromatography after in-sample oxidation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(17):9463-9467.

**KOMAREK, M., CADKOVA, E., CHRASTNY, V., BORDAS, F., BOLLINGER, J.C.** 2010. *Contamination of vineyard soils with fungicides: A review of environmental and toxicological aspects*. Environment International, 36:138-151.

**KOOKANA, R.S., BASKARAN, S., NAIDU, R.** 1998. *Pesticide fate and behavior in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review*. Australian Journal of Soil Research, 36(5):715-764.

**KORITALA, R., CHALLA, S.R., RAGAM, S.K., GEDDAM, L.B., VENKATESH, V.R., DEVI, R., SATTENAPALLIS, S., BABU, N.** 2015. *Quercetin does not alter the oral bioavailability of Atorvastatin in rats*. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, 28(5):1607-1612.



**KROES, R., MÜLLER, D., LAMBE, J., LÖWIK, M.R.H., VAN KLAVEREN, J., KLEINER, J., MASSEY, R., MAYER, S., URIETA, I., VERGER, P., VISCONTI, A.** 2002. *Assessment of intake from the diet*. Food Chemical Toxicology, 40(2-3):327-385.

**KUSKOSKI, E., ASUERO, A., GARCÍA-PARRILLA, M., TRONCOSO, A., FETT, R.** 2004. *Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos*. Ciencia e Tecnologia Alimentos, 24(4):691-693.

**LAGUNA, L.** 2013. *Desarrollo de metodologías para el análisis de fungicidas en matrices enológicas. Estudios de procesos degradativos e identificación de sus metabolitos*. Tesis Doctoral, Departamento de Química, Universidad de la Rioja.

**LANZARINI, J.L., JUAN-MANGIONE, J.** 2009. *La cultura de la vid y el vino: La vitivinicultura hace escuela* (1ª Ed.). Fondo vitivinícola de Mendoza (Ed.), Argentina. pp.17-22

**LARUE, F.** 1991. *IBS: des fongicides qui perturbent les fermentations*. Vitis, 139:106-108.

**LAURENT, C., BESANÇON, P., CAPORICCIO, B.** 2007. *Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model*. Food Chemistry, 100(4):1704-1712.

**LEE, C.Y., JAWORSKI, A.W.** 1990. *Identification of some phenolics in white grapes*. American Journal Enology and Viticulture, 41(1):87-89.

**LEE, J.H., TALCOTT, T.** 2004. *Fruit maturity and juice extraction influences ellagic acid derivatives and other antioxidant polyphenolics in Muscadibe grapes*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:361-366.

**LESJAK, M., HOGUE, R., BALESARIA, S., SKINNER, V., DEBNAM, E.S., SRAI, S.K., SHARP, P.A.** 2014. *Quercetin inhibits intestinal iron absorption and ferroportin transporter expression in vivo and in vitro*. Plos Ones, 9(7):e102900. doi: 10.1371/journal.pone.0102900.

**LI, H., WANG, X.Y., LI, Y., LI, P.H., WANG, H.** 2009. *Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines*. Food Chemistry, 112(2):454-460.

**LIANG, N.N., HE, F., BI, H.Q., DUAN, C.Q., REEVES, M.J., WANG, J.** 2012. *Evolution of flavonols in berry skins of different grape cultivars during ripening and a comparison of two vintages*. European Food Research and Technology, 235:1187-1197.

**LIANG, Z.C., YANG, Y.Z., CHENG, L.L., ZHONG, G.Y.** 2012. *Polyphenolic composition and content in the ripe berries of wild Vitis species*. Food Chemistry, 132(2):730-738.

**LIMA, M.S., DUTRA, P.D.M, TOALDO, I.M, CORREA, L.C., PEREIRA, G.E., OLIVEIRA, D., BORDIGNON-LUIZ, M.T., NINOW, J.L.** 2015. *Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration*. Food Chemistry, 188: 384-392.

**LISZT, K.I., EDER, R., WENDELIN, S., SOMOZA, V.** 2015. *Identification of Catechin, Syringic Acid, and Procyanidin B2 in Wine as Stimulants of Gastric Acid Secretion*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(35):7775-7783.

**LIU,X., JIA, B., SUN, X., AI, J.,WANG, L., WANG, C., ZHAO, F., ZHAN, J., HUANG, W.** 2015. *Effect of initial PH on growth characteristics and fermentation properties of Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Food Science, 80(4):M800-M808.

**LÖWIK, M.R.H., HULSHOF, K., BRUSSAARD, J.H., KISTEMAKER, C.** 1999. *Dependence of dietary intake estimates on the time frame of assessment*. Regulatory Toxicology Pharmacology, 30(2):S48–S56.

**MA, T.T., SUN, G.T., GAO, X.Y., WANG, X.Y., LIU, G.R., ZHAN, J.C.** 2014. *Phenolic Characterisation and Antioxidant Capacity of Young Wines Made From Different Grape Varieties Grown in Helanshan Donglu Wine Zone (China)*. South African Journal for Enology and Viticulture, 35(2):321-331.

**MACBEAN, C.** (Ed.). 2012. *The Pesticide Manual: A World Compendium* (16<sup>th</sup> Ed.). The British Crop Protection Council. Alton, Hampshire, UK.

**MAGRAMA.** 2009. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. *Encuesta base de viñedo 2009*. Recuperado el 29 de enero de 2015 de:  
<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/encuestas-de-vinedo/>

**MAGRAMA.** 2012. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. *Registro de productos fitosanitarios*. Recuperado el 23 de enero de 2015 de:  
<http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/uso-sostenible-de-productos-fitosanitarios/>

**MAGRAMA.** 2014a. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. *Datos de las denominaciones de origen protegidas 2012-2013*. Recuperado el 23 de enero de 2015 de:  
<http://www.magrama.gob.es/es/Alimentación/temas/calidad-agroalimentaria/calidad-diferenciada/dop/htm/cifrasydatos.aspx>

**MAGRAMA.** 2014b. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. *Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos (ESYRCE 2013)*. Recuperado el 10 enero de 2015 de:  
<http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/>

**MAGRAMA.** 2015. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Recuperado el 10 enero de 2015 de:  
<http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/vitivinicultura/>

**MAKRIS, D.P., KALLITHRAKA, S., KEFALAS, P.** 2006. *Flavonols in grapes, grape products and wines: Burden, profile and influential parameters*. Journal of Food Composition and Analysis, 19:396-404.

**MANACH, C., SCALBERT, A., MORAND, C., RÉMÉSY, C., JIMÉNEZ, L.** 2004. *Polyphenols: food sources and bioavailability*. American Journal of Clinical Nutrition, 79(5):727-747.

**MANACH, C., WILLIAMSON, G., MORAND, C., SCALBERT, A., RÉMÉSY, C.** 2005. *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. American Journal of Clinical Nutrition, 81(1):230S-242S.

**MARTÍNEZ, G., CERMEÑO, S., MORALES, A., MAESTRO, A., OLIVA, J., BARBA, A.** 2015. *Biodisponibilidad in vitro de boscalid, kresoximmetil y mepanipirín en vinos tintos (var. Tempranillo y Graciano)*. Enología 2.015. Innovación Vitivinícola (ISBN: 978-84-8424-378-6 (OT02)), 443-446.

**MARTÍNEZ-SANDOVAL, J.R., NOGALES-BUENO, J., RODRÍGUEZ-PULIDO, F.J., HERNÁNDEZ-HIERRO, J.M., SEGOVIA-QUINTERO, M.A., MARTÍNEZ-ROSAS, M.E., HEREDIA, F.J.** 2015. *Screening of anthocyanins in single red grapes using a non-destructive method based on the near infrared hyperspectral technology and chemometrics*. Science of Food and Agriculture, doi: 10.1002/jsfa.7266.

**MATTIVI, F., GUZZON, R., VRHOVSEK, U., STEFANINI, M., VELASCO, R.** 2006. *Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 54:7692-7702.

**MAZUÉ, F., DELMAS, D., MURILLO, G., SALEIRO, D., LIMAGNE, E., LATRUFFE, N.** 2014. *Differential protective effects of red wine polyphenol extracts (RWEs) on colon carcinogenesis*. Food & Function, 5(4):663-670.

**MAZZA, G., MINIATI, E.** 1993. *Grapes*. En: Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. Mazza, G., Miniati, E. (Eds.). C.R.C. Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo. pp. 149-199.

**MCDUGALL, G.J., DOBSON, P., SMITH, P., BLAKE, A., STEWART, D.** 2005a. *Assessing potential bioavailability of raspberry anthocyanins using an in vitro digestion system*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(15):5896-5904.

**MCDUGALL, G.J., FYFFE, S., DOBSON, P., STEWART, D.** 2005b. *Anthocyanins from red wine. Their stability under simulated gastrointestinal digestion.* Phytochemistry, 66(21):2540-2548.

**MCDUGALL, G.J., FYFFE, S., DOBSON, P., STEWART, D.** 2007. *Anthocyanins from red cabbage -stability to simulated gastrointestinal digestion.* Phytochemistry, 68(9):1285-1294.

**MENCHAI, P., VAN, L.V., KIMBER, L., AHMAD, N., RAO, P.S.C., HOSE, G.** 2008. *Bioavailable DDT residues in sediments: Laboratory assessment of ageing effects using semi-permeable membrane devices.* Environmental Pollution, 153:110-118.

**MENG, J.F., FANG, Y.L., QIN, M.Y., ZHUANG, X.F., ZHANG, Z.W.** 2012. *Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (Vitis davidii Foex) in Chongyi County (China).* Food Chemistry, 134(4):2049-2056.

**MENG, J.F., NING, P.F., XU, T.F., ZHANG, Z.W.** 2013. *Effect of rain-shelter cultivation of Vitis vinifera cv. Cabernet Gernischt on the phenolic profile of berry skins and the incidence of grape diseases.* Molecules 18(1):381-397.

**MILLER, D.D., SCHRICKER, R.B., RASMUSSEN, R.R., VAN CAMPEND, D.** 1981. *An in vitro method for estimation of iron availability from meals.* American Journal of Clinical Nutrition, 34(10):2248-2256.

**MOLINA-QUIJADA, D.M.A., MEDINA-JUAREZ, L.A., GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A., ROBLES-SÁNCHEZ, R.M., GÁMEZ-MEZA, N.** 2010. *Phenolic compounds and antioxidant activity of table grape (Vitis vinifera L.) skin from northwest Mexico.* CyTA-Journal of Food, 8:57-63.

**MONTEIRO, R., CLHAU, C., MARTEL, F., GUEDES, P.P., AZEVEDI, I.** 2004. *Intestinal uptake of MPP+ is differently affected by red and white wines.* Life Sciences, 76:2483-2496.

**MORALES-VALLE, H., SILVA, L.C., PATERSON, R.R., VENANCIO, A., LIMA, N.** 2011. *Effects of the origins of Botrytis cinerea on earthy aromas from grape broth media further inoculated with Penicillium expansum.* Food Microbiology, 28(5):1048-1053.

**MOREDA-PIÑEIRO, J., MOREDA-PIÑEIRO, A., ROMARÍS-HORTAS, V.** 2013. *ICP-MS for the determination of selenium bioavailability from seafood and effect of major food constituents.* Microchemical Journal, 108:174-179.

**MORENO-GARCÍA, J., GARCÍA-MARTÍNEZ, T., MILLAN, M.C., MAURICIO, J.C., MORENO, J.** 2015. *Proteins involved in wine aroma compounds metabolism by a Saccharomyces cerevisiae flor-velum yeast strain grown in two conditions.* Food Microbiology, 51:1-9.

**MULERO, J.** 2005. *Actividad antioxidante y compuestos fenólicos en uva y vino tinto de la variedad monastrell de cultivo ecológico y tradicional.* Tesis Doctoral, Facultad de Biología, Universidad de Murcia.

**MULERO, J., MARTÍNEZ, G., OLIVA, J., CERMEÑO, S., CAYUELA, J.M., ZAFRILLA, P., MARTÍNEZ-CACHÁ, BARBA, A.** 2015. *Phenolic compounds and antioxidant activity of red wine made from grapes treated with different fungicides.* Food Chemistry, 180:25–31.

**MULERO, J., PARDO, F., ZAFRILLA, P.** 2009. *Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant activity in conventional and organic red wines during storage.* European Food Research and Technology, 229(5):807-812.

**MULERO, J., ZAFRILLA, P., CAYUELA, J.M, MARTÍNEZ-CACHÁ, A., PARDO, F.** 2011. *Antioxidant activity and phenolic compounds in organic red wine using different winemaking techniques.* Journal of Food Science, 76(3):C436-C440.

**MÜLLER, L., GNOYKE, S., POPKEN, A.M., BÖHM, V.** 2010. *Antioxidant capacity and related parameters of different fruit formulations.* Food Science and Technology, 43(6): 992-999.

**NAKAMURA, Y., TONOGAI, Y.** 2003. *Metabolism of grape seed polyphenol in the rat.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(24):7215-7225.

**NARDI, T., CORICH, V., GIACOMINI, A., BLONDIN, B.** 2010. *A sulphite-inducible form of the sulphite efflux gene SSU1 in a Saccharomyces cerevisiae wine yeast.* Microbiology, 156(Pt 6):1686-1696.

**NAVARRO, G., SALINAS, M.R., PARDO, F.** 1990. *Características químicas y físico-químicas de los vinos de calidad de la D.O. Jumilla. I. Densidad, grado alcohólico, pH, acidez y contenidos en sulfuroso.* Semana Vitivinícola, 2269:425-431.

**NAVARRO, S., BARBA, A., OLIVA, J., NAVARRO, G., PARDO, F.** 1999. *Evolution of residual levels of six pesticides during elaboration of red wines. Effect of wine making procedures in their disappearance.* Journal of Agricultural and Chemistry, 47: 264-270.

**NEILSON, A.P., HOPF, A.S., COOPER, B.R., PEREIRA, M.A., BOMSER, J.A., FERRUZZI, M.G.** 2007. *Catechin degradation with concurrent formation of homo- and heterocatechin dimers during in vitro digestion.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(22):8941-9.

**NOGUER, M., CEREZO, A.B., RENTZSCH, M., WINTERHALTER, P., TRONCOSO, A.M., GARCÍA-PARRILLA, M.** 2008. *Simulated digestion and antioxidant activity of red wine fractions separated by high speed countercurrent chromatography.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(19):8879-8884.

**NOGUEROL-PATO, R., GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R.M., GONZÁLEZ-BARREIRO, C., CANCHO-GRANDE, B., SIMAL-GÁNDARA, J.** 2011. *Influence of tebuconazole residues on the aroma composition of Mencía red wines.* Food Chemistry, 124:1525-1532.

**OEMV.** 2013. Observatorio Español del mercado del vino. Recuperado el 16 de diciembre de 2014 de:

[http://www.winesfromspain.es/icex/cda/controller/pageGen/0,3346,1559872\\_6763355\\_6778152\\_0,00.html](http://www.winesfromspain.es/icex/cda/controller/pageGen/0,3346,1559872_6763355_6778152_0,00.html)

**OEMV.** 2014. Observatorio Español del mercado del vino. Recuperado el 26 de noviembre de 2014 de: <http://www.oemv.es/esp/-oemv.php>

**OCHIAI, N., FUJIMURA, M., OSHIMA, M., MOTOYAMA, T., ICHIISHI, A., YAMADA-OKABE, H., YAMAGUCHI, I.** 2002. *Effects of iprodione and fludioxonil on glycerol synthesis and hyphal development in Candida albicans.* Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 66(10):2209-2215.

**OIV.** 2013. Observatorio Internacional de la viña y el vino. *Vine and Wine Outlook 2010-2012.* Recuperado el 20 de noviembre de 2014 de: <http://www.oiv.int/oiv/cms/404?lang=es>

**OLIVA, J., MULERO, J., PAYÁ, P., CÁMARA, M.A., BARBA, A.** 2009. *Influence of several fungicides on the antioxidant activity of red wines (var. Monastrell).* Journal of Environmental Science and Health part B, 44(6):546-552.

**OLIVA, J., BARBA, A., SAN NICOLÁS, F.T., PAYÁ, P.** 2005. *Efectos de residuos de fungicidas en la composición fenólica de vinos de tintos (var. Monastrell).* Tecnología del vino, 23:37-40.

**OLIVA, J., CAYUELA, M., PAYÁ, P., MARTÍNEZ-CACHA, A., CÁMARA, M.A., BARBA, A.** 2007a. *Influence of fungicides on grape yeast content and its evolution in the fermentation.* Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 72(2):81-189.

**OLIVA, J., NAVARRO, S., BARBA, A., NAVARRO G., SALINAS, M.R.** 1999. *Effect of pesticide residues on the aromatic composition of red wines.* Journal Agricultural Food Chemistry, 47(7):2830-2836.

**OLIVA, J., PAYÁ, P., CÁMARA, M.A., BARBA, A.** 2007b. *Removal of pesticides from white wine by the use of fining agents and filtration.* Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences. 72(2):171-180.



**OLIVA, J., PAYÁ, P., CÁMARA, M.A., BARBA, A.** 2007c. *Removal of famoxadone, fluquinconazole and trifloxystrobin residues in red wines: Effects of clarification and filtration processes.* Journal of Environmental Science and Health part B, 42(7):775-781.

**ORTEGA, N., REAGUANT, J., ROMERO, M., MACÍA, A., MOTILVA, M.** 2009. *Effect of fat content on the digestibility and bioaccessibility of cocoa polyphenol by an in vitro digestion model.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57(13):5743-5749.

**ORTIZ, F., YRUELA, M.C., FERNÁNDEZ, M., LÓPEZ, M.,** 2010. *Aplicación de plaguicidas.* Junta de Andalucía. Servicio de Publicaciones y Divulgación. Dirección General de Investigación y Formación Agraria. Sevilla, España.

**PARDO, F.** 1995. *Contribución a la mejora de la vinificación y la calidad de vinos tintos de Monastrell en la D.O. Jumilla.* Tesis Doctoral. Facultad de Química, Universidad de Murcia.

**PARDO, F.** 1996. Jumilla. Viñas, bodegas y vinos. Pardo, F. (Ed). Murcia, España. 287

**PASCUAL-TERESA, S. Y SÁNCHEZ-BALLESTA, T.** 2008. *Anthocyanins: from plant to health.* Phytochemistry Reviews, 7:281-299.

**PASCUAL-TERESA, S., MORENO, D.A., GARCÍA-VIGUERA, C.** 2010. *Flavanols and Anthocyanins in Cardiovascular Health: A Review of Current Evidence.* International Journal of Molecular Sciences, 11:1679-1703.

**PAYÁ, P., MULERO, J., OLIVA, J., BARBA, A., MORILLAS, J., ZAFRILLA, P.** 2006. *In vitro availability of insect growth regulators from vegetables.* Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University, 71/2b:549-553.

**PAYÁ, P., MULERO, J., OLIVA, J., CÁMARA, M.A., ZAFRILLA, P., BARBA, A.** 2007. *Bioavailability of insect growth regulators in citrus and stone fruits.* Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent University, 72/2: 151-159.

**PAYÁ, P., OLIVA, J., ZAFRILLA, P., CÁMARA, M.A., BARBA, A.** 2009. *Bioavailability of insect growth regulator residues in citrus*. *Ecotoxicology*, 18:1137-1142.

**PAYÁ, P., MULERO, J., OLIVA, CÁMARA, M.A., BARBA, A.** 2013. *Influence of the matrix in bioavailability of flufenoxuron, lufenuron, pyriproxyfen and fenoxycarb residues in grapes and wine*. *Food Chemical Toxicology*, 60:419-423.

**PERALES, S., BARBERA, R., LAGARDA, M.J. FARRE, R.** 2008. *Antioxidant capacity of infant fruit beverages; influence of storage and in vitro gastrointestinal digestion*. *Nutrición Hospitalaria*, 23(6):547-553.

**PÉREZ-MAGARIÑO, S., GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L.**2004. *Evolution of flavanols, anthocyanins, and their derivatives during the aging of red wines elaborated from grapes harvested at different stages of ripening*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,52:1181-1189.

**PÉREZ-VICENTE, A., GIL-IZQUIERDO, A., GARCÍA-VIGUERA, C.** 2002. *In vitro gastrointestinal digestion study of pomegranate juice phenolic compounds, anthocyanins, and vitamin C*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,50(8):2308-2312.

**PETERSEN, B.J., YOUNGREN, S.H., WALLS, C.L.** 2001. *Modeling dietary exposure with special sections on modeling aggregate and cumulative exposure*. En: *Handbook of Pesticide Toxicology* (2<sup>nd</sup> Ed.). Academic Press (Ed.), San Francisco, USA. pp. 443-455.

**PETROPULOS, V.I., BOGEVA, E., STAFILOV, T., STEFOVA, M., SIEGMUND, B., PABI, N., LANKMAYR, E.** 2014. *Study of the influence of maceration time and oenological practices on the aroma profile of Vranec wines*. *Food Chemistry*, 165:506-514.

**PIAO, H., HAWLEY, E., KOPF, S., DESCENZO, R., SEALOCK, S., HENICK-KLING, T., HESS, M.** 2015. *Insights into the bacterial community and its temporal succession during the fermentation of wine grapes*. Frontiers in Microbiology, doi: 10.3389/fmicb.2015.00809.

**PINTO, C., PINHO, D., CARDOSO, R., CUSTODIO, V., FERNADES, J., SOUSA, S., PINHERIO, M., EGAS, C., GOMES, A.C.** 2015. *Wine fermentation microbiome: a landscape from different Portuguese wine appellations*. Frontiers in Microbiology, doi: 10.3389/fmicb.2015.00905.

**PIRETTI, M.V., GHEDINI, M., SERRAZANETTI, G.** 1976. *Isolation and identification of the polyphenolic and terpenoid constituents of Vitis vinifera*. Annali di Chimica, 66:429-437.

**RAMÍREZ, J.A., LACASAÑA, M.** 2001. *Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición*. Archivos de Prevención de Riesgos Laborales, 4(2):67-75.

**READ, A., WRIGHT, A., ABDEL-AAL, E.S.M.** 2015. *In vitro bioaccessibility and monolayer uptake of lutein from wholegrain baked foods*. Food Chemistry, 174:263-269.

**REBOLO-LÓPEZ, S.** 2007. *Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra*. Tesis Doctoral, Departamento de química analítica, nutrición y bromatología, Universidad de Santiago de Compostela, España, 179 pp.

**RECORD, I.R., LANE, J.M.** 2001. *Simulated intestinal digestion of green and black teas*. Food Chemistry, 73(4):481-486.

**REGUEIRO, J., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, O., RIAL-OTERO, R., CANCHO-GRANDE, B., SIMAL-GÁNDARA, J.** 2015. *A Review on the Fermentation of Foods and the Residues of Pesticides-Biotransformation of Pesticides and Effects on Fermentation and Food Quality*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 55:839-863.

**REULET, P., DE LA ROCQUE, B., CUGIER, J.P.** 1996. *Enquête 1995 sur les résidus dans le raisin et le vin*. Phytoma, la defensa des végétaux, 488:9-14.

**REYNIER, A.** 2002. *Manual de vinicultura* (6<sup>a</sup> Ed.). Ed. Mundi-Prensa, Madrid. España.

**RICARDO DA SILVA, J.M. ROSEC, J.P. BOURZEIX, M., MOURGUES, J., MOUTOUNET, M.** 1992. *Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvedre grapes and wines*. Vitis, 31(1):55-63.

**ROSS, J.H., DRIVER, J.H., COCHRAN, R.C., THONGSINTHUSAK, T., KRIEGER, R.I.** 2001. *Could pesticide toxicology studies be more relevant to occupational risk assessment?*. Annals of Occupational Hygiene, 45:S5-S17.

**RUEDIGER, G.A., PARDON, K.H., SAS, A.N., GODDEN, P.W., POLLNITZ, A.P.** 2005. *Fate of pesticides during the winemaking process in relation to malolactic fermentation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(8):3023-3026.

**RUGGERI, R., VANNINI, P., CARUGO, C., COLLI, A., AMANTI, S. y PEDROTTI, P.** 1996. *Evaluation of pesticide residues in wines in the province of Sondrio*. Rivista di Scienza Alimentazione, 25(1):17-22.

**RUÍZ, P., IZQUIERDO, P.M., SESEÑA, S., GARCÍA, E., PALOP, M.L.** 2012. *Malolactic fermentation and secondary metabolite production by Oenococcus oeni strains in low pH wines*. Journal of Food Science, 77(10):M579-M585.

**RUKHSANDA, A., RAFIQ, M.T., LI, T., LIU, D., HE, Z., STOFFELLA, P.J., SUN, K., XIAOE, Y.** 2015. *Uptake of Cadmium by Rice Grown on Contaminated Soils and Its Bioavailability/Toxicity in Human Cell Lines (Caco-2/HL-7702)*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63(13):3599-3608.

**SAAD, M.M., ISMAIL, HUSSEIN, M., ALI, RAMADAN, A., HABIBAS.** 1993. *GC-ECD and GC-MS analyses of profenofos residues and its biochemical effects in tomatoes and tomato products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 41:610-615.

**SALA, C., FORT, F. BUSTO, O. ZAMORA, F., AROLA, L., GUASCH, J.** 1996. *Fate of some common pesticides during vinification process.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 44 (11):3668-3671.

**SÁNCHEZ-MORENO, C., CAO, G., OU, B., PRIOR, R.L.** 2003. *Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines obtained from highbush blueberry.* Journal of Agricultural Food Chemistry, 51:4889-4896

**SANCHO, M., MACH, N.** 2014. *Effects of wine polyphenols on cancer prevention.* Nutrición Hospitalaria, 31(2):535-551.

**SANCO.**2013. *Method validation and quality control procedures for pesticides residues analysis in food and feed.* European Commission Health and Consumer protection Directorate-General, SANCO/12571/2013. Brussels, Belgium.

**SANTOS, C.** 1997. *Aplicación de fungicidas antibottríticos en vid: eficacia, residuos y consecuencias enológicas.* Tesis Doctoral, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Madrid.

**SANTOS, C., RIVAS, J.** 1994. *Color de los vinos tintos. Interacciones entre los antocianos y catequizas.* Jornadas Científicas grupos de Investigación Enológica 94. Ponencia, 21. Tarragona, España.

**SAPIS-DOMERCO, S.** 1980. *Etude de l'influence des produits de traitement de la vigne sur la microflore des raisins et des vies.* Connaissance de la Vigne et du Vin, 14:155-181.

**SAXENA, R., VENKAI AH, K., ANITHA, P., VENU, L., RAGHUNATH, M.** 2007. *Antioxidant activity of commonly consumed plant foods of India: contribution of their phenolic content.* International Journal of Food Sciences and Nutrition, (4):250-260.

**SCHOPP, L.M., LEE, J., OSBORNE, J.P., CHESCHEIR, S.C., EDWARDS, C.G.** 2013. *Metabolism of nonesterified and esterified hydroxycinnamic acids in red wines by *Brettanomyces bruxellensis*.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(47):11610-11617.

**SCHRICKER, B.R., MILLER, D.D., RASMUSSEN, R.R., VAN CAMPEN, D.** 1981. *A comparison of in vivo and in vitro methods for determining availability of iron from meals.* American Journal of Clinical Nutrition, 34(10):2257-2263.

**SERRANO, J., PUUPONEN-PIMIÄ, R., DAUER, A., AURA, A., SAURA-CALIXTO, F.** 2009. *Tannins: Current knowledge of food sources, intake, bioavailability and biological effects.* Molecular Nutrition and Food Research, 53(S2):S310-S329.

**SHAW-WEI, S., CHUN-CHIH, T., HUNG-YU, L., ZUENG-SANG, C.** 2014. *Food Safety and Bioavailability Evaluations of Four Vegetables Grown in the Highly Arsenic-Contaminated Soils on the Guandu Plain of Northern Taiwan.* International Journal of Environmental Research Public Health, 1:4091-4107.

**SHEN, Y., JIN, L., XIAO, P., LU, Y., BAO, J.** 2009. *Total phenolics, flavonoids, antioxidant capacity in rice grain and their relations to grain color, size and weight.* Journal of Cereal Science, 49(1):106-111.

**SINGH, Y., HIDAU, M.K., SINGH, S.K.** 2015. *Rifabutin reduces systemic exposure of an antimalarial drug 97/78 upon co-administration in rats: An in-vivo & in-vitro analysis.* Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 8(8):630-635.

**SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A.** 1965. *Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.* American Journal of Enology and Viticulture, 16:144-158.

**SINGLETON, V.L., TIMBERLAKE, C.F., LEA, A.G.H.** 1978. *The phenolic cinnamates of white grapes and wine.* Journal of the Science Food Agriculture, 29:403-410.

**SOLEAS, G.J., GRASS, L., JOSEPHY, P.D., GOLDBERG, D.M. DIAMANDIS, E.P.** 2002. *A comparison of anticarcinogenic properties of four red wines polyphenols.* Clinical Biochemistry, 35:119-124.

**SPENCER, J.P., SCHROETER, H., RECHNER, A.R., RICE-EVANS, C.** 2001. *Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms in vivo.* Antioxid Redox Signal, 3(6):1023-39.

**STEEL, C.C., BLACKMAN, J.W., SCHMIDTKE, L.M.** 2013. *Grapevine bunch rots: impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(22):5189-5206.

**STEVENSON, D.E., COONEY, J.M., JENSEN, D.J., ZHANG, J., WIBISONO, R.** 2007. *Comparison of the relative recovery of polyphenolics in two fruit extracts from a model of degradation during digestion and metabolism*. Molecular Nutrition and Food Research, 51(8):939-945.

**SULAIMAN, S.F., YUSOFF, N.A.M., ELDEEN, I.M., SEOW, E.M., SAJAK, A.A.B., SUPRIATNO, A.** 2011. *Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (Musa sp.)*. Journal of Food Composition and Analysis, 24(1):1-10.

**SUN, B., NEVES, A.C., FERNADES, T.A., MATEUS, N., DE-FREITAS, V., LENADRO, C., SPRANGER, M.I.** 2011. *Evolution of phenolic composition of red wine during vinification and storage and its contribution to wine sensory properties and antioxidant activity*. American Chemical Society, 59:6550-6557.

**SYNOS, K., REYNOLDS, A.G., BOWEN, A.J.** 2015. *Effect of yeast strain on aroma compounds in Cabernet franc icewines*. LWT-Food Science and Technology, 64:227-235.

**SZYDLOWSKA-CZERNIAK, A., BARTKOWIAK-BRODA, I., KARLOVIC, I., KARLOVITS, G., SZLYK, E.** 2011. *Antioxidant capacity, total phenolics, glucosinolates and colour parameters of rapeseed cultivars*. Food Chemistry, 127(2):556-563.

**TABART, J., KEVERS, C., PINCEMAIL, J., DEFRAIGNE, J., DOMMES, J.** 2009. *Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests*. Food Chemistry, 113(4):1226-1233.

**TAGLIAZUCCHI, D., VERZELLONI, E., BERTOLINI, D., CONTE, A.** 2010. *In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols*. Food Chemistry, 120(2):599-606.

**TAKO, E., REED, S., ANANDARAMAN, A., BEEBE, S.E., HART, J.J., GLAHN, R.P.** 2015. *Studies of Cream Seeded Carioca Beans (Phaseolus vulgaris L.) from a Rwandan Efficacy Trial: In Vitro and In Vivo Screening Tools Reflect Human Studies and Predict Beneficial Results from Iron Biofortified Beans*. PLoS One, 10(9):e0138479. doi: 10.1371/journal.pone.0138479.

**TAO, S., LI, L., DING, J., ZHONG, J., ZHANG, D., LU, Y., YANG, Y., WANG, X., LI, X., CAO, J., LU, X., LIU, W.** 2011. *Mobilization of soil-bound residue of organochlorine pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in an in vitro gastrointestinal model*. Environmental Science & Technology, 45:1127–1132.

**TARASCHI, T.F., RUBIN, E.** 1985. *Effects of Ethanol on the Chemical and Structural Properties of Biologic Membranes*. Laboratory Investigation, 52(2):120-131.

**TARKO, T., DUDA-CHODAK, A., TUSZYNSKI, T.** 2009. *Simulation of phenolic compounds transformations and interactions in an in vitro model of the human alimentary tract*. Food Science and Technology International, 15(3):235-241.

**TAVARES, L., FIGUEIRA, I., MACEDO, D., MCDUGALL, G.J., LEIRAO, M.C., VIERA, H.L.A., STEWAR, D., ALVES, P.M., FERREIRA, R.B., SANTOS, C.N.** 2012. *Neuroprotective effect of blackberry (Rubus sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion*. Food Chemistry, 131(4):1443-1452.

**TERPINC, P., CEH, B., ULRIH, N.P., ABRAMOVIC, H.** 2012. *Studies of the correlation between antioxidant properties and the total phenolic content of different oil cake extracts*. Industrial Crop and Products, 39(0):210-217.

**TLILI, I., HDIDER, C., LENUCCI, M.S., ILAHY, R., JEBARI, H., DALESSANDRO, G.** 2011. *Bioactive compounds and antioxidant activities during fruit ripening of watermelon cultivars*. Journal of Food Composition and Analysis, 24(7):923-928.



**TOALDO, I.M., CRUZ, F.A., ALVES, T.L., GOIS, J.S., BORGES, D.L., CUNHA, H.P., SILVA, E.L., BORDIGNON-LUIZ, M.T.** 2015. *Bioactive potential of Vitis labrusca L. grape juices from the Southern Region of Brazil: phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects.* Food Chemistry, 173:527-535.

**TRCEK, J., MIRA, N.P., JARBOE, L.R.** 2015. *Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid.* Applied Microbiology and Biotechnology, 99(15):6215-6229.

**TSANG, C., AUGER, C., MULLEN, W., BORNET, A., ROUANET, J.M., CROIZIER, A., TEISSEDE, P.L.** 2005. *The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats.* British Journal Nutrition, 94(2):170-81.

**UNE-EN ISO/IEC 17025.** 2005. *Conformity Assessment, General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories.* International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.

**UBEDA, J., BRIONES, A.I., IZQUIERDO, P.M.** 1996. *Relationship between the chromosomal profile and the whole-cell protein patterns of wine yeast strains.* Food Science and Technology, 29:738-742.

**VALLEJO, F., GIL-IZQUIERDO, A., PÉREZ-VICENTE, A., GARCÍA-VIGUERA, C.** 2004. *In vitro gastrointestinal digestion study of broccoli inflorescence phenolic compounds, glucosinolates, and vitamin C.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(1):135-138.

**VAN-LEEUVEN, C., ROBY, J.P., ALONSO-VILLAVARDE, V., GINDRO, K.** 2013. *Impact of clonal variability in Vitis vinifera Cabernet franc on grape composition, wine quality, leaf blade stilbene content, and downy mildew resistance.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(1):19-24.

**VAQUERO-FERNÁNDEZ, L.** 2010. *Nuevas aportaciones al conocimiento y utilización de productos fitosanitarios para el control de enfermedades de la vid*. Evaluación de posibles efectos sobre la fermentación y elaboración de vinos de calidad. Tesis Doctoral, Departamento de Química, Universidad de la Rioja.

**VAQUERO-FERNÁNDEZ, L., SANZ-ASENSIO, J. FERNÁNDEZ-ZURBANO, P., LÓPEZ-ALONSO, M., MARTÍNEZ-SORIA, M.T.** 2012. *Determination of fungicides pyrimethanil in grapes, must, fermenting must and wine*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 93(8):1960-1966.

**VAQUERO-FERNÁNDEZ, L., SANZ-ASENSIO, J., LÓPEZ-ALONSO, M., MARTÍNEZ-SORIA, M.T.** 2009. *Fate and distribution of pyrimethanil, metalaxyl, dichlofluanid and penconazol fungicides from treated grapes intended for winemaking*. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 26(2):164-171.

**VIDAL, M.T., POBLET, M., CONSTANTÍ, M., BORDONS, A.** 2001. *Inhibitory effect of copper and dichlofluanid on Oenococcus oeni and malolactic fermentation*. American Journal of Enology and Viticulture, 52(3):223-229.

**VILANOVA, M., RODRÍGUEZ, I., CANOSA, P., OTERO, I., GAMERO, E., MORENO, D., TALAVERANO, I., VALDÉS, E.** 2015. *Variability in chemical composition of Vitis vinifera cv Mencía from different geographic areas and vintages in Ribeira Sacra (NW Spain)*. Food Chemistry, 169:187-196.

**WARE, G.W., WHITACRE, D.M.** 2004. *The pesticide book* (6<sup>th</sup> Ed.). Meister Media Worldwide (Ed.), Ohio, USA. pp. 70-71.

**WATERHOUSE, A.L., LAMUELA-RAVENTÓS, R.M.** 1994. *The occurrence of piceid, a stilbene glucoside in grape berries*. Phytochemistry, 37:571-573.

**WIGHTWICK, A., & ALLINSON, G.** 2007. *Pesticide residues in Victorian waterways: a review*. Australasian Journal of Ecotoxicology, 13:91-112.

**WIGHTWICK, A., MOLLAH, M., PARTINGTON, D., ALLISON, G.** 2008. *Copper fungicide residues in Australian vineyards soils*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58:449-457.

**WOOTTON-BEARD, P.C., MORAN, A., RYAN, L.** 2011. *Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods*. Food Research International, 44(1):217-224.

**YOU, J., BRENNAN, A., LYDY, M.J.** 2009. *Bioavailability and biotransformation of sediment-associated pyrethroid insecticides in Lumbriculus variegatus*. Chemosphere, 75:1477-1482.

**ZAMORA, F.** 2003. *Elaboración y crianza del vino tinto. Aspectos científicos y prácticos*. AMV ediciones. Madrid.

**ZILIC, S., SUKALOVIC, V.H., DODIG, D., MAKSIMOVIC, V., MAKSIMOVIC, M., BASIC, Z.** 2011. *Antioxidant activity of small grain cereals caused by phenolics and lipid soluble antioxidants*. Journal of Cereal Science, 54(3):417-424.

**ZIRONI, R., FARRIS, G., CABRAS, P., FATICHENTI, F.** 1991. *I residui antiparassitari dall'uva al vino*. Atti Accademia Italiana Vite e Vino, 43:352-369.



**7. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.**

## 7.1. TABLAS.

<b>Tabla 2.1.</b> <i>Fungidas utilizados y familias a las que pertenecen.....</i>	47
<b>Tabla 3.1.</b> <i>Formulados comerciales utilizados para aplicación en campo y bodega.....</i>	78
<b>Tabla 3.2.</b> <i>Concentraciones y fechas de los tratamientos fitosanitarios en campo.....</i>	84
<b>Tabla 3.3.</b> <i>Fortificaciones en depósitos.....</i>	84
<b>Tabla 3.4.</b> <i>Gradientes de flujos utilizados en el análisis LC-MS/MS QqQ.....</i>	87
<b>Tabla 3.5.</b> <i>Parámetros experimentales y condiciones de LC-MS/MS de los fungidas analizados.....</i>	87
<b>Tabla 4.1.</b> <i>Rectas de regresión, coeficientes de correlación (<math>R^2</math>) y desviación estándar relativa (RSD) de los fungidas estudiados en uva y vino .....</i>	97
<b>Tabla 4.2.</b> <i>Límites de detección, cuantificación y LMR en los fungidas estudiados (mg/kg).....</i>	98
<b>Tabla 4.3.</b> <i>Desviación estándar relativa en el estudio de la precisión en uva y vino.....</i>	99
<b>Tabla 4.4.</b> <i>Porcentajes de recuperación en las muestras de uva fortificadas a LQ y 10LQ, en condiciones de repetibilidad.....</i>	99
<b>Tabla 4.5.</b> <i>Porcentajes de recuperación en las muestras de uva fortificadas a LQ y 10LQ, en condiciones de reproducibilidad.....</i>	99
<b>Tabla 4.6.</b> <i>Porcentajes de recuperación en las muestras de vino fortificadas a LQ y 10LQ, en condiciones de repetibilidad.....</i>	100
<b>Tabla 4.7.</b> <i>Porcentajes de recuperación en las muestras de vino fortificadas a LQ y 10LQ, en condiciones de reproducibilidad.....</i>	100
<b>Tabla 4.8.-</b> <i>Residuos de fungidas (ppm) en vinos después de su aplicación en campo en uvas de variedades Tempranillo y Graciano .....</i>	101
<b>Tabla 4.9.</b> <i>Residuos de fungidas (ppm) en los vinos fortificados en bodega.....</i>	103
<b>Tabla 4.10.</b> <i>Valores residuales (ppm) en vinos antes y después de la clarificación.....</i>	104
<b>Tabla 4.11.</b> <i>Actividad antioxidante (mM Trolox/ml vino) de los vinos de las distintas vendimias y variedades en BPA, CPA y fortificadas.....</i>	105
<b>Tabla 4.12.</b> <i>Efecto de la clarificación en la actividad antioxidante (DPPH) en vino Tempranillo.....</i>	107

<b>Tabla 4.13.</b> <i>Polifenoles totales (Folin-Ciocalteu) en vinos Tempranillo y Graciano (g/l)</i> .....	110
<b>Tabla 4.14.</b> <i>Efecto de la clarificación en el contenido en polifenoles totales en vino Tempranillo (2013)</i> .....	111
<b>Tabla 4.15.</b> <i>Valores medios de compuestos fenólicos (mg/l) para los dos vinos</i> .....	115
<b>Tabla 4.16.</b> <i>Compuestos fenólicos de vinos Tempranillo (mg/l) (2012)</i> .....	119
<b>Tabla 4.17.</b> <i>Compuestos fenólicos de vinos Graciano (mg/l) (2012)</i> .....	120
<b>Tabla 4.18.</b> <i>Relación entre compuestos fenólicos y fungicidas en vino Tempranillo (2012)</i> ....	121
<b>Tabla 4.19.</b> <i>Relación entre compuestos fenólicos y fungicidas en vino Graciano (2012)</i> .....	121
<b>Tabla 4.20.</b> <i>Compuestos fenólicos de vinos Tempranillo clarificados (mg/l) (2013)</i> .....	122
<b>Tabla 4.21.</b> <i>Compuestos fenólicos de vinos Tempranillo sin clarificar (mg/l) (2013)</i> .....	122
<b>Tabla 4.22.</b> <i>Relación entre compuestos fenólicos y fungicidas en vino Tempranillo clarificado y sin clarificar (2014)</i> .....	123
<b>Tabla 4.23.</b> <i>Valores medios de compuestos fenólicos (mg/l) en vino Tempranillo (2014)</i> .....	124
<b>Tabla 4.24.</b> <i>Valores medios de compuestos fenólicos (mg/l) en vino Graciano (2014)</i> .....	124
<b>Tabla 4.25.</b> <i>Relación entre compuestos fenólicos y fungicidas en vino Tempranillo BPA y CPA (2014)</i> .....	125
<b>Tabla 4.26.</b> <i>Relación entre compuestos fenólicos y fungicidas en vino Graciano BPA y CPA (2014)</i> .....	125
<b>Tabla 4.27.</b> <i>Concentración en el dializado de cada fungicida en las tres matrices estudiadas.</i>	135
<b>Tabla 4.28.</b> <i>Porcentajes de dialización de cada fungicida en las tres matrices estudiadas</i> .....	136
<b>Tabla 4.29.</b> <i>Concentraciones y porcentajes dializados de cada fungicida en los vinos Tempranillo y Graciano (2012)</i> .....	139
<b>Tabla 4.30.</b> <i>Cantidades y porcentajes de los fungicidas dializados en vinos sin clarificar y clarificados (2013)</i> .....	140
<b>Tabla 4.31.</b> <i>Porcentajes dializados y concentraciones de los fungicidas estudiados (2014)</i> ....	142
<b>Tabla 4.32.</b> <i>Biodisponibilidad de actividad antioxidante (DPPH) (mM Trolox/ml) y porcentaje dializado en vino Tempranillo y Graciano (2012)</i> .....	143
<b>Tabla 4.33.</b> <i>Biodisponibilidad de actividad antioxidante (DPPH) (mM Trolox/ml) y porcentaje dializado en vino Tempranillo clarificado y sin clarificar (2013)</i> .....	144
<b>Tabla 4.34.</b> <i>Biodisponibilidad de actividad antioxidante (DPPH) (mM Trolox/ml) y porcentaje dializado en vinos Tempranillo y Graciano tratados bajo BPA y CPA (2014)</i> .....	145
<b>Tabla 4.35.</b> <i>Biodisponibilidad de polifenoles totales (mg/l) y porcentajes dializados en vino Tempranillo y Graciano (2012)</i> .....	147

<b>Tabla 4.36.</b> Biodisponibilidad de polifenoles totales (mg/l) y porcentajes dializados en vino Tempranillo clarificado y sin clarificar (2013).....	148
<b>Tabla 4.37.</b> Biodisponibilidad de polifenoles totales (mg/l) en vinos Tempranillo y Graciano tratados bajo BPA y CPA (2014).....	148
<b>Tabla 4.38.</b> Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentaje dializado en vino Tempranillo (2012).....	150
<b>Tabla 4.39.</b> Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentaje dializado en vino Graciano (2012).....	151
<b>Tabla 4.40.</b> Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentaje dializado en vinos Tempranillo, clarificados (2013).....	152
<b>Tabla 4.41.</b> Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentaje dializado en vinos Tempranillo, sin clarificar (2013).....	152
<b>Tabla 4.42.</b> Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentajes dializados en vinos Tempranillo tratados bajo BPA y CPA (2014).....	153
<b>Tabla 4.43.</b> Biodisponibilidad de compuestos fenólicos (mg/l) y porcentajes dializados en vinos Graciano tratados bajo BPA y CPA (2014).....	154

## 7.2. FIGURAS.

<b>Figura 1.1.-</b> Planteamiento y esquema del trabajo.....	5
<b>Figura 2.1.</b> El mapa muestra las primeras regiones, entre los mares Mediterráneo, Negro y Caspio, donde se arraigó la vid (Fuente: <a href="http://www.museum.upenn.edu">www.museum.upenn.edu</a> ).....	11
<b>Figura 2.2.</b> Reducción de la superficie plantada entre 2008/2012, en los principales países de la UE (en %). Fuente: OIV; elaboración OEMV.....	15
<b>Figura 2.3.</b> Producción mundial de vino 2012 (%). Fuente: OIV; elaboración OEMV.....	16
<b>Figura 2.4.</b> Consumo mundial de vino 2012 (%). Fuente: OIV; elaboración OEMV. ....	18
<b>Figura 2.5.</b> Extensión total (%) sobre el viñedo plantado de las Comunidades autónomas 2013. Fuente: OIV; elaboración OEMV.....	20
<b>Figura 2.6.</b> Racimo de Monastrell.....	25
<b>Figura 2.7.</b> Racimo de Tempranillo. ....	26
<b>Figura 2.8.</b> Racimo de Graciano.....	27
<b>Figura 2.9.</b> Ésteres hidroxicinámicos de la uva.....	36
<b>Figura 2.10.</b> Estructura del ácido gálico.....	36
<b>Figura 2.11.</b> Estilbenos de la uva. ....	37
<b>Figura 2.12.</b> Fenil Benzopirona.....	37

<b>Figura 2.13.</b> <i>Estructura de los flavanoles monómeros de la uva.</i> .....	39
<b>Figura 2.14.</b> <i>Estructura de los cuatro principales flavonoles de la uva en su forma aglicona.</i> ....	39
<b>Figura 2.15.</b> <i>Ataque de podredumbre gris sobre racimo</i> .....	40
<b>Figura 2.16.</b> <i>Ataque de mildíu sobre racimo.</i> .....	42
<b>Figura 2.17.</b> <i>Ataque de oídio sobre racimo.</i> .....	43
<b>Figura 3.1.</b> <i>Estructura molecular de kresoxim-metil</i> .....	71
<b>Figura 3.2.</b> <i>Estructura molecular de mepanipirim</i> .....	73
<b>Figura 3.3.</b> <i>Estructura molecular de metrafenona.</i> .....	74
<b>Figura 3.4.</b> <i>Estructura molecular de ciazofamida.</i> .....	75
<b>Figura 3.5.</b> <i>Estructura molecular de boscalid.</i> .....	76
<b>Figura 3.6.</b> <i>Estructura molecular de fenhexamida.</i> .....	77
<b>Figura 3.7.</b> <i>Localización geográfica de las parcelas experimentales.</i> .....	82
<b>Figura 3.8.</b> <i>Esquema de vinificación tradicional en tinto (D.O.Ca Rioja).</i> .....	85
<b>Figura 3.9.</b> <i>Esquema del método de extracción utilizado.</i> .....	86
<b>Figura 3.10.</b> <i>Esquema del ensayo de biodisponibilidad in vitro</i> .....	93
<b>Figura 4.1.</b> <i>Evolución de los residuos de fungicidas en las tres vendimias.</i> .....	102
<b>Figura 4.2.</b> <i>Valores residuales (ppm) en vinos</i> .....	102
<b>Figura 4.3.</b> <i>Valores residuales (ppm) en vino de los fungicidas añadidos en bodega.</i> .....	103
<b>Figura 4.4.</b> <i>Efecto de la clarificación en la desaparición de residuos de fungicidas.</i> .....	104
<b>Figura 4.5.</b> <i>Actividad antioxidante en los de vinos Tempranillo y Graciano con los distintos fungicidas estudiados, durante las tres vendimias.</i> .....	106
<b>Figura 4.6.</b> <i>Comparación de la actividad antioxidante media de las tres vendimias para cada variedad vino y fungicida estudiado.</i> .....	107
<b>Figura 4.7.</b> <i>Efecto de la clarificación en la actividad antioxidante de vinos Tempranillos con residuos de fungicidas.</i> .....	108
<b>Figura 4.8.</b> <i>Variación de la actividad antioxidante en vino Tempranillo respecto al vino testigo.</i> .....	108
<b>Figura 4.9.</b> <i>Variación de la actividad antioxidante en vino Graciano respecto al vino testigo.</i> ...	109
<b>Figura 4.10.</b> <i>Polifenoles totales en los vinos Tempranillo y Graciano tratados con los distintos fungicidas estudiados, durante las tres vendimias.</i> .....	111
<b>Figura 4.11.</b> <i>Efecto de la clarificación en el contenido de polifenoles totales en vino Tempranillo con residuos de fungicidas.</i> .....	112



<b>Figura 4.12.</b> <i>Variación de polifenoles totales en vino Tempranillo respecto vino testigo</i> .....	112
<b>Figura 4.13.</b> <i>Variación de polifenoles totales en vino Graciano respecto vino testigo</i> .....	113
<b>Figura 4.14.</b> <i>Correlación entre polifenoles totales y actividad antioxidante de los vinos</i> .....	114
<b>Figura 4.15.</b> <i>Porcentajes medios de compuestos fenólicos en cada una de los vinos estudiados procedentes de uvas tratadas en campo</i> .....	117
<b>Figura 4.16.</b> <i>Porcentajes medios de compuestos fenólicos en cada una de los vinos tratados en bodega antes de la vinificación</i> .....	118
<b>Figura 4.17.</b> <i>Variación de los compuestos fenólicos (%) respecto al vino control en variedad Tempranillo (2012)</i> .....	127
<b>Figura 4.18.</b> <i>Relación entre fungicidas y compuestos fenólicos, frente al vino testigo, variedad Tempranillo (2012)</i> .....	127
<b>Figura 4.19</b> <i>Variación de los compuestos fenólicos respecto al vino control, variedad Graciano (2012)</i> .....	128
<b>Figura 4.20</b> <i>Relación entre fungicidas y compuestos fenólicos, frente al vino testigo, variedad Graciano (2012)</i> .....	128
<b>Figura 4.21.</b> <i>Variación de los compuestos fenólicos respecto al vino testigo clarificado, Tempranillo (2013)</i> .....	129
<b>Figura 4.22.</b> <i>Relación entre fungicidas y compuestos fenólicos, frente al vino testigo clarificado. Tempranillo (2013)</i> .....	129
<b>Figura 4.23.</b> <i>Variación de los compuestos fenólicos respecto al vino testigo sin clarificar. Tempranillo (2013)</i> .....	130
<b>Figura 4.24.</b> <i>Relación entre fungicidas y compuestos fenólicos, frente al vino testigo sin clarificar. Tempranillo (2013)</i> .....	130
<b>Figura 4.25.</b> <i>Compuestos fenólicos en vino Tempranillo (2014)</i> .....	131
<b>Figura 4.26.</b> <i>Compuestos fenólicos en vino Graciano (2014)</i> .....	132
<b>Figura 4.27.</b> <i>Variación de compuestos fenólicos respecto al vino Tempranillo control (2014)</i> .	133
<b>Figura 4.28.</b> <i>Diferencias entre compuestos fenólicos respecto al vino Tempranillo control. (2014)</i> .....	133
<b>Figura 4.29.</b> <i>Variación de compuestos fenólicos respecto al vino Graciano control. (2014)</i> .....	134
<b>Figura 4.30.</b> <i>Diferencias entre compuestos fenólicos respecto al vino Graciano control (2014)</i> .....	134
<b>Figura 4.31.</b> <i>Porcentajes dializados en agua</i> .....	137
<b>Figura 4.32.</b> <i>Porcentajes dializados en uva</i> .....	137
<b>Figura 4.33.</b> <i>Porcentajes dializados en vino</i> .....	137

<b>Figura 4.34.</b> <i>Porcentajes de biodisponibilidad de los residuos de fungicidas en vinos (2012)</i> .....	140
<b>Figura 4.35.</b> <i>Porcentajes dializados en vinos Tempranillo sin clarificar y clarificados (2013)</i> ...	141
<b>Figura 4.36.</b> <i>Concentración de los fungicidas dializados en vinos (2014)</i> .....	142
<b>Figura 4.37.</b> <i>Porcentajes de los fungicidas dializados en vinos (2014)</i> .....	143
<b>Figura 4.38.</b> <i>Porcentajes dializados de la actividad antioxidante de vinos Tempranillo y Graciano (2012)</i> .....	144
<b>Figura 4.39.</b> <i>Porcentajes dializados de la actividad antioxidante de vinos Tempranillo clarificados y sin clarificar (2013)</i> .....	145
<b>Figura 4.40.</b> <i>Porcentajes dializados de actividad antioxidante de vinos Tempranillo y Graciano, tratados bajo BPA y CPA (2014)</i> .....	146
<b>Figura 4.41.</b> <i>Porcentajes de polifenoles totales dializados en vinos Tempranillo y Graciano (2012)</i> .....	147
<b>Figura 4.42.</b> <i>Porcentajes de polifenoles totales dializados en vinos Tempranillo clarificados y sin clarificar (2013)</i> .....	148
<b>Figura 4.43.</b> <i>Porcentajes de polifenoles totales dializados en vinos Tempranillo y Graciano tratados bajo BPA y CPA (2014)</i> .....	149
<b>Figura 4.44.</b> <i>Porcentajes de compuestos fenólicos dializados en vino Tempranillo (2012)</i> .....	151
<b>Figura 4.45.</b> <i>Porcentajes de compuestos fenólicos dializados en vino Graciano (2012)</i> .....	151
<b>Figura 4.46.</b> <i>Porcentajes de compuestos fenólicos dializados en vinos Tempranillo, clarificados y sin clarificar (SC) (2013)</i> .....	153
<b>Figura 4.47.</b> <i>Porcentajes de compuestos fenólicos dializados en los vinos Tempranillo tratados en condiciones de BPA y CPA (2014)</i> .....	154
<b>Figura 4.48.</b> <i>Porcentajes de compuestos fenólicos dializados en los vinos Graciano tratados bajo condiciones de BPA y CPA (2014)</i> .....	155



**8. SIGLAS.**

<b>AEAT</b>		Agencia Tributaria
<b>AECOSAN</b>		Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
<b>AEG</b>		Equivalentes de Ácido Gálico
<b>ANOVA</b>	<i>ANalysis Of VAriance</i>	Análisis de la varianza
<b>BASF</b>	<i>Badische Anilin- und Soda-Fabrik</i>	
<b>BOE</b>		Boletín Oficial del Estado
<b>BPA</b>		Buenas Prácticas Agrícolas
<b>CE/CEE</b>		Comunidad Europea
<b>CL</b>		Cromatografía Líquida
<b>CPA</b>		Críticas Prácticas Agrícolas
<b>CRDOC</b>		Consejo Regulador de la Denominación de Origen Calificada
<b>CV</b>		Coefficiente de Variación
<b>D.O.Ca.</b>		Denominación de Origen Calificada
<b>DAD</b>	<i>Diode-Array Detector</i>	Detector de diodos
<b>DL<sub>50</sub></b>		Dosis Letal media
<b>DO</b>		Denominación de Origen
<b>DOP</b>		Denominación de Origen Protegida
<b>DPPH</b>		2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>EE.UU.</b>		Estados Unidos
<b>EFSA</b>	<i>European Food Safety Authority</i>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>ESI</b>	<i>Electrospray Ionization</i>	Ionización por Electrospray
<b>ESYRCE</b>		Encuesta sobre Superficies y Rendimientos de Cultivos
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>	Organización para la Agricultura y la Alimentación

<b>FEGA</b>		Fondo Español de Garantía Agraria
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	Cromatografía de líquidos de alta presión
<b>IAE</b>		Ingesta Aguda Estimada
<b>IDA</b>		Ingestión Diaria Admisible
<b>IDE</b>		Ingesta Diaria Estimada
<b>IGP</b>		Indicación Geográfica Protegida
<b>ISO</b>	<i>International Organization for Standardization</i>	Organización Internacional para la Estandarización
<b>IUPAC</b>	<i>Internacional Union of Pure and Applied Chemistry</i>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>JMPR</b>	<i>Joint Meeting on Pesticide Residues</i>	
<b>LC</b>	<i>Liquid chromatography</i>	Cromatografía Líquida
<b>LD</b>	<i>Limit of Detection</i>	Límite de detección
<b>LMR</b>		Límites Máximos de Residuos
<b>LQ</b>	<i>Limit of Quantification</i>	Límite de cuantificación
<b>MAGRAMA</b>		Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente
<b>MAPA</b>		Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
<b>MRM</b>		Monitoreo Multi-Reacción
<b>MS</b>	<i>Mass Spectrometry</i>	Espectrometría de masas
<b>MS/MS</b>	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>	Espectrometría de masas en tándem
<b>NOEL</b>	<i>No Observed Effect Level</i>	Nivel de Efecto No Observado
<b>OEMV</b>		Observatorio Español del Mercado del Vino
<b>OIV</b>		Organización Internacional de la Viña y del Vino
<b>OMS</b>		Organización Mundial de la Salud
<b>PAN</b>		Plan de Acción Nacional para el uso sostenible de productos fitosanitarios
<b>PS</b>		Plazo de Seguridad
<b>PVPP</b>		Polivinilpolipirrolidona
<b>QQQ</b>		Triple Cuadrupolo
<b>QuEChERS</b>	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>	
<b>RSD</b>	<i>Relative Standard Deviation</i>	Desviación estándar relativa

---

<b>SANCO</b>	<i>The European Commission's Health and Consumers Directorate</i>	Dirección General de Sanidad y Consumo de la Comisión Europea
<b>SD</b>	<i>Standard Deviation</i>	Desviación estándar
<b>UE</b>		Unión europea
<b>UNE</b>		Una Norma Española
<b>UV</b>		Ultravioleta Visible