



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Optimización del momento de aplicación de elicitores
para mejorar la calidad de las uvas y vinos de la
variedad Monastrell

D. Diego Fernando Paladines Quezada
2021



UNIVERSIDAD DE MURCIA

“Optimización del momento de aplicación de elicitores para mejorar la calidad de las uvas y vinos de la variedad Monastrell.”

Diego Fernando Paladines Quezada

Murcia 2021

D^a Rocío Gil Muñoz, investigadora del Departamento de Desarrollo Rural, Enología y Agricultura Sostenible del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario y Profesora asociada de la Universidad de Murcia en el Departamento de Tecnología de los Alimentos, Nutrición y Bromatología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “**Optimización del momento de aplicación de elicitores para mejorar la calidad de las uvas y vinos de la variedad Monastrell**”, realizada por Don Diego Fernando Paladines Quezada bajo mi tutela, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 23 de marzo de 2021

Fdo. Rocío Gil Muñoz

Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
ESTACIÓN ENOLÓGICA
Avda. Asunción N° 24-30520 Jumilla (Murcia)
Tel. y Fax. 968 75 75 80



La ejecución de esta Tesis Doctoral ha tenido lugar en el marco del Subprograma Estatal de Formación, del Programa Estatal de Promoción del Talento y su Empleabilidad del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016, en el que D. Diego Fernando Paladines Quezada ha sido beneficiario de una beca predoctoral FPI-INIA, financiada con el 80% por el INIA (Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria) y el 20% por el IMIDA (Instituto Murciano de Desarrollo Agrario y Alimentario).

El trabajo de investigación ha sido financiado por el Proyecto de Investigación "Optimización de la calidad de vinos tintos en base a factores agronómicos y biotecnológicos", con número de referencia RTA2013-00053-C03-02, subvencionado por el INIA.

AGRADECIMIENTOS

Quiero hacer un pequeño homenaje a todas las personas que de alguna manera han participado en el desarrollo de esta tesis.

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Rocío Gil Muñoz por su confianza y dedicación desde el primer momento, por invertir gran parte de su tiempo en orientarme, y ofrecerme la oportunidad de desarrollarme como investigador durante estos años.

A mis compañeros de trabajo y al grupo de investigación de la "Estación Enológica de Jumilla", a Cayetano, Juanda, Ana, Seve, Gertrudis, David, Juan, Juan Carlos, Juan Antonio y José Ignacio, muchísimas gracias por vuestra ayuda y apoyo en varios de los análisis y en las catas de vinos, y por compartir vuestros conocimientos que me han servido para afrontar varios obstáculos. Pero sobre todo, gracias por todos los buenos momentos compartidos, sin duda habéis marcado un antes y un después en mi vida.

Gracias a José y Juaneque de la finca de Bullas, por la ayuda brindada durante la aplicación de los tratamientos y las vendimias. Trabajar con vosotros siempre fue una gozada.

Gracias a la Dra. Ana Belén Bautista y la Dra. Encarna Gomez por acogerme cálidamente durante mi primera estancia, y enseñarme el tema de las paredes celulares. Hoy en día seguimos trabajando y profundizando un poco más sobre este tema.

Gracias a las personas que me acogieron y ayudaron durante mi estancia en el "Instituto de Ciencias de la Vid y del Vivo" (ICVV) en La Rioja, la Dra. Teresa Garde, la Dra. Eva Pérez, la Dra. Ana R. Gutiérrez, Dra. Patrocinio Garijo, Dr. Javier Portú y al Dr. Gastón Gutiérrez; tenéis un centro de investigación maravilloso en el que aprendí muchísimas cosas. Gracias a Eva, Gastón y Tere por esas visitas a las bodegas y a los pueblos de La Rioja, y por supuesto, a esas noches de picoteo por la calle Laurel.

Gracias por esa cordial acogida durante mi estancia en Pontevedra a la Dra. Carmen Martínez, Dra. Susana Boso, Dr. José Luis Santiago y a los técnicos Ana, Iván y

Elena de "La Estación Biológica de Galicia". Gracias a esta colaboración, estamos implantando una nueva línea en nuestro centro, para conocer un poco más sobre las enfermedades de la vid.

Gracias por esa calurosa acogida, ayuda y grata compañía durante mis dos estancias en Montpellier, a los investigadores del "Institut National de la Recherche Agronomique" (INRA), al Dr. Thierry Doco, Dr. Rafael Apolinar, mi estimada Pascale Williams, Dra. Pascale Sarni, Dra. Véronique Cheynier, Dr. Nicolas Sommerer, Emmanuelle Meudec, Arnaud Verbaere y al Dr. Jean-Claude Boulet. Al fin y al cabo fueron 6 meses de intenso trabajo, aunque lo que más añoro son esas pausas para tomar café y algún que otro chocolate. Gracias por haber hecho de mi paso por Francia, una de las mejores experiencias de mi vida. Gracias también a H elene, Lea, Ana is y Gabriel del INRA, y Almudena Marrufo por las excursiones a esos pueblos medievales, y las cervezas con Rafa por el centro de Montpellier.

Gracias también a Pili y Andrea por esos ratitos buenos durante los congresos; y cuando con Juanda nos escap abamos de la vista de las jefas, para tomarnos algo con otros doctorandos.... Ya sabéis que las cenas de gala son lo mejor del congreso.

Y finalmente a las personas más importantes de mi vida, mi esposa Cristina y mi hijo Sebastián, gracias por vuestro apoyo siempre incondicional en este y en todos los momentos de mi vida. Quiero deciros que me siento afortunado de teneros, y me siento orgullo del gran equipo que formamos. Gracias por apoyarme, escucharme, y darme ánimos cuando lo necesitaba. Por alentarme a realizar y disfrutar las estancias lejos de casa, sabiendo lo duro que podían llegar a ser. Sois los principales pilares en mi vida, todo el esfuerzo ha sido, es y ser a por vosotros. Os amo con todo mi ser.

Muchas gracias de corazón

Quiero dedicar este trabajo:

A mi padre, Mario Arturo Paladines Ortega.

La vida te arrebató de mi lado cuando era apenas un niño. Sin embargo, los pocos años que pude disfrutar de ti, me enseñaste que sólo hace falta querer hacer algo para conseguirlo.

“La mediocridad para algunos es normal, la locura es poder ver más allá”

Charly García

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES, Y OBJETIVOS.....	1
1.1 ANTECEDENTES	3
1.2 OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN GENERAL	7
2.1 LA VARIEDAD MONASTRELL	9
2.1.1 CARACTERÍSTICAS.....	9
2.1.2 ESTUDIOS CIENTÍFICOS REALIZADOS SOBRE LA VARIEDAD MONASTRELL	10
2.1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ACTIVIDAD VITIVINÍCOLA EN LA D.O.P. JUMILLA.....	12
2.2 ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS VINOS.....	13
2.2.1 ESTRATEGIAS VITÍCOLAS	14
2.2.1.1 Prácticas de cultivo	15
2.2.1.2 Elicitores	16
2.2.1.2.1 Clasificación de los elicitores.....	19
2.2.1.2.2 Metil Jasmonato (MeJ).....	21
2.2.1.2.3 Benzotiadiazol (BTH)	22
2.2.2 ESTRATEGIAS ENOLÓGICAS.....	24
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	31
3.2 MATERIAL VEGETAL	31
3.3 CARACTERÍSTICAS EDAFOCLIMÁTICAS DEL ÁREA DE ENSAYO.....	31
3.3.1 Datos edáficos	32
3.3.2 Datos climáticos	32
3.4 TRATAMIENTOS	33

3.5	UVA	36
3.5.1	ANÁLISIS DE LA UVA EN EL MOMENTO DE LA VENDIMIA	36
3.5.2	ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	36
3.5.2.1	Grado Brix	36
3.5.2.2	pH.....	36
3.5.2.3	Acidez total	36
3.5.2.4	Acido tartárico	37
3.5.2.5	Acido L-málico	37
3.5.3	COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR	37
3.5.3.1	Aislamiento de las paredes celulares	37
3.5.3.2	Análisis de los componentes de la pared celular	39
3.5.3.2.1	Determinación de azúcares neutros.....	39
3.5.3.2.1.1	Determinación de glucosa no celulósica (hemicelulosa)	39
3.5.3.2.1.2	Determinación de glucosa total	39
3.5.3.2.1.3	Determinación de glucosa celulósica.....	40
3.5.3.2.1.4	Determinación de ácidos urónicos.....	41
3.5.3.3	Determinación de lignina.....	41
3.5.3.4	Determinación de proteína.....	42
3.5.3.5	Determinación de compuestos fenólicos	42
3.5.4	DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	44
3.5.4.1	Antocianos y flavonoles en la piel.....	44
3.5.4.2	Flavan-3-oles (proantocianidinas) en las pieles y semillas.....	45
3.5.4.3	Determinación de las proantocianidinas de uvas por cromatografía de exclusión.....	47
3.6	VINO	48
3.6.1	VINIFICACIONES	48
3.6.2	DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS EN EL VINO	48
3.6.2.1	Intensidad de color y tono.....	49
3.6.2.2	Parámetros CIELab.....	49

3.6.2.3 Índice de polifenoles totales (IPT).....	49
3.6.2.4 Antocianos totales.....	49
3.6.2.5 Parámetros de copigmentación.....	50
3.6.2.6 Grado alcohólico.....	50
3.6.2.7 pH.....	51
3.6.2.8 Acidez total.....	51
3.6.2.9 Acidez volátil.....	51
3.6.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL VINO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA.....	52
3.6.3.1 Antocianos y flavonoles en el vino.....	52
3.6.3.2 Flavan-3-oles (proantocianidinas) en el vino.....	52
3.6.3.3 Determinación de las proantocianidinas de vinos por cromatografía de exclusión.....	53
3.6.4 DETERMINACIÓN DE POLISACÁRIDOS Y OLIGOSACÁRIDOS EN EL VINO.....	53
3.6.4.1 Decoloración de muestras.....	53
3.6.4.2 Separación de oligosacáridos y polisacáridos por cromatografía de exclusión.....	54
3.6.4.3 Análisis de polisacáridos (composición en azúcares neutros) ...	56
3.6.4.3.1 Hidrólisis.....	56
3.6.4.3.2 Reducción.....	56
3.6.4.3.3 Acetilación.....	57
3.6.4.3.4 Extracción.....	57
3.6.4.3.5 Inyección en cromatografía en fase gaseosa.....	57
3.6.4.4 Análisis de oligosacáridos (análisis de la composición en azúcares neutros y ácidos por trimetilsililación).....	58
3.6.4.4.1 Metanólisis.....	58
3.6.4.4.2 Sililación.....	59
3.6.4.4.3 Inyección en cromatografía en fase gaseosa.....	59
3.7 ANÁLISIS SENSORIAL.....	61
3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62

CAPÍTULO 4. EFECTO DEL MOMENTO DE APLICACIÓN DE LOS ELICITORES SOBRE LA PARED CELULAR..... 63

4.1	LAS PAREDES CELULARES DE LA PIEL DE LA UVA	65
4.2	ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR.....	65
4.3	COMPONENTES DE LA PARED CELULAR	68
4.3.1	POLISACÁRIDOS.....	68
4.3.2	CELULOSA	68
4.3.3	PECTINAS	69
4.3.4	HEMICELULOSAS	71
4.3.5	LIGNINA	72
4.3.6	PROTEÍNAS	73
4.3.7	COMPUESTOS FENÓLICOS.....	75
4.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	76
4.4.1	RENDIMIENTO DEL AISLAMIENTO DE PAREDES CELULARES.....	76
4.4.2	COMPONENTES DE LA PARED CELULAR	78
4.4.2.1	Glucosa celulósica (celulosa).....	78
4.4.2.2	Glucosa no-celulósica (hemicelulosa)	79
4.4.2.3	Ácidos urónicos (pectinas).....	80
4.4.2.4	Lignina.....	84
4.4.2.5	Proteínas.....	85
4.4.2.6	Fenoles totales.....	86
4.4.3	ANÁLISIS MULTIVARIABLE	89

CAPÍTULO 5. EFECTO DEL MOMENTO DE APLICACIÓN DE LOS ELICITORES SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA 93

5.1	INTRODUCCIÓN.....	95
5.2	BIOSÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	95
5.3	CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS	97
5.3.1	COMPUESTOS FENÓLICOS NO FLAVONOIDES	98
5.3.1.1	Ácidos fenólicos	98

5.3.1.2 Estilbenos.....	99
5.3.2 COMPUESTOS FENÓLICOS FLAVONOIDES.....	100
5.3.2.1 Antocianos	101
5.3.2.2 Flavonoles.....	103
5.3.2.3 Flavanoles o flavan-3-oles.....	104
5.3.3 EL COLOR DEL VINO Y PARÁMETROS DE COPIGMENTACIÓN	107
5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	109
5.4.1 CALIDAD DE LA UVA EN EL MOMENTO DE LA VENDIMIA	109
5.4.2 PARAMETROS DE CALIDAD DE LOS VINOS.....	114
5.4.3 CARACTERÍSTICAS FENÓLICAS Y CROMÁTICAS DEL VINO MEDIDOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA	118
5.4.3.1 Parámetros fenólicos del vino: índice de polifenoles totales (IPT) y antocianos totales.....	118
5.4.3.2 Parámetros cromáticos del vino: Intensidad de color IC, luminosidad (L*) y tono.	121
5.4.3.3 Parámetros de copigmentación	124
5.4.4 COMPOSICION FENÓLICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN UVAS Y VINOS	128
5.4.5 CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANOS EN UVAS Y VINOS.....	128
5.4.5.1 Análisis de antocianos por HPLC en pieles de uvas en el momento de la vendimia.....	128
5.4.5.2 Análisis de antocianos por HPLC en vinos al final de la fermentación alcohólica.....	135
5.4.6 CONCENTRACIÓN DE FLAVONOLES EN UVAS Y VINOS.....	139
5.4.6.1 Análisis de flavonoles por HPLC en pieles de uvas en el momento de la vendimia.....	139
5.4.6.2 Análisis de flavonoles por HPLC en vinos al final de la fermentación alcohólica.....	143

5.4.7	CONCENTRACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN UVAS Y VINOS.....	146
5.4.7.1	Análisis de proantocianidinas por HPLC en las uvas en el momento de la vendimia.....	146
5.4.7.1.1	Análisis de proantocianidinas por HPLC en las pieles de uvas.....	146
5.4.7.1.2	Análisis de proantocianidinas por HPLC en las semillas de uvas.....	153
5.4.7.2	Análisis de proantocianidinas por HPLC en vinos al final de la fermentación alcohólica.....	159
5.4.7.3	Distribución de las masas moleculares de las proantocianidinas de las pieles, semillas y vinos.....	166
5.4.8	ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	170

CAPÍTULO 6. EFECTO DEL MOMENTO DE APLICACIÓN DE ELICITORES, SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE POLISACÁRIDOS Y OLIGOSACÁRIDOS DEL VINO 175

6.1	POLISACÁRIDOS EN EL VINO	177
6.2	POLISACÁRIDOS DE LA UVA	178
6.2.1	HOMOGALACTURONANOS (HG).....	179
6.2.2	RAMNOGALACTURONANOS: DE TIPO I (RG-I) Y DE TIPO II (RG-II).....	179
6.2.3	POLISACÁRIDOS RICOS EN ARABINOSA Y GALACTOSA (PRAGs).....	180
6.2.3.1	Polisacáridos de origen microbiológico.....	181
6.2.3.2	Manoproteínas (MPs)	182
6.3	IMPORTANCIA DE LOS POLISACÁRIDOS EN EL VINO.....	183
6.4	LOS OLIGOSACÁRIDOS EN EL VINO	184
6.5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	186
6.5.1	CONCENTRACIÓN DE POLISACÁRIDOS EN EL VINO.....	186
6.5.1.1	Concentración de residuos individuales de glicosil.....	186

6.5.1.2 Composición y concentración de las familias de polisacáridos: MPs, RG-II y PRAGs.	189
6.5.1.2.1 Manoproteínas (MPs).....	190
6.5.1.2.2 Polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs).....	191
6.5.1.2.3 Ramnogalacturonanos tipo II (RG-II).....	192
6.5.1.3 Polisacáridos totales.....	195
6.5.2 CONCENTRACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS EN EL VINO ..	196
6.5.2.1 Composición de residuos de glicosil	196
6.5.2.2 Oligosacáridos totales	199
6.5.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.....	200
6.5.4 ANÁLISIS SENSORIAL.....	202
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES	205
CAPÍTULO 8. REFERENCIAS	227

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1 Peso de piel (en g/100 gramos de uva fresca), y rendimiento del aislamiento de las paredes celulares (en mg pared celular/g de piel fresca), de uva Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017)	77
Table 4.2 Análisis multivariable de los componentes de las paredes celulares de la piel de uvas Monastrell, tratada con MeJ, BTH y MeJ+BTH, en dos momentos diferentes de maduración: envero y mitad-de-maduración, durante dos campañas (2016 y 2017).....	92
Tabla 5.1 Características físico-químicas de la uva en el momento de la vendimia durante dos campañas (2016-2017).....	113
Tabla 5.2 Análisis de los parámetros de calidad de los vinos al final de la fermentación alcohólica durante dos campañas (2016 y 2017).....	117
Tabla 5.3 Concentración de antocianos ($\mu\text{g/g}$ piel) en uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	150
Tabla 5.4 Concentración de antocianos (mg/L) medidos por HPLC, en vinos al final de la fermentación alcohólica, elaborados con uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	154
Tabla 5.5 Concentración de flavonoles ($\mu\text{g/g}$ piel) medidos por HPLC, en la piel de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	142
Tabla 5.6 Concentración de flavonoles en vinos (mg/L) de la variedad Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).	161
Tabla 5.7 Concentración de proantocianidinas medidas por HPLC en la piel de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	152
Tabla 5.8 Concentración de proantocianidinas en semillas de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	158
Tabla 5.9 Concentración de proantocianidinas (mg/L) en vinos de la variedad Monastrell, durante dos campañas (2016 y 2017).	165

Tabla 6.1 Concentración en mg/L de residuos individuales de glicosil de polisacáridos de vinos procedentes de uvas Monastrell, durante dos campañas (2016 y 2017).....	188
Tabla 6.2 Composición de residuos de glicosil de oligosacáridos (%) de vinos procedentes de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	198
Tabla 6.3 Catas triangulares de los vinos de uvas Monastrell.....	203

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Racimos de uva de la variedad Monastrell durante el envero y mitad de maduración.	10
Figura 2.2 Mapa de la Denominación de Origen Jumilla.....	13
Figura 2.3 Representación esquemática de la respuesta de defensa inducida por un elicitador.....	19
Figura 2.4 Clasificación de elicitores por su origen y naturaleza	20
Figura 3.1 Parcela de ensayo	31
Figura 3.2 Evolución diaria de precipitación total (mm) y temperaturas máximas (superiores a 30 °C), registradas sobre el área de ensayo, de los períodos comprendidos entre el inicio de envero y el momento de la vendimia, durante 2016 (A) y 2017 (B).....	33
Figura 3.3 Esquema de la aplicación de tratamientos en dos momentos de maduración de Monastrell.....	35
Figura 3.4 Etapas durante el aislamiento de paredes celulares de la piel. (1) Piel de uva liofilizada. (2) Triturado de piel de uva. (3) separación de los sólidos insolubles en alcohol. (4) Prueba de Dubois. (5) Residuos sólidos (paredes celulares).....	38
Figura 3.5 Esquema del protocolo de análisis de paredes celulares de la piel.	43
Figura 3.6 Decoloración de muestras de vino	54
Figura 3.7 Equipo de cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HRSEC).	55
Figura 3.8 Cromatograma de las fracciones de polisacáridos y oligosacáridos.	55
Figura 3.9 Esquema del análisis de polisacáridos y oligosacáridos en el vino.	60
Figura 3.10 Ficha de catas triangular	61
Figura 4.1 Diagrama de la organización de la pared celular.	67

Figura 4.2 Detalle de la molécula de celulosa	69
Figura 4.3 Concentración de glucosa celulósica (A y B), glucosa no-celulósica (C y D) y ácidos urónicos (E y F) de paredes celulares de piel de uva Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	83
Figura 4.4 Concentración de lignina (A y B), proteínas (C y D) y fenoles totales (E y F) de paredes celulares de piel de uva Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). .	88
Figura 5.1 Ruta bioquímica que conduce a la formación de los principales grupos de compuestos fenólicos solubles presentes en las uvas..	96
Figura 5.2 Ruta bioquímica de los mayores flavonoides presentes en las uvas.	96
Figura 5.3 Clasificación de los compuestos fenólicos.....	97
Figura 5.4 Estructura química de los ácidos fenólicos	98
Figura 5.5 Estructura de los principales estilbenos de <i>Vitis vinifera</i>	100
Figura 5.6 Estructura básica de los compuestos fenólicos flavonoides.....	101
Figura 5.7 Estructuras de antocianos monoglucósido y grupos acil ligados a antocianos monoglucósido en uva.	102
Figura 5.8 Estructuras de flavonoles en uva.	104
Figura 5.9 Estructura química de los flavan-3-oles en uva	105
Figura 5.10 Características fenólicas medidas por espectrofotometría en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	120
Figura 5.11 Características cromáticas medidas por espectrofotometría en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	123
Figura 5.12 Parámetros de copigmentación medidos por espectrofotometría en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	126

Figura 5.13 Concentración de antocianos medidos por HPLC en la piel de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).	133
Figura 5.14 Concentración de antocianos medidos por HPLC en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).	137
Figura 5.15 Concentración de flavonoles medidos por HPLC en la piel de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).	141
Figura 5.16 Concentración de flavonoles medidos por HPLC en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).	144
Figura 5.17 Concentración y valores de composición de proantocianidinas de la piel de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	149
Figura 5.18 Concentración y valores de composición de proantocianidinas en semillas de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	155
Figura 5.19 Concentración y valores de composición de proantocianidinas en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	162
Figura 5.20 Distribución de las masas moleculares de las proantocianidinas presentes en las pieles, semillas y vinos Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).	169
Figura 5.21 Gráfico de dispersión de componentes principales de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).	171
Figura 5.22 Contribución de las variables en el sistema de coordenadas definido por los dos primeros componentes principales. A: antocianos; F: flavonoles y P: proantocianidinas.....	171
Figura 5.23 Gráfico de dispersión de componentes principales en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	173
Figura 5.24 Contribución de las variables en el sistema de coordenadas definido por los dos primeros componentes principales. A: antocianos; F: flavonoles y P: proantocianidinas.....	173

Figura 6.1 Distintas fuentes de polisacáridos presentes en el vino.	178
Figura 6.2 Concentración en mg/L de Manoproteínas (MPs) (A y B), Polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs) (C y D) y Ramnogalacturonanos tipo II (RG-II) (E y F) en vinos procedentes de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	194
Figura 6.3 Concentración en mg/L de polisacáridos totales en vinos procedentes de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	196
Figura 6.4 Concentración en mg/L de oligosacáridos totales en vinos procedentes de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).....	199
Figura 6.5 Gráfico de dispersión de componentes principales de las 3 familias de polisacáridos (MPs, PRAGs, RG-II) y oligosacáridos totales, en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017)	201
Figura 6.6 Contribución de las variables MPs, PRAGs, RG-II y oligosacáridos totales, en el sistema de coordenadas definido por los dos primeros componentes principales....	201
Figura 6.7 Grado de diferencia percibida entre los vinos a nivel visual, olfativo y gustativo.	204

LISTADO DE ABREVIATURAS

A	Antocianos
ACP	Análisis de componentes principales
AG	Arabinogalactanos
AGP	Arabinogalactano proteínas
AJ	Ácido jasmónico
ANOVA	Análisis de la varianza
AS	Ácido salicílico
AxMA	Año x Momento de Aplicación
AxT	Año x Tratamiento
BOE	Boletín Oficial del Estado
BTH	Benzotiadiazol
CoA	Coenzima A
DOCa	Denominación de Origen Calificada
DOP	Denominación de Origen Protegida
E	Envero
ERO	Especies reactivas de oxígeno
F	Flavonoles
FA	Fermentación alcohólica
FCA	Fracción de color debida a antocianos copigmentados
FFA	Fracción de color debida a antocianos libres
FID	Detector de ionización de llama
FPP	Fracción de color debida a pigmentos poliméricos
% Gal	Porcentaje de galoilación
GC	Cromatografía de gases
gmP	Grado medio de polimerización
GPC	Cromatografía de permeación sobre gel
HG	Homogalacturonano
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HRSEC	Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución
IC	Intensidad de color
IGPs	Indicaciones Geográficas de Productos Agrícolas y Alimenticios
IMIDA	Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario.
IPT	Índice de polifenoles totales
ISO	Organización Internacional de Estandarización
L*	Luminosidad
MANOVA	Análisis multivariante de la varianza
MeJ	Metil jasmonato
MM	Mitad de maduración
MPF	Maceración prefermentativa en frío
MPs	Manoproteínas
NIR	Espectroscopía de infrarrojo cercano
OH	Grupo hidroxilo
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
P	Proantocianidinas
PRAGs	Polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa

PRG	Proteínas ricas en glicina
PRP	Proteínas ricas en prolina
RG	Ramnogalacturonanos
RG-II	Ramnogalacturonano tipo II
RP	Relacionados con patogénesis
RSA	Resistencia sistémica adquirida
RSI	Resistencia sistémica inducida
SIAM	Sistema de Información Agrario de Murcia
TxMA	Tratamiento x Momento de Aplicación
XG	Xiloglucanos

RESUMEN

La presente Tesis Doctoral forma parte del proyecto "Optimización de la calidad de vinos tintos en base a factores agronómicos y biotecnológicos", encaminado a mejorar las características funcionales y organolépticas de vinos de la Región de Murcia, especialmente de la variedad Monastrell, principal uva de vinificación de esta zona.

La principal línea de investigación se centra en el incremento de metabolitos secundarios mediante el uso de elicitores, los cuales al ser aplicados exógenamente son capaces de activar mecanismos defensivos de la planta, como la biosíntesis de polifenoles. Estudios recientes han demostrado que la aplicación de elicitores como metil jasmonato (MeJ) y benzotiadiazol (BTH), pueden aumentar la concentración de polifenoles y compuestos aromáticos en uvas de vinificación; además, estos dos compuestos tienen la ventaja de que no suponen problemas desde el punto de vista de contaminación medioambiental. Sin embargo, en la mayoría de estos estudios los tratamientos se aplicaron durante el envero, un periodo relativamente corto con cambios fisiológicos críticos en las uvas, los cuales no se producen simultáneamente y pueden variar considerablemente entre cultivares. De manera que en grandes áreas de viñedo y/o condiciones ambientales desfavorables, la aplicación puntual podría complicarse dificultando una adecuada programación de tratamientos.

Por ello, el objetivo general fue evaluar durante dos campañas consecutivas (2016-2017), el efecto de la aplicación foliar de MeJ, BTH y una combinación de ambos, en dos momentos distintos de maduración de Monastrell (envero y mitad-de-maduración), para determinar el o los tratamientos más adecuados, así como su momento óptimo de aplicación, con el fin de obtener la uva y los vinos de la mejor calidad organoléptica y funcional. Para ello, se estudió el efecto sobre los componentes estructurales de la pared celular de la piel y la composición fenólica de las uvas. Se estudió además, la liberación de polifenoles y carbohidratos complejos a los vinos, y las características sensoriales finales.

De todo este estudio, se dedujo que los tratamientos MeJ y MeJ+BTH aplicados en envero fueron los que más influyeron en la composición de las paredes celulares de la piel. Disminuyeron la concentración de hemicelulosa y derivados pécticos, e

incrementaron la concentración de lignina, proteínas y fenoles. Por otro lado, BTH aplicado en envero y mitad-de-maduración fue el único tratamiento que incrementó la concentración de celulosa en las paredes celulares de la piel.

Desde el punto de vista fenólico, el periodo más adecuado para la aplicación de elicitores fue en mitad-de-maduración, ya que las uvas presentaron una mayor cantidad de antocianos y proantocianidinas en el momento de la vendimia. No obstante, el tratamiento MeJ+BTH aplicado en envero también obtuvo resultados similares.

Por otro lado, el incremento de antocianos conseguido en las uvas debido a los tratamientos, no se reflejó en todos los vinos elaborados. Solo los vinos de uvas tratadas con BTH (envero) registraron una mayor concentración de antocianos que los vinos control. Otro efecto notorio fue la reducción en la liberación de polisacáridos procedentes de las uvas, principalmente en vinos de uvas tratadas con MeJ (ambos periodos de aplicación). La baja concentración de estos compuestos en los vinos de uvas tratadas, podrían atribuirse al incremento generalizado de lignina, proteínas y fenoles, y la reducción de derivados pécticos de las paredes celulares de la piel, confiriéndole unas características estructurales más reforzadas y dificultando la extracción de los compuestos de interés. Finalmente, el análisis sensorial reflejó que las características organolépticas de los vinos, no fueron alteradas en mayor medida por los tratamientos en campo. No obstante, los catadores manifestaron ligeras preferencias por los vinos de uvas tratadas con BTH.

Por tanto, de todo el trabajo realizado se puede concluir que los tratamientos MeJ y BTH aplicados en mitad-de-maduración serían la mejor opción para mejorar la calidad de las uvas Monastrell. El tratamiento MeJ+BTH podría ser aplicado en ambos momentos de maduración, ampliando el periodo de aplicación en caso de necesitarlo. No obstante, se recomienda un estudio más exhaustivo a nivel enológico para incrementar la máxima extracción de aquellos compuestos de interés.

ABSTRACT

This Doctoral Thesis is part of the project "Optimización de la calidad de vinos tintos en base a factores agronómicos y biotecnológicos", aimed at improving the functional and organoleptic characteristics of wines from the Region of Murcia, especially of the Monastrell variety, the main wine grape of this area.

The main line of research focuses on the increase of secondary metabolites through the use of elicitors, which when applied exogenously are capable of activating plant defensive mechanisms, such as polyphenol biosynthesis. Recent studies have shown that the application of elicitors such as methyl jasmonate (MeJ) and benzothiadiazole (BTH) can increase the concentration of polyphenols and aromatic compounds in wine grapes; in addition, these two compounds have the advantage that they do not suppose problems from the point of view of environmental contamination. However, in most of these studies, treatments were applied during veraison, a relatively short period with critical physiological changes in grapes, which do not occur simultaneously and can vary considerably among cultivars. Thus, in large vineyard areas and/or unfavorable environmental conditions, timely application could be complicated, making difficult an adequate scheduling of treatments.

Therefore, the general objective was to evaluate during two consecutive campaigns (2016-2017), the effect of foliar application of MeJ, BTH and a combination of both, at two different ripening moments of Monastrell (veraison and mid-ripening), to determine the most appropriate treatment(s), as well as their optimal time of application, in order to obtain grapes and wines of the best organoleptic and functional quality. For this purpose, the effect on the structural components of the cell wall of the skin and the phenolic composition of the grapes were studied. The release of polyphenols and complex carbohydrates into the wines and the final sensory characteristics were also studied.

From this study, it was deduced that MeJ and MeJ+BTH treatments applied at veraison had the greatest influence on the composition of the skin cell walls. They decreased the concentration of hemicellulose and pectic derivatives, and increased the concentration of lignin, proteins and phenols. On the other hand, BTH applied at veraison

and mid-ripening was the only treatment that increased the concentration of cellulose in the skin cell walls.

From the phenolic point of view, the most suitable period for the application of elicitors was mid-ripening, since the grapes presented a higher amount of anthocyanins and proanthocyanidins at the time of harvest. However, the MeJ+BTH treatment applied at veraison also showed similar results.

On the other hand, the increase in anthocyanins achieved in the grapes due to the treatments was not reflected in all the wines produced. Only the wines from grapes treated with BTH (veraison) showed a higher concentration of anthocyanins than the control wines. Another noticeable effect was the reduction in the release of polysaccharides from the grapes, mainly in wines from grapes treated with MeJ (both application periods). The low concentration of these compounds in the wines from treated grapes could be attributed to the generalized increase of lignin, proteins and phenols, and the reduction of pectic derivatives from the cell walls of the skin, giving it more reinforced structural characteristics and making the extraction of the compounds of interest more difficult.

Finally, the sensory analysis showed that the organoleptic characteristics of the wines were not altered to a greater extent by the field treatments. However, the tasters showed slight preferences for the wines from grapes treated with BTH.

Therefore, from all the work carried out, it can be concluded that MeJ and BTH treatments applied at mid-ripening would be the best option to improve the quality of Monastrell grapes. The MeJ+BTH treatment could be applied at both ripening stages, extending the application period if necessary. However, a more exhaustive study at the enological level is recommended to increase the maximum extraction of those compounds of interest.

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

1.1 ANTECEDENTES

La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro del proyecto “ Optimización de la calidad de vinos tintos en base a factores agronómicos y biotecnológicos”, encaminado a mejorar las características funcionales y organolépticas de los vinos procedentes de uvas de la Región de Murcia, y al mismo tiempo dar soluciones a ciertos problemas de contaminación ambiental, mediante la disminución o sustitución de productos fitosanitarios, a través del uso de productos alternativos más respetuosos con el medio ambiente.

Hoy en día existe un creciente interés por los compuestos fenólicos como compuestos bioactivos, ya que sus demostradas propiedades antioxidantes y antiinflamatorias pueden contribuir a la prevención de enfermedades, aportando beneficios sobre la salud humana. En este sentido, las uvas representan una de las fuentes más importantes de polifenoles para las personas, ya sea por su consumo como fruta fresca o en vinos.

Por ello, en la Región de Murcia se han llevado a cabo una serie de proyectos de investigación, en áreas como agricultura, bioquímica, genética, enología, microbiología, etc., orientados a incrementar los conocimientos sobre la variedad Monastrell (*Vitis vinifera* L.), principal uva de vinificación de esta región, con el objetivo principal de mejorar la calidad de sus uvas y vinos. Para ello se ha venido estudiando en profundidad los compuestos fenólicos y su contribución en la calidad final de estos. Por esta razón, una de las líneas de investigación se ha centrado en incrementar la concentración de polifenoles de las uvas Monastrell mediante el uso de “elicitores”; compuestos que al ser aplicados exógenamente son capaces de activar mecanismos defensivos de la planta, tales como las vías biosintéticas de los polifenoles. Estudios recientes han demostrado que la aplicación de elicitores como metil jasmonato (MeJ) y benzotiadiazol (BTH), son capaces de aumentar la concentración de antocianos, estilbenos y compuestos aromáticos en uvas de vinificación; además, estos dos compuestos no plantean problemas medioambientales de residuos, por lo que podrían considerarse una estrategia interesante en la lucha contra

la contaminación. Sin embargo, el incremento de polifenoles conseguido en las uvas no se ha visto reflejado en gran medida en los vinos elaborados.

Sumado a esto, los tratamientos de la mayoría de los estudios con elicitores en la viña se aplicaron en la época de envero, el cual es un periodo relativamente corto y en el que las uvas experimentan cambios fisiológicos críticos como el aumento de los sólidos solubles, el reblandecimiento de las bayas o el cambio de coloración. Además, estos procesos no se producen simultáneamente y pueden variar considerablemente entre los distintos cultivares. De manera que en grandes áreas de viñedo o en zonas con condiciones ambientales desfavorables, la aplicación puntual de estos elicitores podría complicarse, dificultando la implantación de un programa de tratamientos adecuado. Así mismo, se ha reportado que el incremento de polifenoles conseguido por la aplicación de elicitores, alcanza su pico máximo varios días antes de la fecha de vendimia. Por lo que se ha propuesto retrasar su aplicación hasta algunas semanas después del envero.

Dada la importancia logística y tecnológica del momento óptimo de aplicación de elicitores, sería de gran interés determinar la etapa o etapas de maduración más adecuadas de Monastrell, para favorecer la máxima acumulación de compuestos fenólicos en el momento de la vendimia.

1.2 OBJETIVOS

Por las razones antes mencionadas, el objetivo de esta Tesis Doctoral es evaluar el efecto de la aplicación foliar de dos elicitores diferentes (MeJ, BTH, y una combinación de ambos), en dos momentos distintos durante el proceso de maduración de Monastrell (envero y mitad-de-maduración), con el fin de determinar cual sería el o los tratamientos más adecuados, así como su momento de aplicación óptimo, para obtener la uva y los vinos de la mejor calidad organoléptica y funcional.

Por ello se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar el efecto de los tratamientos, así como su momento de aplicación sobre los componentes estructurales de la pared celular de la piel de las uvas Monastrell.

- Estudiar el efecto de los tratamientos, así como su momento de aplicación sobre la composición fenólica en las uvas, y comprobar como repercute en la liberación de estos compuestos en los vinos; así como en sus características sensoriales finales.
- Estudiar el efecto de los tratamientos aplicados sobre la composición de carbohidratos complejos presentes en los vinos.

CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN GENERAL

2.1 LA VARIEDAD MONASTRELL

Vitis vinifera L. cv Monastrell es una variedad de uva tinta de vinificación, cuyo cultivo se extiende por todo el litoral mediterráneo y sus principales zonas de cultivo se encuentran en Murcia y Alicante, donde es la variedad predominante en las D.O.P. de vinos de calidad de Jumilla, Yecla, Bullas y Alicante. Esta variedad está autorizada en 24 DOPs y en 23 Indicaciones Geográficas de Productos Agrícolas y Alimenticios (IGPs). Es la sexta variedad más importante en superficie cultivada en España y la cuarta de las tintas, por detrás de Tempranillo, Garnacha y Bobal, representando el 4,5 % de la superficie de viñedo total. Si consideramos la superficie en el conjunto nacional, en la Región de Murcia se cultiva el 46,4 % de la Monastrell cultivada en España. Su cultivo también está autorizado en Cataluña, Aragón, Baleares, Valencia, Andalucía, Extremadura y Castilla la Mancha (Martínez-Cutillas et al., 2018).

2.1.1 CARACTERÍSTICAS

Monastrell se encuentra perfectamente adaptada a las extremas condiciones de clima y suelo existentes en Murcia y Alicante, donde difícilmente su cultivo puede ser sustituido por otro alternativo, especialmente en las laderas con poco suelo, donde Monastrell es capaz de sobrevivir los años de fuerte sequía, con escasas producciones, para luego recuperarse en años de pluviometría más favorable (Martínez-Cutillas et al., 2018).

Las cepas de Monastrell tienen un porte erguido con sarmientos gruesos y cortos, con entrenudos de longitud media y poco ramificados; la hoja posee un limbo de forma pentagonal, con tres lóbulos marcados (D.O.P. Jumilla, 2017). Se adaptan bien, tanto a la conducción en vaso, forma de poda practicada en secano, como en espaldera cuando se cultiva con riego de apoyo o en secanos frescos. Sus racimos son de tamaño medio-pequeño y de compacidad media-alta y nacen a partir de la tercera yema (Figura 2.1). Las bayas son esféricas y de tamaño medio, de color azul-negro intenso, piel gruesa con bastante pruina y rica en antocianos, su pulpa es muy carnosa, blanda y de sabor neutro.

(Martínez-Cutillas et al., 2018). Es una variedad de gran rusticidad y elevada resistencia a la sequía, necesitando buena insolación. Posee una sensibilidad media-alta frente a mildiu y oídio, y es muy resistente a la excoriosis, podredumbre gris y polilla; y sobre todo, presenta una altísima resistencia a la filoxera (D.O.P. Jumilla, 2017).



Figura 2.1 Racimos de uva de la variedad Monastrell durante el envero y mitad de maduración.

Adelantando ligeramente la vendimia, con sus mostos se pueden elaborar excelentes rosados de un color rosa pálido, limpio y brillante, con aromas intensos a fresa, mora y regaliz, frescos, ligeros y persistentes en boca, muy agradables de tomar. Vendimiando en su momento óptimo se pueden elaborar vinos tintos jóvenes, tanto de maceración carbónica como de maceración tradicional, ricos en aromas afrutados, bien cubiertos de color, con alegres tonos violáceos y sabrosos y amplios en boca. Macerando durante más tiempo durante el proceso de fermentación, se pueden obtener vinos aptos para la crianza, que pueden ser complementados con proporciones variables de Tempranillo, Cabernet Sauvignon o Syrah, resultando vinos aromáticos, con caracteres afrutados y especiados, con cuerpo y persistentes en boca (Martínez-Cutillas et al., 2018).

2.1.2 ESTUDIOS CIENTÍFICOS REALIZADOS SOBRE LA VARIEDAD MONASTRELL

Los avances logrados como resultado de la investigación en viticultura y enología en la Región de Murcia, están alcanzando niveles destacados. Se pone de manifiesto la gran producción científica en áreas como agricultura, bioquímica, genética, enología, microbiología, etc., orientados a incrementar los conocimientos sobre la variedad

Monastrell para mejorar la calidad de las vendimias y de los vinos, haciendo hincapié en la importancia de los compuestos fenólicos en la calidad final de estos vinos.

Algunos de los estudios realizados contemplan: la cinética de diversos enzimas relacionados con los cambios de color durante la maduración de la uva y la producción de vino (Núñez-Delicado et al., 2005; Sánchez-Ferrer et al., 1988); la aplicación de técnicas de cultivo de células de vid Monastrell y los factores relacionados con el incremento de la producción de resveratrol (Calderón, Zapata, Pedreño, et al., 1994; Ros et al., 2003); la respuesta en la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de trans-resveratrol y estilbenos (Calderón, Zapata, & Ros, 1994); el empleo de la irradiación por pulsos UV de las uvas vendimiadas, para producir vinos tintos enriquecidos en estilbenos (Cantos, Espín, et al., 2003; Cantos, Tomás-Barberán, et al., 2003) y la influencia de residuos de productos fitosanitarios en la uva y el vino, sobre la cinética de fermentación y su influencia sobre el perfil aromático de los vinos (Fernández et al., 2005; Oliva et al., 1999, 2009, 2011).

En estudios más recientes, se ha abordado también el estudio de las características de la pared celular de los hollejos, y las dificultades para la extracción de los polifenoles responsables del color de los vinos (Apolinar-Valiente et al., 2010, 2017; Ortega-Regules, Ros-García, Bautista-Ortín, López-Roca, & Gomez-Plaza, 2008), así como su interacción con los polifenoles presentes en la uva (Bautista-Ortín et al., 2014, 2016) y la gestión eficiente del agua del viñedo, para optimizar el desarrollo de las plantas y la calidad de las uvas y del vino, con especial atención sobre el contenido de compuestos fenólicos (De La Hera Orts et al., 2005; Romero-Azorín et al., 2013, 2016). Además, desde el IMIDA se está desarrollando un programa de selección por medio de cruzamientos de Monastrell con otras variedades premium para obtener nuevas variedades adaptadas a las condiciones agroecológicas del sureste español (Fernández-Fernández et al., 2020; Gil-Muñoz, Moreno-Olivares, et al., 2018; Martínez-Cutillas et al., 2018). Por último, se han realizado ensayos dirigidos a incrementar la producción de compuestos fenólicos y volátiles, mediante la aplicación de elicitores en el viñedo, cuyos resultados sugieren que podrían servir para incrementar la resistencia frente a ciertos agentes y mejorar el color y el aroma de las uvas y el vino (Gil-Muñoz, Bautista-Ortín, et al., 2017; Gil-Muñoz, Fernández-Fernández, et al., 2017, 2018; Gómez-Plaza et al., 2012; Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al.,

2013; Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2013; Ruiz-García et al., 2014; Ruiz-García, Hernández-Jiménez, et al., 2012).

2.1.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ACTIVIDAD VITIVINÍCOLA EN LA D.O.P. JUMILLA

En la Región de Murcia, uno de los cultivos más destacados es el viñedo destinado a la vinificación, la cual ocupa la tercera posición en el conjunto de los cultivos leñosos, detrás de los cítricos y el almendro. Este cultivo es la base de la importante y tradicional producción de vinos que tiene su mayor expresión en los elaborados al amparo de las Denominaciones de Origen Protegidas (D.O.P.) asentadas en la Región de Murcia: Bullas, Jumilla y Yecla (Martínez-Cutillas & Riquelme, 2018).

Los ensayos de esta tesis se realizaron en la zona de producción de la D.O.P. Jumilla, la cual se encuentra situada en el extremo sureste de la provincia de Albacete, que incluye los municipios de Montealegre del Castillo, Fuentealamo, Ontur, Hellín, Albatana y Tobarra y el norte de la provincia de Murcia (Figura 2.2), con el municipio de Jumilla, que da nombre a esta Denominación de Origen Protegida. Esta zona está caracterizada por amplios valles y planicies surcados por montañas, con altitudes que oscilan entre los 320 y 900 m.s.n.m., siendo la transición entre el litoral levantino mediterráneo y la meseta castellano-manchega. Posee unas 16000 Has. de viñedo, de las cuales el 40% se encuentran situadas en el municipio de Jumilla, agrupando a casi 2000 viticultores (D.O.P. Jumilla, 2017).

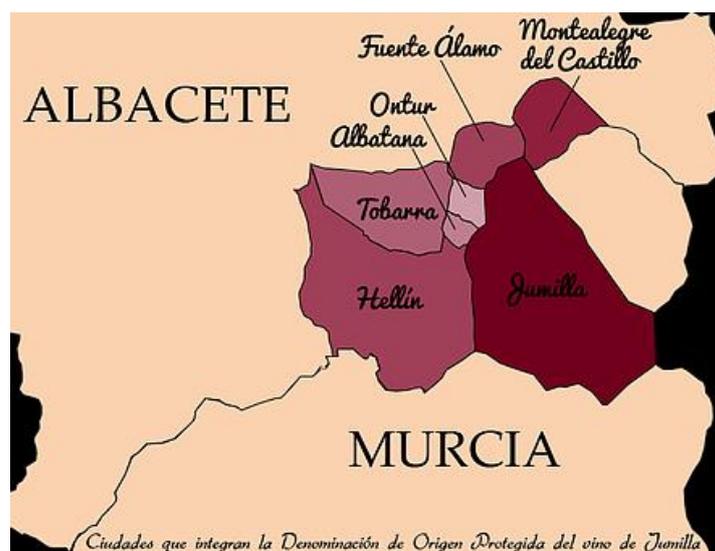


Figura 2.2 Mapa de la Denominación de Origen Jumilla. Fuente: <https://jumilladovino.wixsite.com/jumilladenominacion/d-o--jumilla>

La elaboración de los vinos protegidos se realiza con las siguientes variedades: Monastrell, Cencibel (Tempranillo), Garnacha Tintorera, Garnacha, Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah y Petit Verdot en tintas, y Airen, Macabeo, Pedro Ximenez, Malvasia, Chardonnay, Sauvignon Blanc, Moscatel de Grano Menudo y Verdejo en blancas. De estas variedades, Monastrell es la variedad predominante, ya que más del 80% del viñedo se destina a su producción. Esto viene impuesto en parte por las condiciones climáticas y orográficas de la zona, siendo esta variedad la que mejor se ha adaptado a las condiciones áridas y soleadas (D.O.P. Jumilla, 2017).

2.2 ESTRATEGIAS PARA INCREMENTAR LA CONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS VINOS

En la vitivinicultura, los compuestos fenólicos tienen una gran influencia debido a su contribución en las propiedades organolépticas y funcionales de la uva y del vino (Portu, 2017). En este sentido, las uvas representan una de las fuentes más importantes de polifenoles para las personas, ya sea por su consumo como fruta fresca o en el vino (Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2013). Sus propiedades químicas les han proporcionado un creciente interés biológico, ligado a sus potenciales efectos beneficiosos sobre la salud

(Quijada, 2014) entre los que destacan propiedades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias, cardioprotectoras y antimicrobianas (Chang et al., 2001; Cueva et al., 2012; Matic et al., 2010; Paixão et al., 2008; Wang et al., 2010).

En las bayas de uva, los polifenoles se acumulan en gran cantidad y con una composición muy diversificada entre las diferentes variedades y entornos en los que se cultivan, jugando un rol importante en el metabolismo de la vid (Castellarin et al., 2012; Flamini et al., 2010). En los vinos, estos compuestos desempeñan un papel fundamental en las características sensoriales, principalmente en el color, aroma, astringencia y amargor (Boulton, 2001; Casassa & Harbertson, 2014; Hufnagel & Hofmann, 2008); teniendo especial relevancia en los vinos tintos, por su cantidad y por la presencia de antocianos, aunque también están presentes en los vinos blancos pero en menor proporción (Ribéreau-Gayon et al., 2003). Por ello, varias de las estrategias vitícolas y enológicas empleadas hoy en día están encaminadas a incrementar la concentración de polifenoles de las uvas y los vinos.

2.2.1 ESTRATEGIAS VITÍCOLAS

Existe una serie de factores determinantes que pueden influir en la composición fenólica de la uva, tales como: factores permanentes, los cuales son fijados en el momento de la plantación del viñedo; como el clima y el microclima de la parcela, el tipo de suelo, la variedad, el portainjerto de la vid, el sistema de conducción, la orientación y la densidad de plantación. Así mismo, existen factores no permanentes relacionados con las técnicas de cultivo aplicadas a la vid (Gil-Cortiella, 2013; Martínez de Toda, 2014) y que también influirán en la concentración final encontrada de estos compuestos en las bayas.

Pero sin duda, uno de los principales factores que afectan a la producción de los componentes del metabolismo secundario de las uvas es el clima, especialmente a nivel local (Martínez de Toda, 2014). El aumento del número de días con altas temperaturas es particularmente relevante, ya que la producción y la calidad de la uva son sensibles a las olas de calor, especialmente en ciertas etapas de crecimiento, como la floración y la maduración (Teixeira et al., 2013). Los procesos metabólicos y la acumulación de azúcar, además de otros parámetros relacionados con el color y el aroma, también pueden verse

afectados o detenidos completamente por las altas temperaturas (Camps & Ramos, 2012; Coombe, 1987; Schultz, 2000). Así mismo, la radiación solar es otro de los parámetros influyentes en la síntesis de compuestos fenólicos, por su participación como fotoprotectores ante la exposición al sol (Mira de Orduña, 2010). La alta exposición a la luz puede aumentar la concentración de antocianos debido a la mayor actividad de la fenilalanina-amonio liasa (Roubelakis-Angelakis & Kliewer, 1986), por lo que se considera de gran importancia para la producción de vinos de alta calidad; sin embargo, no está claro si el efecto en la composición de la baya se debe a la luz visible o a la luz ultravioleta o a ambas (Keller & Torres-Martinez, 2004; Schreiner et al., 2012). La disponibilidad de agua y nutrientes también influyen en la acumulación de compuestos fenólicos en la baya, en el que el tipo de suelo es el factor determinante (Portu, 2017). La principal consecuencia del tipo de suelo es la capacidad de éste para retener el agua y, al mismo tiempo, mantenerse suficientemente bien drenado para evitar el encharcamiento.

Por estas y otras razones, se han estudiado durante mucho tiempo el efecto de las prácticas de cultivo y el microclima resultante alrededor de las uvas en desarrollo (Teixeira et al., 2013).

2.2.1.1 Prácticas de cultivo

Su objetivo principal es alcanzar un equilibrio adecuado entre la superficie foliar y los racimos de uva, ya que al modificar la relación superficie foliar/rendimiento y el microclima de la zona del racimo, se podría mejorar potencialmente la calidad de la uva y permitir una maduración apropiada, debido a que tiene una influencia fundamental en la biosíntesis de los metabolitos (Howell, 2001; Petrie et al., 2000). Para mantener este equilibrio, se realiza la poda de invierno y las operaciones en verde como el control de la vegetación (Holt et al., 2008; Lee & Skinkis, 2013), mientras que para el control de la producción se han desarrollado diferentes modalidades de aclareo de frutos (Gatti et al., 2012; Molitor et al., 2012; Ough & Nagaoka, 1984). Todo esto influye en la cantidad de luz interceptada, afectando a su vez a toda la capacidad fotosintética de la planta y al equilibrio hídrico (Castelan-Estrada et al., 2002; Pereira et al., 2006), repercutiendo en la concentración de sólidos solubles totales, los monómeros de flavanoles y proantocianidinas y los polímeros pigmentados (Cortell et al., 2005).

El sistema de conducción también tiene una clara influencia en la composición fenólica, y lo hace a través de la exposición de la vegetación y los racimos (Martínez de Toda, 2014). Con relación a esto, varios autores han destacado el efecto positivo de la exposición a la radiación solar sobre el contenido en antocianos y fenoles. Se considera incluso, que es más importante la exposición de los racimos que la de las hojas (Morrison & Noble, 1990; Smart et al., 1988). Su influencia en la fisiología de la vid puede determinar el estilo de vino o su tipicidad; en este sentido, existen numerosas formas de conducir las vides, pero a nivel mundial las más utilizadas son la espaldera y el vaso, las cuales buscan facilitar la mecanización, evitar enfermedades y optimizar la captación de luz (Serra et al., 2009).

Algunos de los parámetros citados anteriormente pueden ser manipulados a nuestra conveniencia para mejorar el desarrollo, la producción o incluso la calidad de las uvas, promoviendo por ejemplo una maduración adecuada para incrementar los compuestos fenólicos o volátiles, entre otras cosas. Sin embargo, no siempre es posible implantar o ejecutar algunas de estas tecnologías, ya sea por dificultades técnicas y/o por el alto coste que puede suponer la mano de obra.

Por ello, nuevas técnicas se están llevando a cabo para favorecer sobre todo la acumulación de compuestos fenólicos en las uvas, como alternativa o complemento a las técnicas anteriores. Una de las alternativas más prometedoras y que ha despertado el interés en el campo de la viticultura en los últimos años, consiste en la estimulación y/o potenciación de las rutas biosintéticas de metabolitos secundarios, por medio de la aplicación exógena de moléculas denominadas "elicitores" (Delaunoy et al., 2014; Ruiz-García & Gómez-Plaza, 2013).

2.2.1.2 Elicitores

A principios de los años 70 se descubrió que pequeñas moléculas producidas por patógenos vegetales, desencadenaban la síntesis de fitoalexinas en los tejidos vegetales que rodean el lugar de la infección; introduciéndose por primera vez el término "elicitador" (Keen, 1975). Albersheim et al. (1977), investigaron la interacción de los oligosacáridos microbianos en las plantas, y posteriormente Tran Thanh Van et al. (1985) denominaron

a estos compuestos "oligosacarinas". De esos estudios se dedujo que la "elicitación" podía utilizarse potencialmente para mejorar y ampliar la síntesis de metabolitos secundarios de las plantas, y que los elicitors podían desempeñar una función importante en las vías de biosíntesis (Radman et al., 2003).

Los elicitors o inductores se definen comúnmente como productos alternativos, con un modo de acción muy específico, capaces de estimular las respuestas de defensa o las respuestas inducidas por el estrés en las plantas (Boller & Felix, 2009; Radman et al., 2003), y ayudar a desarrollar resistencia ante un ataque posterior de un patógeno (Klarzynski & Fritig, 2001), pero por sí mismas no tienen una actividad antimicrobiana directa (Kunz et al., 1997). El proceso celular general y el principio regulador en la planta se puede resumir en base a la interacción elicitor-receptor (Figura 2.3), la cual empieza por una señal extracelular o intracelular percibida por un receptor en la membrana plasmática o endomembrana; la percepción de la señal del elicitor inicia una red de transducción de señales que conduce a la activación de la biosíntesis de *novo* de factores de transcripción, que regulan la expresión de genes biosintéticos implicados en el metabolismo secundario de las plantas (Smetanska, 2006).

Durante este proceso se generan las siguientes respuestas bioquímicas (Dörnenburg & Knorr, 1995; Radman et al., 2003):

- Unión del elicitor a un receptor de la membrana plasmática.
- Cambios en los flujos de iones a través de la membrana: entrada de Ca^{2+} al citoplasma desde el entorno extracelular y los depósitos de Ca^{2+} intracelulares; estimulación de la salida de K^+ .
- Cambios rápidos en los patrones de fosforilación de proteínas y activación de proteína quinasa, estimulación de proteína quinasa activada por mitógenos.
- Síntesis de mensajeros secundarios y diacilglicerol que median la liberación intracelular de Ca^{2+} , óxido nítrico y vía de señalización octadecanoide.
- Acidificación del citoplasma causada por la inactivación de H^+ -ATPasa y disminución de la polarización de la membrana. Se ha informado de un aumento extracelular del pH en tejidos vegetales tratados con elicitors.

- Activación de la NADPH oxidasa responsable del estrés por oxígeno reactivo y la acidificación del citosol.
- Reorganización del citoesqueleto.
- Producción de mensajeros reactivos del estrés por oxígeno, como el O₂ y el H₂O₂, que podrían tener un efecto antimicrobiano directo, además de contribuir a la generación de derivados bioactivos de ácidos grasos y participar en la reticulación de proteínas ricas en prolina unidas a la pared celular. El H₂O₂ puede actuar como un mensajero secundario y está implicado en la activación transcripcional de los genes de defensa.
- Acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (RP).
- Muerte celular en el sitio de infección (respuesta hipersensible) y cambios estructurales en la pared celular (lignificaciones de la pared celular, depósito de callos).
- Activación transcripcional de los genes de respuesta de defensa correspondientes.
- Síntesis de ácido salicílico (AS) y ácido jasmónico (AJ) como mensajeros secundarios.
- Resistencia sistémica adquirida (RSA).

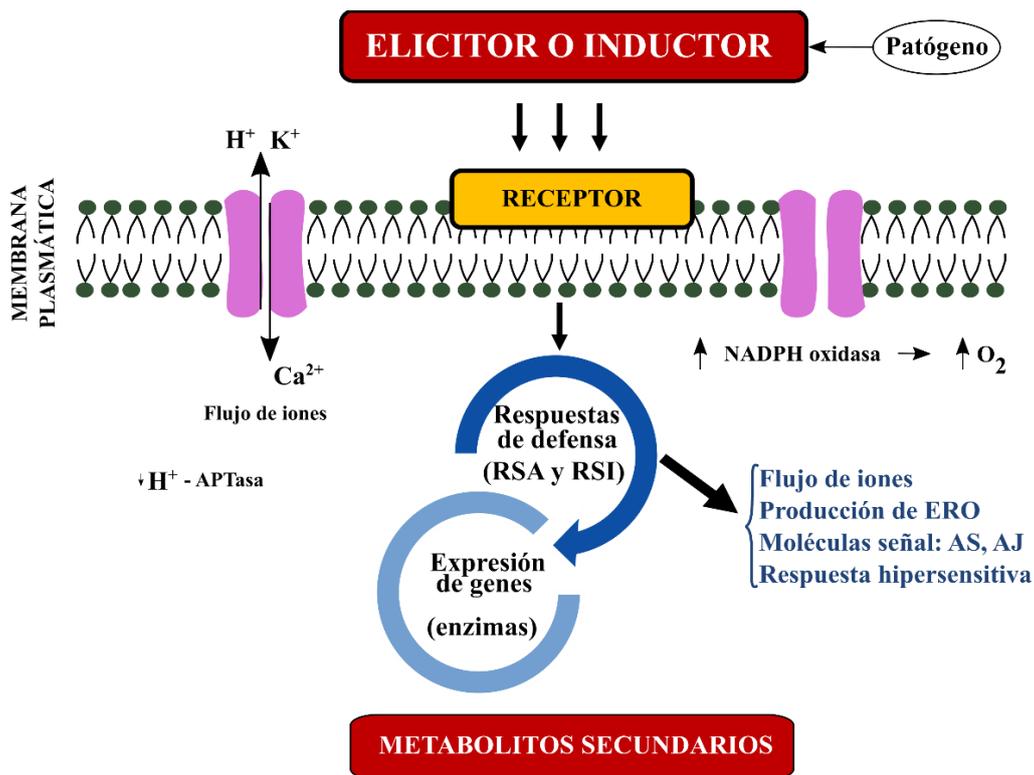


Figura 2.3 Representación esquemática de la respuesta de defensa inducida por un elicitor. Abreviaciones: RSA (Resistencia sistémica adquirida), RSI (Resistencia sistémica inducida), ERO (Especies reactivas de oxígeno), AS (Ácido salicílico), AJ (Ácido jasmónico). Adaptado de Dörnenburg & Knorr (1995).

2.2.1.2.1 Clasificación de los elicitores

Los elicitores pueden clasificarse según su origen, como exógenos y endógenos, y según su naturaleza, como bióticos y abióticos (Figura 2.4).

Los elicitores exógenos son sustancias originadas fuera de la célula de las plantas, incluyendo la reacción inmediata o a través de mediadores endógenos. Pueden ser polisacáridos (glucomanosa, glucanos, quitosano); péptidos como cationes polivalentes (monilicolina, poli-L-lisina, poliaminas, glicoproteínas); enzimas (poligalacturonasa, ácido endopoligalacturónico liasa, celulasa) y ácidos grasos (ácido araquidónico, ácido eicosapentanoico) (Namdeo., 2007). En cambio, los elicitores endógenos pueden producirse durante los procesos de envejecimiento y degradación de las plantas; e incluyen especies reactivas de oxígeno (ERO), oligosacáridos y fragmentos de proteínas (Pearce et al., 2001), y también sustancias generadas dentro de la célula vegetal, como

hormonas (por ejemplo, ácido jasmónico, ácido salicílico), galacturónidos y oligómeros de alginato (Namdeo., 2007).

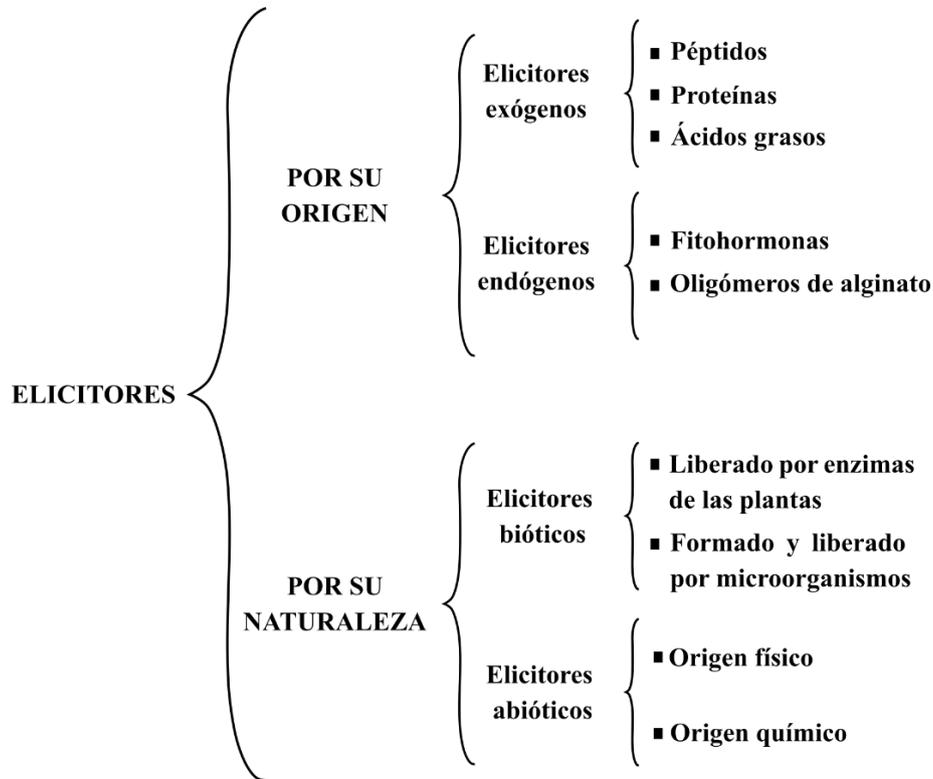


Figura 2.4 Clasificación de elicitores por su origen y naturaleza (Moreno-Escamilla et al., 2018).

Los elicitores bióticos pueden ser compuestos liberados directamente por microorganismos y reconocidos por las células de las plantas (enzimas, fragmentos de pared celular); compuestos formados por la acción de microorganismos en la pared celular de la planta (fragmentos de pectinas, etc.); compuestos formados por la acción de enzimas vegetales sobre las paredes celulares microbianas (quitosano, glucanos); o compuestos de naturaleza endógena y constitutiva, formados o liberados por la célula vegetal en respuesta a diversos estímulos (Namdeo., 2007). Si bien, los elicitores abióticos son sustancias de origen no biológico y se agrupan como factores físicos y compuestos químicos (Moreno-Escamilla et al., 2018). Existe una amplia gama de elicitores abióticos físicos como estrés osmótico, heridas, lesiones por frío, alta y baja temperatura, exposición a la luz UV, entre otros. Los elicitores abióticos químicos pueden ser compuestos procedentes de la síntesis química de otros compuestos de origen

químico, como por ejemplo las sales minerales (calcio) y las toxinas gaseosas (Ramakrishna & Ravishankar, 2011).

Varios de los tipos de elicitación nombrados anteriormente han sido probados en el campo de la vitivinicultura, con buenos resultados en la síntesis de metabolitos secundarios, como el incremento de resveratrol y picetanol en uvas Monastrell tras la irradiación con luz UV-C (Cantos, Espín, et al., 2003); o tratamientos de dióxido de carbono en postcosecha para inducir la síntesis de proantocianidinas en uvas de vinificación (Becatti et al., 2010); o el estrés osmótico (riego deficitario) que mejoró el contenido de compuestos fenólicos, también en uvas de vinificación (De La Hera Orts et al., 2005; Romero-Azorín et al., 2013, 2016). No obstante, en la presente Tesis Doctoral nos centraremos en los dos elicitores químicos objeto de nuestra investigación, el metil jasmonato y el benzotiadiazol, con la finalidad de dar continuidad a una serie de ensayos con resultados prometedores, que fueron llevados a cabo por investigadores de nuestra región, centrados principalmente en incrementar la concentración de compuestos fenólicos y aromáticos de uvas y vinos (Gil-Muñoz, Bautista-Ortín, et al., 2017; Gómez-Plaza et al., 2012, 2017; Ruiz-García et al., 2014; Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al., 2013; Ruiz-García, Hernández-Jiménez, et al., 2012; Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012, 2013).

2.2.1.2.2 Metil Jasmonato (MeJ)

El MeJ pertenece a los denominados "jasmonatos", un grupo de compuestos que son exclusivos del reino vegetal (Creelman & Mullet, 1997), y que se sintetizan en la ruta octadecanoide a partir del ácido linolénico (Vick & Zimmerman, 1984). Se ha demostrado que activan señales de transducción para la síntesis de proteínas y metabolitos secundarios de defensa, como respuesta a diferentes tipos de estrés (Uzquiza, 2014), estimulando procesos de resistencia sistémica inducida (Van Loon, 2000). Estas respuestas a los jasmonatos (endógenos o exógenos) parecen estar correlacionadas con alteraciones en la expresión genética a tres niveles: 1) inducción de la síntesis de polipéptidos específicos; 2) inhibición selectiva de la síntesis de polipéptidos existentes antes del tratamiento, y 3) retraso en la regulación de biosíntesis de proteínas a nivel general (Reinbothe et al., 1994).

En el caso particular del MeJ, aislado por primera vez en el aceite esencial de *Jasminum grandiflorum* (Demole et al., 1962), se ha demostrado que su aplicación de forma exógena en cultivos de células de vid de diferentes variedades, puede inducir la acumulación de estilbenos y la expresión de genes implicados en su biosíntesis (Belhadj et al., 2008; D'Onofrio et al., 2009; Krisa et al., 1999; Tassoni et al., 2005). También se ha observado que niveles muy bajos de MeJ, pueden incrementar la concentración de estilbenos de las hojas y las bayas, aunque hay diferencias en los niveles de concentración entre estos órganos (Larronde et al., 2003). Vezzulli et al. (2007) observaron que tratamientos con MeJ en forma de spray durante el cuajado y el envero de las bayas, y en los racimos maduros de *Vitis vinifera* cv. Barbera, aumentaron significativamente el resveratrol y la viniferina de las bayas en el momento de la vendimia. También se observó que el uso de MeJ en diferentes clones de Monastrell aumentó el contenido de antocianos, flavonoles, estilbenos y taninos de semillas y piel (Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2013). Igualmente, el tratamiento con MeJ en vides de la variedad Tempranillo, aumentó el contenido de antocianos y estilbenos en las uvas y los vinos, y mejoró las concentraciones de flavonoles en los vinos (Portu et al., 2015).

Sumado a esto, la inducción de la biosíntesis de fitoquímicos vegetales por MeJ no se limita a ciertos tipos de metabolitos, sino que induce una amplia variedad de productos vegetales, incluidos terpenoides, flavonoides y alcaloides (Sudha & Ravishankar, 2003), y las formas libres y conjugadas de poliaminas, quinonas, glucosinolatos y antioxidantes (Memelink et al., 2001).

2.2.1.2.3 Benzotiadiazol (BTH)

El BTH (ácido benzo (1,2,3) tiadiazol-7-carboxílico) es un análogo funcional del ácido salicílico, hormona endógena de las plantas que induce los genes de defensa que conducen al establecimiento de la RSA. Estos genes codifican las proteínas RP y las enzimas clave de las vías metabólicas secundarias, como la mencionada fenilalanina-amonio liasa (Friedrich et al., 1996). En 1997, los derivados del BTH fueron identificados como una nueva clase de productos químicos que estimulaban los mecanismos de defensa propios de las plantas, y para la práctica agrícola se desarrolló un producto comercial denominado "Bion®" (Kunz et al., 1997), un producto de amplio espectro y larga duración

contra diferentes patógenos de numerosas especies como el trigo, la arabidopsis, el tabaco y las judías (Iriti & Faoro, 2003).

Una gran cantidad de ensayos han sido llevados a cabo mediante la aplicación exógena de BTH sobre varios cultivos y con diversos objetivos, poniendo de manifiesto que su uso podría representar un enfoque innovador para proteger a las plantas del estrés biótico (Iriti & Faoro, 2003) y abiótico (Iriti et al., 2003), y para mejorar su valor nutracéutico (Iriti et al., 2004), provocando una respuesta bioquímica en cascada y preparando una condición de alerta fisiológica. En este contexto, se ha observado que tras la aplicación de BTH se produjeron incrementos en la actividad de la enzima fenilalanina-amonio liasa y del contenido fenólico en mangos (Zhu et al., 2008) y melocotones (Liu et al., 2005). En varios ensayos con fresas se demostraron incrementos de antocianos, de la enzima fenilalanina-amonio liasa (Cao et al., 2010, 2011), y de los flavonoles quercetina y kaempferol (Anttonen et al., 2003). Se encontraron también incrementos en el contenido fenólico total de bananas y mangos (Lin et al., 2011; Zhu & Ma, 2007).

En el campo de la viticultura se han registrado incrementos en resveratrol, antocianos, proantocianidinas y flavonoles de distintas uvas de vinificación (Fumagalli et al., 2006; Gil-Muñoz, Bautista-Ortín, et al., 2017; Iriti et al., 2004, 2005; Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012, 2013); así como el incremento en algunos compuestos volátiles, especialmente terpenos y norisoprenoides (Gómez-Plaza et al., 2012; Ruiz-García et al., 2014).

Por último, pero no por ello menos importante, debido al muy bajo riesgo toxicológico asociado con el BTH (Tomlin, 2013), y considerando que se degrada rápidamente en los tejidos de las plantas y carece de toda actividad antibiótica (Scarponi et al., 2001), su uso reduciría en gran medida el impacto ambiental de los tratamientos de los cultivos (Iriti et al., 2005).

2.2.2 ESTRATEGIAS ENOLÓGICAS

Todos los vinicultores conocen el importante papel que desempeñan los polifenoles, en la calidad visual y gustativa de los vinos tintos y su importancia durante el envejecimiento (Bautista-Ortín et al., 2005). Por consiguiente, es imprescindible que el esfuerzo invertido para incrementar la concentración de polifenoles en las uvas se vea reflejado en los vinos terminados. Por esta razón, entre los principales objetivos de las tecnologías empleadas durante la vinificación, está el obtener una mayor transferencia de compuestos aromáticos, fenólicos y carbohidratos complejos para mejorar la calidad final de los vinos (Koyama et al., 2007; Zamora, 2003).

El primer factor determinante en el grado de extracción de compuestos de la uva es el estado de madurez, ya que va a determinar el contenido potencial de polifenoles (Gil-Cortiella, 2013). En este sentido, las paredes celulares de la piel tienen una gran influencia, debido a que las sustancias fenólicas se encuentran principalmente en las vacuolas de estas células (sin incluir las variedades tintoreras), y para que se liberen es necesario que la pared celular se rompa, se degrade o al menos se desorganice aumentando la permeabilidad (Gil-Muñoz et al., 2009). A su vez, el pH y la temperatura del medio influirán de igual forma en el contenido total y la estabilidad de los compuestos solubilizados (Lasanta, 2009).

Por estas razones, diferentes metodologías han sido desarrolladas para ayudar a los vinicultores a optimizar la extracción/difusión de sustancias fenólicas en el vino, como la prolongación del tiempo de maceración, que puede dar lugar a una mayor intensidad de color y a mayores concentraciones de compuestos fenólicos, incluidos los taninos de las semillas de uva (Aron & Kennedy, 2007; Gómez-Plaza et al., 2001). La adición de enzimas pectolíticas, también pueden dar lugar a mayores concentraciones de taninos en el vino debido a la hidrólisis de las pectinas de la pared celular, aunque no conduce necesariamente a una mayor extracción de antocianos o a la mejora del color del vino (Bautista-Ortín et al., 2013; Zietsman et al., 2015). Por otro lado, la maceración carbónica, la selección de las levaduras y las prácticas de remontados y bazuqueos han dado resultados variables en función de las variedades de uva estudiadas (Sacchi et al., 2005).

Además, algunas tecnologías emergentes han sido desarrolladas en los últimos años, para incrementar la extracción de compuestos fenólicos durante la maceración. Este es el caso de la aplicación de pulsos eléctricos; se trata de un tratamiento no térmico en el que las muestras se exponen a un campo eléctrico de alta intensidad durante períodos cortos, lo que induce la formación de poros en las membranas celulares, logrando así el potencial de ruptura, aumentando su permeabilidad y potenciando el intercambio de compuestos intercelulares (Toepfl et al., 2006; Vorobiev & Lebovka, 2010). O el uso de altas presiones hidrostáticas, que han demostrado ser excelentes herramientas no dañinas e inocuas para mejorar la extracción fenólica de los hollejos de la uva, al favorecer la permeabilización de las membranas celulares (Morata et al., 2017). Otra técnica recientemente aprobada por la OIV (OIV-OENO 616, 2019) es la utilización de ultrasonidos, que se basa en el uso de ondas mecánicas de 16 a 100 kHz, para producir cambios físicos y químicos en la matriz donde se aplican (Ferraretto et al., 2013). Estudios recientes han demostrado su habilidad para extraer sustancias de interés de las células de las uvas, en combinación con enzimas pectolíticas durante la maceración (Osete-Alcaraz et al., 2019); así mismo, han logrado duplicar la concentración de taninos en los vinos y concentraciones similares de antocianinas, en menos de la mitad del tiempo de maceración (Bautista-Ortín et al., 2017).

Entre las técnicas de maceración más eficaces para mejorar el color del vino se encuentran los tratamientos térmicos, como la elevación de la temperatura de fermentación, la termovinificación y las microondas (Carew et al., 2014; Sacchi et al., 2005). El tratamiento térmico puede aumentar la extracción de antocianos, taninos, y potencialmente otros fenoles, lo que conduce a una mayor formación de pigmentos poliméricos y a mejorar el color del vino (McRae et al., 2018). También se encuentran las metodologías que utilizan la aplicación de frío, siendo las más extendidas la maceración prefermentativa en frío (MPF), la adición de nieve carbónica y la congelación del hollejo de la uva (Moreno-Pérez, 2013). Nos centraremos en la MPF, debido a que es una de las prácticas más aplicadas e investigadas, y fue la técnica utilizada para la elaboración de nuestros vinos.

El razonamiento que subyace a esta técnica afirma que durante el período prefermentativo, los compuestos fenólicos se transfieren en un ambiente libre de alcohol

(medio acuoso), desde las partes sólidas de la baya al mosto a bajas temperaturas (para evitar el inicio de la fermentación). En teoría, como resultado del prolongado período de contacto, una mayor cantidad de compuestos fenólicos estará finalmente presente en el vino. A pesar de este razonamiento, los resultados que se encuentran en la literatura son variables al aplicar esta técnica de prefermentación (Aleixandre-Tudo & du Toit, 2018).

En este sentido, se ha observado que el alcance de la MPF parece estar condicionada por varios factores como: el tipo de cultivar (Busse-Valverde et al., 2010), el grado de madurez de la uva empleada (Álvarez et al., 2006), la temperatura de la uva a la entrada en bodega (Moreno-Pérez, 2013), el método de enfriamiento (Heredia et al., 2010), como por ejemplo intercambiadores de calor, camisas de enfriamiento en los propios depósitos o el mantenimiento de los depósitos en cámaras frigoríficas (Moreno-Pérez, 2013). De igual manera, la temperatura alcanzada durante el proceso (Parenti et al., 2004), el tiempo de contacto, así como la combinación con otras técnicas de frío son determinantes en el resultado final (Aleixandre-Tudo & du Toit, 2018).

Debido a las implicaciones económicas, logísticas y de calidad que determinan la eficacia de la MPF, es importante comprender los factores que la afectan antes de decidir aplicarla (Aleixandre-Tudo & du Toit, 2018). Aquí son de gran importancia, las correlaciones entre las características de la uva (con un fuerte enfoque en la composición de la pared celular) y la eficacia de la técnica.

A la hora de valorar esa dinámica de extracción, una característica de la variedad Monastrell es la dificultad que presenta para extraer los compuestos fenólicos desde el hollejo al mosto (Gomez-Plaza et al., 2018). Varios estudios de la composición y la morfología de las paredes celulares de la piel de Monastrell, mostraron que esta estructura es más gruesa que la de Syrah y Cabernet Sauvignon (Ortega-Regules, Ros-García, Bautista-Ortín, López-Roca, & Gómez-Plaza, 2008), lo que podría explicar la dificultad de extracción de los compuestos fenólicos durante la maceración. Por ello, en los últimos años se han estudiado técnicas enológicas más contundentes para ayudar a modular el contenido de compuestos fenólicos en los vinos de Monastrell, como diferentes tiempos de maceración (Gómez-Plaza et al., 2001), el uso de la MPF, la congelación del mosto con hielo seco y el uso de enzimas de maceración (Busse-Valverde et al., 2011). Entre

ellas, la MPF ha demostrado ser un método eficaz para extraer antocianos, compuestos volátiles y proantocianidinas de manera eficiente (Álvarez et al., 2006; Busse-Valverde et al., 2011).

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio consistió en la aplicación de dos elicitores químicos, metil jasmonato y benzotiadiazol, así como una mezcla de ambos, sobre la variedad Monastrell en dos momentos diferentes del proceso de maduración, durante dos campañas consecutivas (2016 y 2017). El objetivo fue analizar su efecto sobre diferentes parámetros relacionados con la calidad de la baya, así como su repercusión sobre la calidad en los vinos elaborados.

3.2 MATERIAL VEGETAL

Los tratamientos se realizaron sobre *Vitis vinifera* L. cv Monastrell de 14 años e injertadas en portainjertos 1103-Paulsen (clon 249), conducido en espaldera y con riego por goteo. Las filas estaban dispuestas con una orientación de N-NO a S-SE, con una densidad de plantación de 3 m entre filas, y de 1,25 m dentro de la misma fila.

3.3 CARACTERÍSTICAS EDAFOCLIMÁTICAS DEL ÁREA DE ENSAYO

Los ensayos tuvieron lugar en la finca "La Solana" (x: 636.099; y: 4.249.299), de la empresa AGRIFUSA, ubicada en el paraje de la Cañada del Judío, termino municipal de Jumilla, provincia de Murcia (Sureste de España), perteneciente a la D.O.P. Jumilla (Figura 3.1).



Figura 3.1 Parcela de ensayo

3.3.1 DATOS EDÁFICOS

Los suelos predominantes del área de ensayo son del tipo pardo-calizos, mollares con costra caliza, y pedregosos, caracterizándose por tener reducidos porcentajes de materia orgánica; la textura es predominantemente limo-arenosa, de elevada permeabilidad y buena aireación, lo que unido a los altos contenidos en calcio aumentan la actividad microbiana, y como consecuencia la rápida degradación de la materia orgánica. La mayor parte de suelos que constituyen la D.O.P. Jumilla presentan un predominio de colores claros, pH moderadamente alcalino y salinidad baja, condiciones idóneas para el cultivo de la vid, debido a su mediana permeabilidad y gran capacidad de retención de agua. Así mismo, suelen ser suelos pobres en materia orgánica, (D.O.P. Jumilla, 2017).

3.3.2 DATOS CLIMÁTICOS

El clima de la zona se enmarca en el tipo "mediterráneo continentalizado, de carácter semiárido". Es característica la escasez de lluvias a lo largo del año, con un mínimo muy marcado durante el verano. Las precipitaciones se distribuyen con dos máximos anuales en las estaciones de otoño y primavera, siendo el índice pluviométrico medio de 280 mm/año. En diversas ocasiones la precipitación de un solo mes ha superado los registros de años completos, lo que es indicativo de la irregularidad y torrencialidad de las precipitaciones de esta zona. En cuanto a las temperaturas, no son uniformes en todo el ámbito territorial. La temperatura media al año es de 16 °C, pudiendo oscilar en 2-3 °C según la zona de cultivo. La diferencia térmica entre las máximas (verano, hasta 45 °C) y las mínimas (invierno, hasta -10 °C) son muy pronunciadas. El periodo de heladas abarca los meses de noviembre a marzo, pudiendo ocurrir excepcionalmente en abril y octubre. El número de horas de sol en base a la radiación global es de 3000, siendo la humedad relativa media anual del 60,4 % (D.O.P. Jumilla, 2017).

A continuación se detallan los datos climatológicos del área de ensayo, obtenidos en la estación automática JU12, Jumilla (Cañada del Judío), del Sistema de Información Agrario de Murcia (SIAM, 2019). Se elaboraron gráficas con los datos de la evolución diaria de temperaturas máximas (superiores a 30 °C) y precipitación total (mm), de los

períodos comprendidos entre el inicio de enero y el momento de la vendimia, de las dos campañas estudiadas (Figuras 3.2 A y 3.2 B).

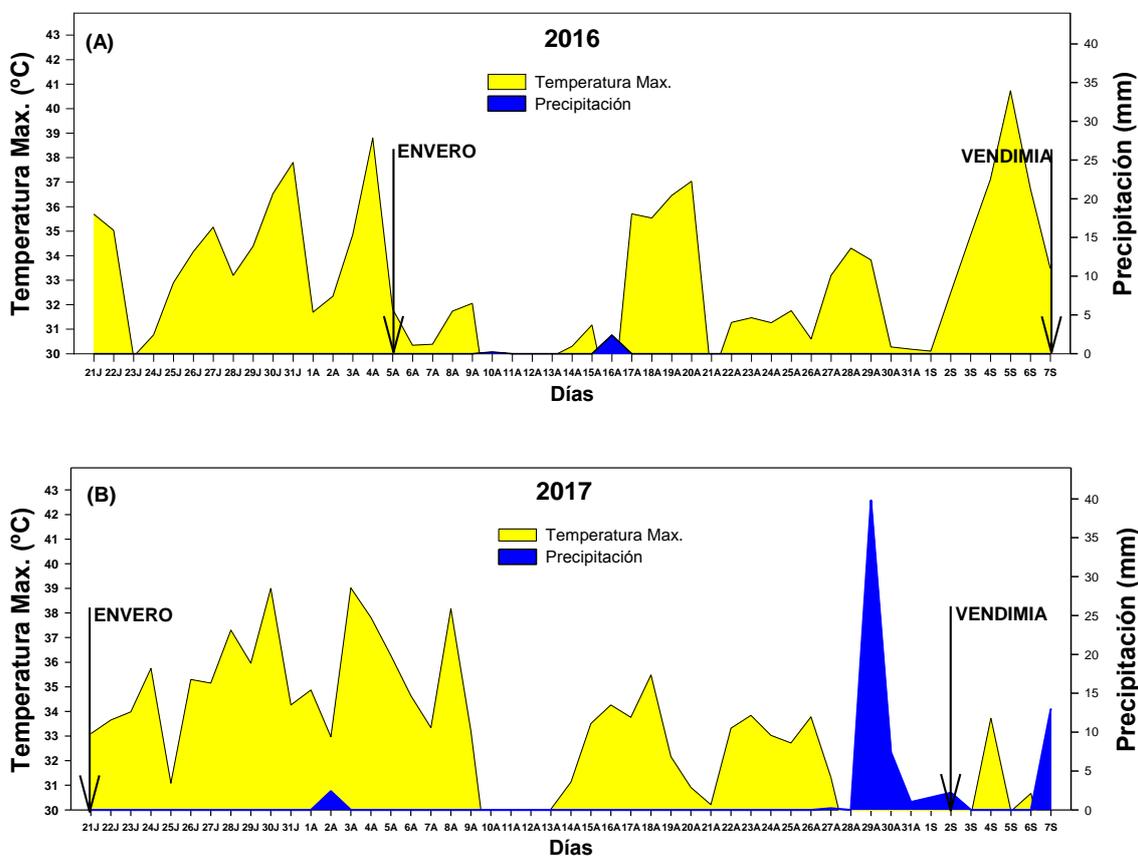


Figura 3.2 Evolución diaria de precipitación total (mm) y temperaturas máximas (superiores a 30 °C), registradas sobre el área de ensayo, de los períodos comprendidos entre el inicio de enero y el momento de la vendimia, durante 2016 (A) y 2017 (B).

3.4 TRATAMIENTOS

El experimento fue conducido en un diseño de bloques al azar, en los cuales los tratamientos fueron aplicados en 3 bloques, usando 10 viñas por bloque. Los tratamientos consistieron en la aplicación foliar en forma de spray (200 mL/planta) de una solución acuosa de los elicitores: metil jasmonato (MeJ) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), a una concentración de 10 mM; benzotiadiazol (BTH) (Ácido 1,2,3-benzotiadiazol-7-carbotioico, S-metil éster) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) a una concentración de 0,3 mM; y una mezcla de ambos (a la misma concentración de cada uno de los compuestos aplicados individualmente). Las soluciones acuosas fueron preparadas con Tween 80 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) como agente surfactante (0,1% v/v) con el fin de

asegurar una mejor absorción por parte de las hojas. Las plantas control fueron tratadas con una solución acuosa que solo contenía Tween 80.

Se realizaron aplicaciones en dos momentos del periodo de maduración (Figura 3.3): al comienzo del mismo (en envero) y a mitad de maduración (tres semanas después del inicio del envero, ya que el período medio de maduración de Monastrell en esta zona es alrededor de seis semanas). Para ambos momentos, se realizaron dos aplicaciones con una diferencia de una semana entre la primera y la última aplicación. Cuando las uvas alcanzaron la madurez tecnológica óptima, se vendimiaron a mano y se transportaron en cajas hasta la Estación Enológica de Jumilla, para su posterior vinificación.

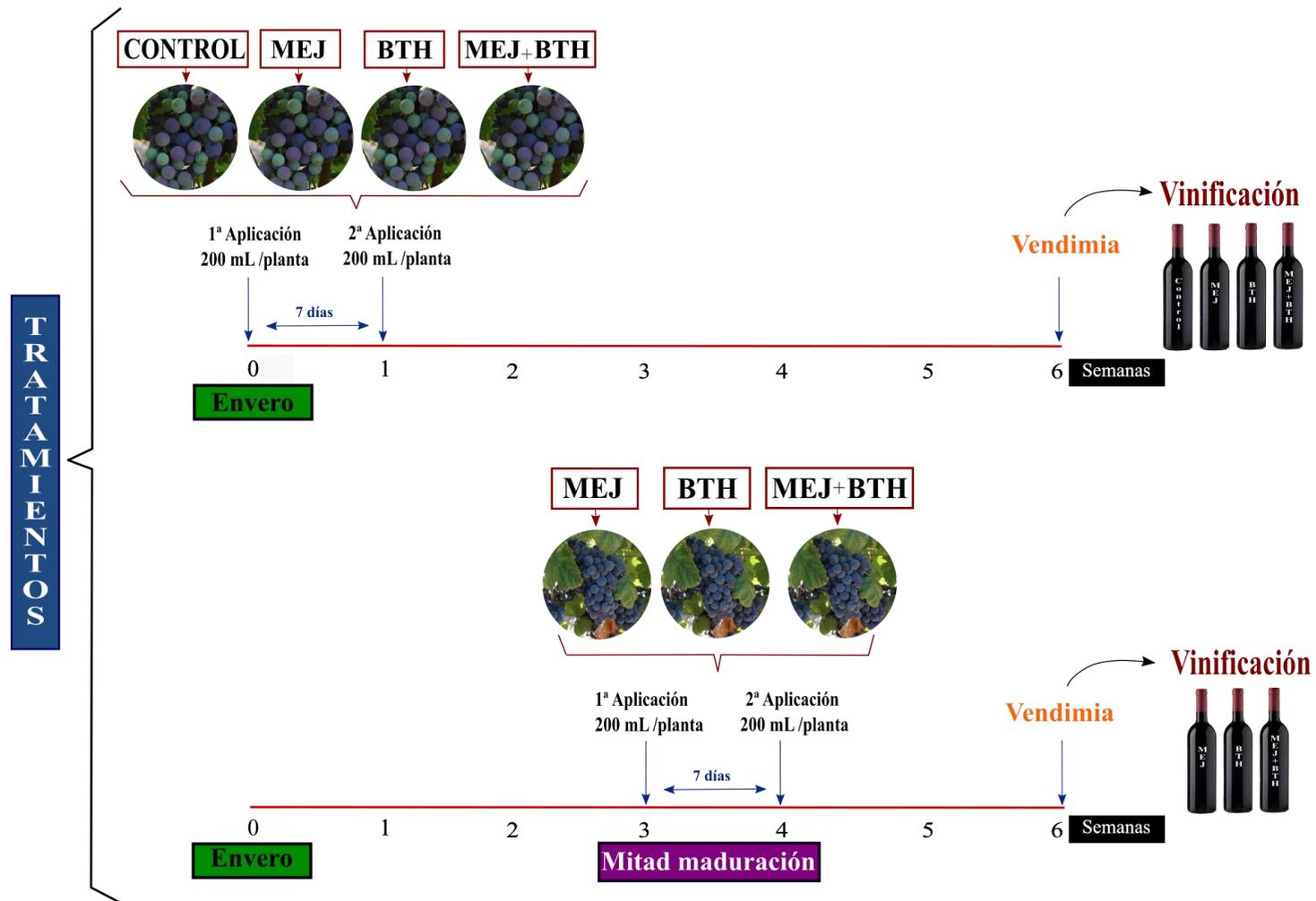


Figura 3.3 Esquema de la aplicación de tratamientos en dos momentos de maduración de Monastrell.

3.5 UVA

3.5.1 ANALISIS DE LA UVA EN EL MOMENTO DE LA VENDIMIA

A la entrada en bodega, se tomó una muestra representativa de la uva vendimiada de 300 gramos. Se cortaron los granos por el pedúnculo y se trituraron durante dos minutos usando un Robot Coupé modelo Gt 550 (Francia). El proceso de trituración se realizó a una velocidad baja con el fin de evitar la ruptura de las pepitas. El triturado se centrifugó a 4400 rpm durante 15 minutos (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania) y con el mosto obtenido se determinaron los parámetros relacionados con la madurez tecnológica: sólidos solubles totales (grados Brix), acidez total, pH, ácido L-málico y ácido tartárico. Todas las analíticas se realizaron por triplicado.

3.5.2 ANÁLISIS DE PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

3.5.2.1 Grado Brix

Fueron medidos con un refractómetro digital modelo Abbé-type (Atago RX-5000, Tokyo, Japón), con sensor de temperatura incorporado. Se realizó previamente un ajuste a cero con agua destilada.

3.5.2.2 pH

Se midió con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Herisau, Suiza), siguiendo el método oficial (OIV, 2018).

3.5.2.3 Acidez total

Fue determinada por potenciometría con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Herisau, Suiza), de acuerdo con el método oficial (OIV, 2018). Los resultados obtenidos fueron expresados en g/L de ácido tartárico.

3.5.2.4 Acido tartárico

Fue determinado con un analizador automático CETLAB 600 (Microdom, Taverny, Francia), siguiendo el método colorimétrico Rebelein modificado (Vidal & Blouin, 1978). Los resultados obtenidos fueron expresados en g/L de ácido tartárico.

3.5.2.5 Acido L-málico

Fue determinado con un analizador automático CETLAB 600 (Microdom, Taverny, Francia), utilizando un test enzimático y siguiendo el método oficial (OIV, 2018). Los resultados obtenidos fueron expresados en g/L de ácido málico.

3.5.3 COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR

3.5.3.1 Aislamiento de las paredes celulares

A la entrada en bodega, se tomó una muestra representativa de aproximadamente 200 gramos de uva. Esta cantidad va a depender de la variedad de uva, ya que se necesitan de 5-10 gramos de piel fresca y triturada. Se cortaron los granos por el pedúnculo y se congelaron a -20 °C. Las uvas congeladas se pelaron con un bisturí, separando la piel y congelándola nuevamente a -20 °C. Las pieles congeladas se trituraron con nitrógeno líquido en un molinillo (Vibratory Ball Mill Pulverisette 0, Cryo-box, FRITSCH, Alemania) para obtener las pieles en forma pulverizada.

El aislamiento de las paredes celulares de la piel de las uvas se realizó mediante el método de separación de los sólidos insolubles en alcohol descrito por de Vries et al. (1984). Este método es considerado el más óptimo para la extracción representativa de la fracción de material de la pared celular, a partir de la piel de uva (Apolinar-Valiente et al., 2010).

En primer lugar, se inactivaron las enzimas presentes en las pieles, mezclando los 5-10 g de piel triturada obtenida del paso anterior, con 50 mL de agua mili-Q en un vaso de precipitado, y se hirvieron durante 5 minutos con agitación constante en una placa

calefactora HC1202 (Bibby Sterilin, Francia). La mezcla de agua y las pieles se homogeneizó directamente en un ultraturrax Ika (T-25 D, Alemania) durante 2 minutos a 8000 rpm. A continuación, el homogeneizado se centrifugó a 11000 rpm en una centrífuga (Eppendorf 5810R, Alemania) a 25 °C durante 15 minutos. El sobrenadante se eliminó, y el residuo sólido se resuspendió en etanol al 70% (ACS, ISO, Panreac), durante 30 minutos y se mantuvo en agitación constante sobre una placa calefactora HC1202 (Bibby Sterilin, Francia), manteniendo la temperatura entre 40-50 °C. El procedimiento de extracción con etanol al 70% se repitió hasta que el sobrenadante no contuvo azúcares. La presencia de azúcares se determinó cualitativamente en el sobrenadante por el método del fenol en ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956), hasta que la coloración después de la reacción fue igual a la de un control con agua. El residuo obtenido, finalmente se lavó una vez con etanol absoluto (ACS, ISO, Panreac), y 2 veces con acetona (ACS, ISO, Panreac). Tras el lavado se dejó secar toda la noche bajo campana extractora a temperatura ambiente, y se almacenó en un desecador a vacío con gel de sílice hasta el momento de los análisis (Figura 3.4). Finalmente, se registraron los pesos de uva fresca, piel fresca y pared celular obtenida. Los análisis de los componentes de la pared celular se realizaron por cuadruplicado.

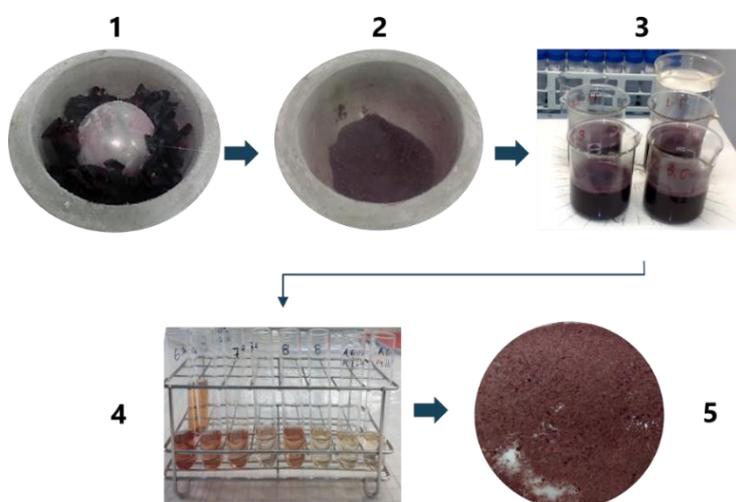


Figura 3.4 Etapas durante el aislamiento de paredes celulares de la piel. (1) Piel de uva liofilizada. (2) Trituración de piel de uva. (3) separación de los sólidos insolubles en alcohol. (4) Prueba de Dubois. (5) Residuos sólidos (paredes celulares).

3.5.3.2 Análisis de los componentes de la pared celular

A continuación, se analizaron los diferentes componentes de la pared celular: azúcares neutros (glucosa no celulósica, glucosa celulósica y ácidos urónicos), compuestos fenólicos, proteína y lignina (Figura 3.5).

3.5.3.2.1 Determinación de azúcares neutros

Los azúcares neutros presentes en la pared celular, se encuentran distribuidos en distintos componentes como la hemicelulosa (glucosa no celulósica), celulosa (glucosa celulósica), y ácidos urónicos (pectinas) (Revilla & Zarra, 2003). Dependiendo de la fracción que se quiera cuantificar, se procederá como se describe a continuación:

3.5.3.2.1.1 Determinación de glucosa no celulósica (hemicelulosa)

Para ello se realizó una hidrólisis directa sin pre-hidrólisis. Se pesaron 10 mg de pared celular en un tubo de pyrex cerrado herméticamente al que se le añadieron 4 mL de ácido sulfúrico 1M (ISO, Panreac). Después se agitó la mezcla en un vortex y se introdujo en un baño de silicona líquida (Selecta, Unitronic OR) durante 3 horas a 100 °C. Tras este paso, el tubo se dejó enfriar a temperatura ambiente, se agitó de nuevo en un vortex y se centrifugó (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania) a 4500 rpm durante 20 minutos. Parte del sobrenadante (2 mL) se llevó a un tubo de microcentrífuga con rosca, y de nuevo se centrifugó (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania) a 10000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, para la determinación de la hemicelulosa se usó el kit enzimático de determinación de D-Glucosa de R-biopharm (Darmstadt, Alemania), y la medida se realizó en un analizador automático Miura 200 (Roma, Italia), con el programa de análisis de D-Glucosa del propio equipo.

3.5.3.2.1.2 Determinación de glucosa total

La concentración de glucosa total corresponde a la glucosa presente en la celulosa y hemicelulosa de la pared celular; y es necesario realizar esta medida para posteriormente realizar el cálculo de la glucosa celulósica correspondiente con la celulosa. Para ello

utilizamos el mismo sobrenadante obtenido para la medida de glucosa no celulósica, que nos servirá para determinar la glucosa total. Además, el material insoluble obtenido nos servirá para la determinación de la lignina, cuya determinación se describe más adelante.

Para ello es necesario usar la llamada "Hidrólisis de Seaman". Esta técnica se usa para hidrolizar los enlaces glicosídicos fuertemente unidos de la celulosa, y consiste en una pre-hidrólisis seguida de una hidrólisis, tal como se describe a continuación:

- **Pre-hidrólisis:** Se pesaron 10 mg de pared celular en un tubo de pyrex cerrado herméticamente al que se le añadieron 0,45 mL de ácido sulfúrico al 72% (ISO, Panreac). Posteriormente dicha mezcla se agitó en un vortex y se introdujo en un baño de agua (Selecta, Unitronic OR) a 30 °C durante una hora.
- **Hidrólisis:** Al tubo del paso anterior, se le añadieron 4,95 mL de agua destilada, se agitó en un vortex y se introdujo en un baño de silicona líquida (Selecta, Unitronic OR) durante 3 horas a 100 °C. Posteriormente, el tubo se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 2 horas, se agitó en un vortex y se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania). Parte del sobrenadante (2 mL) se llevó a un tubo de microcentrífuga con rosca, y se centrifugó de nuevo a 10000 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania).

La glucosa total se determinó en el sobrenadante obtenido, mediante un kit enzimático de determinación de D-Glucosa de R-Biopharm (Darmstadt, Alemania), y la medida se realizó en un analizador automático Miura 200 (Roma, Italia), con el programa de análisis de D-Glucosa del propio equipo.

3.5.3.2.1.3 Determinación de glucosa celulósica

Esta fracción se calculó a partir de las fracciones de glucosa analizadas en los pasos anteriores. Es decir, la glucosa celulósica es el resultado de restar la glucosa no celulósica de la glucosa total.

3.5.3.2.1.4 Determinación de ácidos urónicos

Para determinar la concentración de ácidos urónicos (principales componentes de las pectinas), se usó el método propuesto por Scott (1979). Este método se basa en la reacción para formar un compuesto coloreado entre el ácido 5-formil-2-furanoico y el 3,5-dimetilfenol. El ácido 5-formil-2-furanoico se forma a partir de los ácidos urónicos en medio ácido. Para dicho análisis, en un tubo de ensayo se colocaron 50 μL del sobrenadante proveniente de la hidrólisis de Seaman. A continuación, se añadieron 4 mL de ácido sulfúrico 96% (ISO, Panreac) previamente enfriado, y se agitó suavemente en un vortex. Después, la muestra se mantuvo en un baño de agua (Selecta, Unitronic OR) a 70 °C durante 10 min. Tras enfriar el tubo a temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora se adicionaron 200 μL de 3,5-dimetilfenol (MercK, Darmstadt, Alemania) [0,1% en ácido acético glacial (MercK, Darmstadt, Alemania)] para formar el compuesto coloreado. Esta mezcla se agitó en un vortex y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia de la muestra se determinó por la diferencia de las absorbancias medidas a 450 y 397 nm en un espectrofotómetro UV/visible modelo 1600-UV (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japón). La lectura a 397 nm se realizó para corregir la interferencia producida por los azúcares neutros utilizando como blanco una muestra con agua. Para su cuantificación se preparó una recta de calibrado con una disolución de ácido D-(+)- galacturónico monohidrato (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) de 500 $\mu\text{moles/L}$, preparándose diluciones para obtener concentraciones entre 0 y 500 $\mu\text{moles/L}$. Las medidas se realizaron utilizando 250 μL de cada una de estas disoluciones y midiendo su absorbancia frente a un blanco con agua

3.5.3.3 Determinación de lignina.

La determinación de lignina se realizó gravimétricamente como lignina Klason. El material insoluble proveniente de la hidrólisis de Seaman se recuperó por filtración al vacío. Para ello, se traspasó todo el material insoluble desde el tubo de pirex de la hidrólisis de Seaman, hasta un equipo de filtrado al que se le había colocado un filtro de membrana PTFE de 0,45 μm de poro (Filter Lab, Barcelona, España) previamente pesado. Para facilitar el paso del agua de lavado, se añadió 5 mL de etanol absoluto (ACS, ISO, Panreac). Seguidamente, se lavó exhaustivamente el material insoluble con 1 litro de agua

mili-Q caliente (90 °C) hasta que quedó libre de ácido sulfúrico. Por último, la membrana conteniendo el material insoluble se secó en una estufa a 105 °C durante toda la noche, y finalmente se pesó. El peso del residuo se registró como lignina Klason.

3.5.3.4 Determinación de proteína

Se pesaron 10 mg de pared celular en un tubo de microcentrífuga con rosca y se agregó 1 mL de NaOH 1N (Panreac, Barcelona, España). La muestra se mantuvo 10 min a 100 °C en baño de silicona líquida (Selecta, Unitronic OR), y se dejó enfriar a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania). Posteriormente, se mezcló 30 µL del sobrenadante, 2,37 mL de agua destilada y 0,60 mL de reactivo Bradford (Bio-Rad, Munich, Alemania). La mezcla se agitó en un vortex y después de 15 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV/visible, modelo 1600-UV (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japón). El ensayo se cuantificó realizando una curva estándar con albúmina de suero bovino (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), utilizando diferentes concentraciones comprendidas entre 0 y 60 µg/mL (Bradford, 1976).

3.5.3.5 Determinación de compuestos fenólicos

Para la determinación de compuestos fenólicos se mezcló 30 µL del sobrenadante obtenido para la determinación de proteína, con 2,73 mL de agua destilada, 120 µL de NaOH 1N (Panreac, Barcelona, España), y 120 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac, Barcelona, España) diluido con agua destilada (1:1). Las muestras se agitaron en un vortex y transcurrida una hora se midió la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro UV/visible, modelo 1600-UV (Shimadzu, Corporation, Kyoto, Japón). El ensayo se cuantificó realizando una curva estándar de ácido gálico (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), utilizando diferentes concentraciones comprendidas entre 0 y 20 µg/mL (Ortega-Regules, 2006).

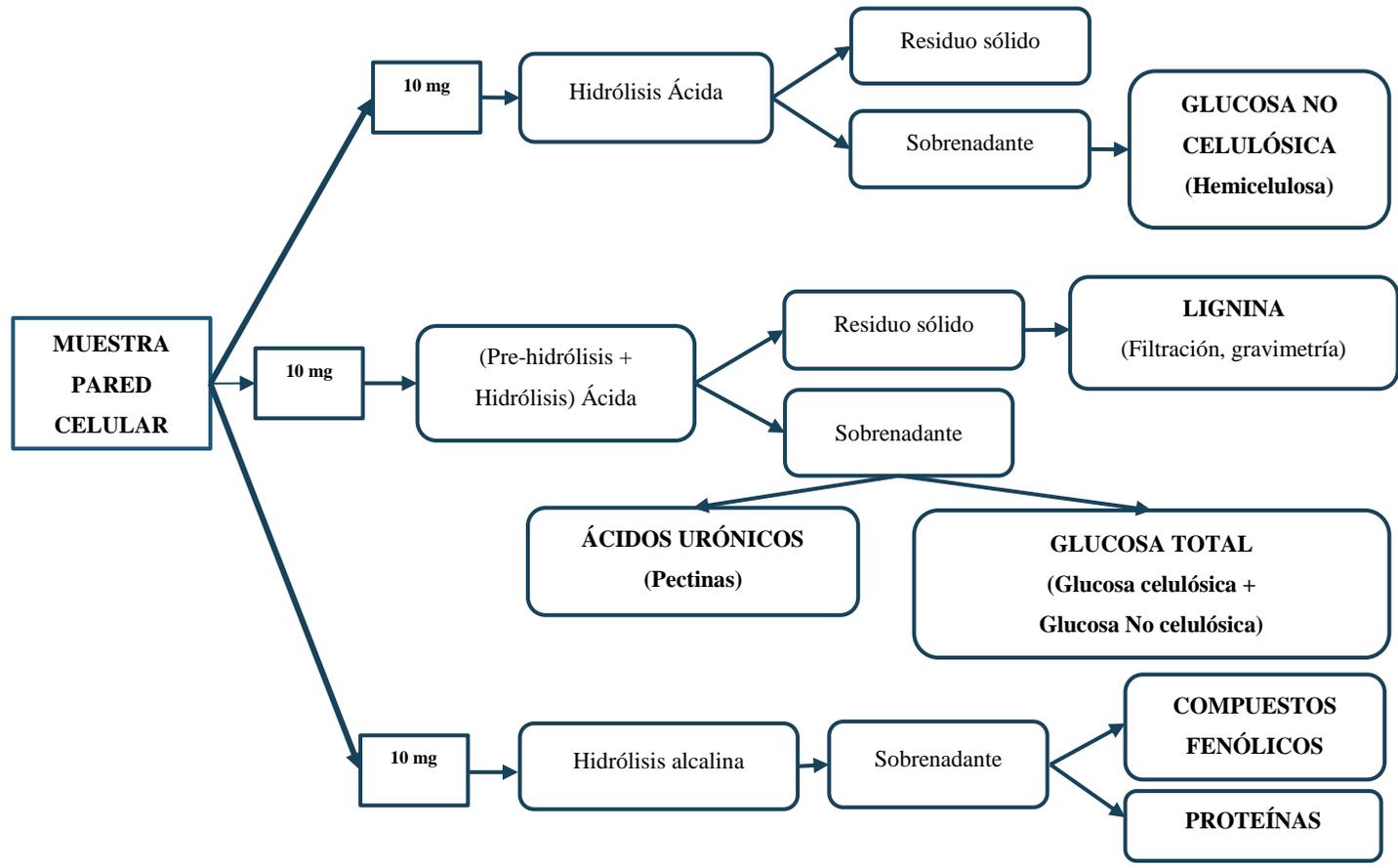


Figura 3.5 Esquema del protocolo de análisis de paredes celulares de la piel.

3.5.4 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

3.5.4.1 Antocianos y flavonoles en la piel

La extracción de antocianos y flavonoles de la piel se realizó en base al protocolo descrito por Moreno-Pérez (2013). Después de la recepción de la uva en bodega, se cogieron muestras representativas de 20 bayas c/u (3 repeticiones), y se congelaron a -20 °C para su posterior análisis. Las uvas congeladas fueron peladas con bisturí, y a las pieles obtenidas se les eliminó el exceso de humedad con papel absorbente. Posteriormente se añadió nitrógeno líquido, y fueron trituradas en un molinillo (Vibratory Ball Mill Pulverisette 0, Cryo-box, FRITSCH, Alemania). A 2 g del triturado se añadió 40 mL de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac), y se mantuvo durante 2 horas en agitación orbital (Labotron, INFORS, Suiza) a 150 rpm y 25 °C. El extracto metanólico obtenido se pasó por un filtro de nylon de 0,45 µm (Albet LabScience, Dassel). Se mezcló en un vial de 2 mL, 1 mL del extracto metanólico, con 1 mL de ácido fórmico al 5%, y se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El análisis de antocianos y flavonoles por HPLC, se realizó siguiendo el protocolo descrito por Gil-Muñoz et al. (2017). Los compuestos fueron separados en un cromatógrafo líquido Waters 2690 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 996. Se utilizó una columna de fase reversa SIELC Primesep B2 (Illinois, USA), de 4,6 mm x 250 mm, y 5,0 µm de tamaño de partícula. Las condiciones de trabajo para el análisis fueron: temperatura de 25 °C y el volumen de inyección de 20 µL. Para la separación de compuestos, se trabajó en gradiente utilizando como fases móviles una mezcla de ácido fórmico (5%) y acetonitrilo, con flujo de 1 mL/min. Los cromatogramas fueron registrados a 360 nm (flavonoles) y 520 nm (antocianos). Los antocianos fueron cuantificados usando cloruro de malvidin-3-glucósido como estándar externo (Extrasynthèse, Genay, Francia). Los flavonoles fueron registrados a 360 nm utilizando los compuestos puros como patrones externos. Los resultados se expresaron en µg/g de piel de uva para cada uno de los antocianos y flavonoles identificados.

3.5.4.2 Flavan-3-oles (proantocianidinas) en las pieles y semillas

Para la determinación de flavan-3-oles en las pieles y semillas se siguió el protocolo descrito por Moreno-Pérez (2013), basado en la reacción de floroglucinólisis para la ruptura de las cadenas de los flavanoles poliméricos (Kennedy & Taylor, 2003). Para ello se seleccionaron 10 bayas, las semillas y pieles se separaron de la pulpa con un bisturí y se congelaron a -20 °C para su posterior análisis. La extracción de los flavanoles de las pieles y las semillas se realizó con 10 mL de acetona/agua 2:1 en un agitador orbital (Labotron, INFORS, Suiza) a 200 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente. El extracto obtenido de la extracción se llevó a sequedad mediante vacío a 35 °C, usando un concentrador Centrivap (Labconco, USA) y se redisolvió posteriormente en 2 mL de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac).

En un tubo eppendorf de 2 mL se añadió una alícuota de 100 µL del extracto metanólico, y se hizo reaccionar con 100 µL de reactivo de floroglucinol [solución con HCL 0,2N en metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac), 100 g/L de floroglucinol (Sigma-Aldrich, MO, USA) y 20 g/L de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, MO, USA)]. La reacción se llevó a cabo en un baño de agua (Selecta, Unitronic OR) a 50 °C durante 20 minutos. Para detener la reacción de floroglucinólisis, se añadió 200 µL de acetato sódico 200 mM (Merck, Darmstadt, Alemania). Finalmente, se centrifugó la muestra a 13000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania) durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante fue utilizado para el análisis de flavanoles por cromatografía líquida. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

Los aductos de la floroglucinólisis se separaron para su cuantificación mediante un cromatógrafo líquido Waters 2960 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 996. Se utilizó una columna en fase reversa Atlantis dC18 (Waters, PA, USA) de 4,6 mm x 250 mm, y 5,0 µm de tamaño de partícula, dotada de una precolumna Atlantis dC18 (Waters, PA, USA), de 2,1 mm x 10 mm, y 5 µm de tamaño de partícula. Para la separación se utilizó un gradiente binario de ácido fórmico al 2% y acetonitrilo/agua/ácido fórmico (80:18:2) con un flujo de 0,8 mL/min. Los picos eluidos se monitorizaron a 280 nm. Los flavan-3-oles monómeros (-)-epicatequina, (+)-catequina y (-)-epicatequina-3-O-galato se identificaron por comparación de sus espectros UV-Vis

con los de los patrones puros (Sigma-Aldrich, MO, USA). El resto de compuestos se identificaron por comparación de sus espectros con los indicados en la bibliografía (Kennedy et al., 2001).

Para determinar los monómeros presentes de forma natural, el extracto metanólico se analizó sin realizar la reacción de floroglucinólisis. Los productos de ruptura se estimaron usando sus factores de respuesta relativos a la catequina, que se usó como patrón de cuantificación (Sigma-Aldrich, MO, USA), expresados en mmol/L.

Para calcular el grado medio de polimerización (gmP), la suma de las subunidades (monómeros y aductos de la floroglucinólisis) se dividió por la suma de solo los monómeros (en moles). El porcentaje de cada monómero se calculó respecto a la suma en moles de todos los monómeros.

El porcentaje de galoilación (%G) se obtuvo sumando el porcentaje de epicatequina-3-O-galato (monómero terminal) más el porcentaje del aducto epicatequina-3-O-galato-floroglucinol (monómero de extensión). Para expresar la masa de cada monómero, la conversión de mol a gramos se hizo sin tener en cuenta la fracción correspondiente al floroglucinol en los aductos de la floroglucinólisis. La cuantificación final de cada monómero se expresó en $\mu\text{g/g}$ piel o $\mu\text{g/g}$ semilla.

$$\text{GMP} = [\Sigma (\text{moles monómeros} + \text{moles aductos}) / \Sigma (\text{moles monómeros})]$$

$$\% \text{ monómero} = [\text{moles monómero} / \Sigma (\text{moles monómeros totales})] \times 100$$

$$\% \text{ G} = \% \text{Epicatequina-3-O-galato-floroglucinol} + \% \text{Epicatequina-3-O-galato}$$

3.5.4.3 Determinación de las proantocianidinas de uvas por cromatografía de exclusión.

Para determinar la distribución de las masas moleculares de las proantocianidinas, se usó la cromatografía de exclusión por tamaño, siguiendo el método descrito por Kennedy & Taylor (2003). Para su determinación, se aprovechó la extracción de flavonoles de pieles y semillas descrita en el apartado anterior.

Para ello, se montaron en serie dos columnas de gel, 300 x 7,5 mm, 5 μ m, de 500 Å (rango de masa molecular efectivo de hasta 4000) y de 100 Å (rango de masa molecular efectivo de 500-30000), junto con una precolumna (50 x 7,5 mm, 5 μ m) del mismo material (PolymerLabs, Amherst, MA, USA). El volumen de inyección de la muestra fue de 20 μ L, la cual se diluye en proporción 1/3 con la fase móvil del método. El método isocrático utiliza una fase móvil constituida por N, N-dimetilformamida (Panreac, Barcelona, España) conteniendo 1% de ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemania), 5% de agua y cloruro de litio 0,15 M (Panreac, Barcelona, España). El caudal fue de 1 mL/min y la temperatura de la columna de 60°C. La elución fue monitorizada a 280 nm (Jiménez-Martínez, 2018).

3.6 VINO

3.6.1 VINIFICACIONES

Durante las dos campañas y para todos los tratamientos aplicados, se realizaron microvinificaciones por triplicado en depósitos de acero inoxidable de 50 L, usando 50 kg de uvas que previamente fueron despalilladas, estrujadas y sulfatadas (8 g SO₂/100 kg). Se corrigió la acidez total con ácido tartárico hasta alcanzar un valor de 5,5 g/L, y se agregaron levaduras seleccionadas (Uvaferm VRB, Lallemand) a razón de 25 g/hL. Se realizó una maceración prefermentativa en frío, seguida de una maceración tradicional.

Los depósitos que contenían las uvas estrujadas y despalilladas se colocaron en una cámara frigorífica a 4 °C durante 10 días, transcurrido ese tiempo los depósitos fueron trasladados de nuevo a la bodega para continuar el proceso tradicional de maceración a 25±1 °C. El período de contacto de los hollejos y el mosto/vino fue de 10 días, a lo largo del cual se llevaron a cabo dos remontados al día para favorecer la maceración. Diariamente se registraron la temperatura y la densidad del mosto/vino. Al final de este período, los vinos se prensaron a 1,5 bares de presión en una prensa de membrana de 75 L. Los vinos de yema y prensa fueron mezclados y almacenados a temperatura ambiente en depósitos. Los análisis se realizaron por triplicado al final de la fermentación alcohólica.

3.6.2 DETERMINACIONES FÍSICO-QUÍMICAS EN EL VINO

Tras centrifugar y eliminar el exceso de CO₂ del vino mediante ultrasonidos, se midieron algunos parámetros enológicos relacionados con la calidad del vino, tales como: intensidad de color, tono, parámetros CIELab, índice de polifenoles totales (IPT), parámetros de copigmentación y antocianos totales. Todos los parámetros anteriores se midieron en un espectrofotómetro Shimadzu 1600-UV (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón). Además, se analizó el grado alcohólico, acidez total, pH y acidez volátil. El material utilizado para estos últimos análisis se detalla en cada apartado.

3.6.2.1 Intensidad de color y tono

La intensidad de color se determinó según Glories (1984), para lo cual se sumaron las absorbancias a 620 (componente azul), 520 (componente roja) y 420 nm (componente amarilla) del vino sin diluir, utilizando cubetas de 0,1 cm de paso óptico.

$$IC = A_{620} + A_{520} + A_{420}$$

El tono se calculó como el cociente entre las absorbancias a 420 y 520 nm (Sudraud, 1958).

$$\text{Tono} = A_{420} / A_{520}$$

3.6.2.2 Parámetros CIELab

Los parámetros CIELab se obtuvieron mediante la medida de la absorbancia en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 380 y 780 nm, con cubetas de 1 mm de paso óptico y referidas a un observador de 10° e iluminante D65. Para ello, el espectrofotómetro estaba conectado a un ordenador con un programa específico de espectrometría (UVProbe, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japón) que realizó el cálculo directo de los siguientes parámetros L*, a*, b*, C* y H*.

3.6.2.3 Índice de polifenoles totales (IPT)

Se obtuvo por lectura de la absorbancia a 280 nm con cubetas de 1 cm de paso óptico del vino diluido 100 veces con agua destilada.

$$IPT = A_{280} \times 100$$

3.6.2.4 Antocianos totales

El valor de los antocianos totales se midió mediante la adición de 0,5 mL de vino a 20 mL de HCl 0,1 N, transcurridos 30 min se lee el valor de la absorbancia a 520 nm (Cayla & Cotterreau R., 2002).

$$\text{Antocianos (mg/L)} = A_{520} * 22,76 * \text{dilución}$$

3.6.2.5 Parámetros de copigmentación

El efecto de la copigmentación fue estimado por la comparación de la absorbancia a 520 nm, de muestras de vino a las que se les adicionó acetaldehído, vino sintético y dióxido de azufre, según el método descrito por Levenson & Boulton (2004).

A^{acet} : En un tubo de ensayo se mezclaron 2 mL del vino a analizar y 20 μL de acetaldehído al 10% (Panreac, Barcelona, España), se agitó inmediatamente y después de 45 minutos se leyó la absorbancia a 520 nm en cubetas de 1 mm de paso óptico.

A^{20} : En un tubo de ensayo se mezclaron 200 μL del vino a analizar y 3,8 mL de vino sintético [24 mL de etanol absoluto (ACS, ISO, Panreac), 176 mL de agua destilada y 0,5 g de bitartrato potásico (ACS, ISO, Panreac) ajustando el pH a 3,6]. Se agitó inmediatamente y después de 10 minutos se leyó la absorbancia a 520 nm en cubetas de 1 cm de paso óptico.

A^{SO_2} : En un tubo de ensayo se mezclaron 2 mL del vino a analizar y 160 μL de SO_2 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) al 5%. Se agitó inmediatamente y después de 60 minutos se leyó la absorbancia a 520 nm en cubetas de 2 mm de paso óptico.

Con las absorbancias medidas se calcularon los siguientes parámetros:

$$\text{FCA (Fracción de color debida a antocianos copigmentados)} = (A^{\text{acet}} - A^{20}) / A^{\text{acet}}$$

$$\text{FFA (Fracción de color debida a antocianos libres)} = (A^{20} - A^{\text{SO}_2}) / A^{\text{acet}}$$

$$\text{FPP (Fracción de color del vino a pigmentos poliméricos)} = A^{\text{SO}_2} / A^{\text{acet}}$$

3.6.2.6 Grado alcohólico

El grado alcohólico se midió como la proporción en tanto por ciento en volumen, (% vol.) de alcohol que contiene un vino, medido a 20° C. Su determinación se llevó a cabo directamente sobre el vino (sin necesidad de destilar) mediante espectroscopía de

infrarrojo cercano (NIR) con un analizador Alcolyzer Wine (Anton Paar® GmbH, Graz, Austria).

3.6.2.7 pH

El pH se midió con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Herisau, Suiza), siguiendo el método oficial (OIV, 2018).

3.6.2.8 Acidez total

Fue determinada por potenciometría con un valorador automático Metrohm modelo 686 (Metrohm, Herisau, Suiza), de acuerdo con el método oficial (OIV, 2018). Los resultados obtenidos fueron expresados en g/L de ácido tartárico.

3.6.2.9 Acidez volátil

La acidez volátil fue determinada de acuerdo con el método oficial automatizado de flujo continuo (OIV, 2018). Se basa en la microdestilación bajo corriente de nitrógeno, de los ácidos volátiles de la serie acética en un medio ácido y la posterior reacción del destilado con un reactivo redox (yoduro potásico/yodado potásico); lo que genera la liberación de yodo, cuya absorbancia es medida a 420 nm. En la metodología descrita, el ácido láctico se rectifica durante la microdestilación y el dióxido de azufre es oxidado a ácido sulfúrico por el peróxido de hidrógeno y es eliminado antes de la etapa de destilación, por lo que ambas sustancias no están incluidas en la cuantificación de la acidez volátil. Los resultados se expresan en g/L de ácido acético.

3.6.3 DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL VINO POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

3.6.3.1 Antocianos y flavonoles en el vino

La identificación y cuantificación de los antocianos y flavonoles presentes en el vino, se efectuó por inyección directa de la muestra de vino previamente filtrada (filtro de nylon de 0,45 μm , Albet LabScience, Dassel). Se usó un cromatógrafo líquido Waters 2690 (Waters, PA, USA), equipado con un detector diodo-array Waters 996. La columna utilizada fue una CORTECS® Shield RP18 (Crawford Scientific, Strathaven, Reino Unido), de 150 x 0,46 mm, y 2,7 μm de tamaño de partícula. El análisis se realizó a temperatura ambiente, con volumen de inyección de muestra de 20 μL . Se usaron como fases móviles ácido fórmico al 4,5% y acetonitrilo, con un flujo de 0.8 mL/min. La identificación y cuantificación de los antocianos y flavonoles se realizaron según Gil-Muñoz et al. (2017).

3.6.3.2 Flavan-3-oles (proantocianidinas) en el vino

Para la determinación de flavan-3-oles en vino, se siguió nuevamente el método basado en la reacción de floroglucinólisis para la ruptura de las cadenas de los flavanoles poliméricos (Kennedy & Taylor, 2003). Para la preparación de las muestras de vino, se utilizó el método descrito por Moreno-Pérez (2013). Se llevó a sequedad 5 mL de vino en un concentrador Centrivap (Labconco, USA). El extracto seco obtenido se redisolvió en 3 mL de agua mili-Q. Posteriormente, el extracto diluido se pasó a través de un cartucho SEP-PAK C18 (Vac 6 cc 1g) (Waters, Mildford, USA) previamente acondicionado con 10 mL de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac), seguidos de 10 mL de agua mili-Q. Posteriormente, se pasó por el cartucho los 3 mL de extracto redisolto. A continuación, se lavó el cartucho con 20 mL de agua mili-Q, y después se eluyeron los taninos con 10 mL de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac), que se llevaron nuevamente a sequedad en un concentrador Centrivap (Labconco, USA). Finalmente, el residuo seco se redisolvió en 1 mL de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac) y se pasó a un vial de 2 mL para su análisis por cromatografía líquida. La

separación, identificación y cuantificación de los diferentes compuestos en el extracto metanólico, se realizó como en el análisis de flavanoles de pieles y semillas (Apartado 3.2.7.2).

3.6.3.3 Determinación de las proantocianidinas de vinos por cromatografía de exclusión

Para determinar la distribución de las masas moleculares de las proantocianidinas, se usó la cromatografía de exclusión por tamaño, también llamada cromatografía de permeación sobre gel (GPC), siguiendo el método descrito por Kennedy & Taylor (2003). Para su determinación, se aprovechó la extracción de flavanoles de vinos descrita en el apartado anterior. Para su análisis se siguió el método descrito para las pieles y semillas (Apartado 3.5.4.3). El volumen de inyección de la muestra fue de 20 μ L, diluida en proporción 1/3 con la fase móvil del método.

3.6.4 DETERMINACIÓN DE POLISACÁRIDOS Y OLIGOSACÁRIDOS EN EL VINO

La separación, purificación y análisis de polisacáridos y oligosacáridos del vino, se realizó siguiendo los protocolos descritos por varios autores (Apolinar-Valiente, 2011; García et al., 2017; Martínez-Lapuente et al., 2018; Quijada-Morín et al., 2014). El protocolo consta de varios pasos: decoloración de muestras, separación de polisacáridos y oligosacáridos por cromatografía de exclusión, liofilización de las fracciones y análisis por separado de los componentes de cada fracción (Figura 3.9)

3.6.4.1 Decoloración de muestras

Se prepararon columnas de poliamida CC6 de tamaño de partícula 0,05-0,16 mm (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), de volumen 3,5 mL en puntas de pipeta de 5 mL. A continuación, las columnas fueron equilibradas con NaCl 1M (Merck, Darmstadt, Alemania), y seguidamente se pasaron 5 mL de vino (Figura 3.6). Se recogió el líquido que no fue retenido por la columna, el cual contenía los carbohidratos totales del vino. La

fracción eluida se concentró al vacío usando un evaporador rotativo (Buchi, Suiza) y el extracto seco se redisolvió en 2 mL de agua mili-Q.



Figura 3.6 Decoloración de muestras de vino

3.6.4.2 Separación de oligosacáridos y polisacáridos por cromatografía de exclusión

Para la separación de los carbohidratos totales en oligosacáridos y polisacáridos, se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HRSEC). Para ello la muestra de 2 mL de los carbohidratos totales obtenidos tras la decoloración, se analizó en un sistema compuesto por un inyector de muestreo de reodimio con un circuito de 2 mL, una bomba inteligente 301 (FLOM, Francia) y un colector de fracciones 920 GE Healthcare (Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA). La elución se realizó en una columna Superdex-30 HR 60 x 1,6 cm (Pharmacia, Suecia) con una precolumna (0,6 x 4 cm) equilibrada a 1 ml/min con formiato de amonio 30 mM, pH 5,6 (Merck, Darmstadt, Alemania). La elución de polisacáridos y oligosacáridos se controló con un índice de refracción RI 101 (Shodex Showa Denko, Japón) combinado con el software Chromeleon (Dionex, Sunnyvale, CA).

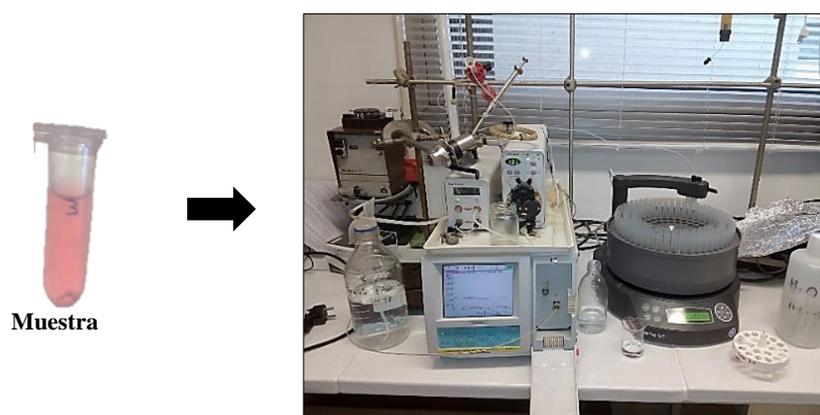


Figura 3.7 Equipo de cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (HRSEC).

Las fracciones de polisacáridos y oligosacáridos fueron recogidas y separadas en un colector de fracciones (Figura 3.7). La fracción de polisacáridos se eluyó entre 45 y 60 min (Figura 3.8), y se unieron para obtener un único residuo; mientras que la fracción de oligosacáridos se eluyó entre 61 y 96 min, y al igual que los polisacáridos, se unieron para obtener un único residuo.

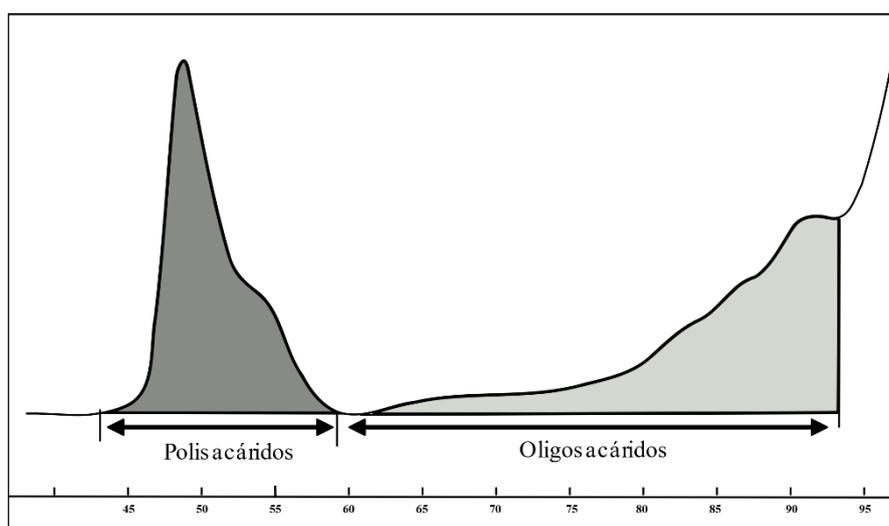


Figura 3.8 Cromatograma de las fracciones de polisacáridos y oligosacáridos.

Para eliminar completamente la sal de formiato de amonio de las fracciones aisladas, éstas se secaron por liofilización durante cuatro veces consecutivas; es decir, las muestras se liofilizaron, se redisolviéron en agua mili-Q y se volvieron a liofilizar, así hasta cuatro veces. Finalmente, cada fracción fue recuperada con 1 mL de agua mili-Q.

3.6.4.3 Análisis de polisacáridos (composición en azúcares neutros)

La composición de polisacáridos se estimó a partir de la concentración de residuos individuales de glicosil, determinados por GC-MS después de la hidrólisis, reducción, acetilación y extracción de la muestra (Apolinar-Valiente et al., 2013), utilizando para ello la muestra recuperada tras la separación por HRSEC.

3.6.4.3.1 Hidrólisis

En un tubo pirex de 10 mL de volumen, provisto de tapón con rosca, se colocaron 0,5 mL de los polisacáridos liofilizados y recuperados del paso anterior. Los monosacáridos neutros se liberaron después de la hidrólisis por tratamiento con 0,5 mL de ácido trifluoroacético 2 M (Thermo Scientific, Francia), durante 75 min a 120 °C, en un termobloque FB15103 (Fisher Scientific, Leicester, Reino Unido). Esta solución fue entonces secada bajo flujo de aire con un evaporador Liebig™ 56006101 (Francia) con bloque de calentamiento fijo a 40 °C, antes de añadir dos patrones internos: 100 µL inositol (Merck, Darmstadt, Alemania) a una concentración de 1 mg/mL, y 100 µL de alosa (Merck, Darmstadt, Alemania), a una concentración de 1 mg/mL. Las muestras fueron secadas de nuevo bajo flujo de aire con un evaporador Liebig™ 56006101 (Francia) con bloque de calentamiento fijo a 40 °C. Luego se convirtieron en los derivados de acetato de alditol correspondientes, por reducción y acetilación.

3.6.4.3.2 Reducción

Se mezcló en un tubo 140 mg de NaBH₄ (Merck, Darmstadt, Alemania) con 7 mL de NH₃ 1N (Merck, Darmstadt, Alemania) para su uso posterior. Las muestras fueron reducidas con 500 µL de la mezcla anterior (NaBH₄ en NH₃ 1N), durante 60 minutos a 60 °C en un termobloque FB15103 (Fisher Scientific, Leicester, Reino Unido). Tras esta reducción, se añadieron 500 µL de acetona (Merck, Darmstadt, Alemania), con el fin de detener la reacción y permitir un secado con flujo de aire más rápido.

3.6.4.3.3 Acetilación

Seguidamente, las muestras fueron redisueltas en 100 μ L de ácido acético glacial (MercK, Darmstadt, Alemania) y después se acetilaron por adición de 500 μ L de acetato de etilo (MercK, Darmstadt, Alemania), 1,5 mL de anhídrido acético (MercK, Darmstadt, Alemania) y 50 μ L de ácido perclórico (MercK, Darmstadt, Alemania) al 70% (v/v). Se agitó vigorosamente la mezcla y se dejó reposar 15 minutos. El exceso de anhídrido acético fue eliminado con 5 mL de agua en presencia de 50 μ L de 1-metil-imidazol (MercK, Darmstadt, Alemania).

3.6.4.3.4 Extracción

Los derivados reducidos y acetilados fueron extraídos con 500 μ L de cloroformo (MercK, Darmstadt, Alemania). Se agitó la mezcla vigorosamente, y se eliminó el exceso de la fase acuosa. Tras decantación en el propio tubo pirex, la fase orgánica fue recuperada con pipeta Pasteur y transferida a un vial con inserto, para ser conservada en el congelador a -80°C , hasta realizar el análisis por GC-MS.

3.6.4.3.5 Inyección en cromatografía en fase gaseosa

Los azúcares derivatizados a acetatos de alditol, fueron separados y cuantificados por cromatografía en fase gaseosa, en un cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 plus conectado a un detector de ionización de llama, utilizando una columna capilar de sílice fundida DB-225 (210°C), compuesta al 50% por dimethylpolysiloxano y al 50% por cyanopropylsiloxano (J&W Scientific, CA, USA) ($30\text{ m} \times 0,32\text{ mm}$ de diámetro interno, película de $0,25\text{ }\mu\text{m}$). La temperatura del inyector fue 250°C , y la relación del inyector split 1/10. Se usó helio como gas portador, con flujo 1 mL/min . La temperatura del horno fue inicialmente de 170°C durante 15 minutos, incrementándose hasta 210°C a una velocidad de 1°C/min . Los diferentes acetatos de alditol se identificaron a partir de sus tiempos de retención en comparación con los de una mezcla de monosacáridos estándar, y de una solución patrón de alosa (1 mg/mL). La cantidad en azúcares constituyentes, expresadas en mg/L , permitió calcular las concentraciones en manoproteínas (MPs), en

polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs) y en ramnogalacturonano tipo II (RG-II), presentes en cada vino (Apolinar-Valiente, 2011).

3.6.4.4 Análisis de oligosacáridos (análisis de la composición en azúcares neutros y ácidos por trimetilsililación)

Los oligosacáridos fueron derivatizados en medio ácido totalmente anhidro, para evitar cualquier reacción de hidrólisis. Las funciones hidroxilos de los azúcares son trimetilsililadas, con el fin de hacerlas volátiles, para realizar el análisis de estos compuestos por cromatografía gaseosa, pudiendo cuantificar así los azúcares constituyentes de los oligosacáridos (Apolinar-Valiente, 2011).

3.6.4.4.1 Metanólisis

Se usó un volumen de 0,5 mL de la fracción de oligosacáridos recuperados con agua mili-Q tras la separación por HRSEC, y se añadieron 50 µL de solución estándar de inositol (Merck, Darmstadt, Alemania) a 1 mg/mL. Tras un proceso de liofilización, la muestra se secó a vacío a 50 °C en presencia de P₂O₅ (Merck, Darmstadt, Alemania) durante al menos 6-8 horas.

Se cubrió con hielo un tubo pirex de 10 mL de volumen, provisto con tapón de rosca, para mezclar una ampolla de 5 mL de metanol anhidro (Supelco, Bellefonte, USA), con 0,7 mL de cloruro de acetilo (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), se agitó y posteriormente se añadieron 500 µL de esta mezcla a los tubos que contenían la fracción de oligosacáridos. Los tubos con las fracciones de oligosacáridos de mantuvieron a 80 °C durante 16 horas en un termobloque FB15103 (Fisher Scientific, Leicester, Reino Unido), durante las cuales, los oligosacáridos fueron derivatizados, es decir, un grupo O-metil aportado por el metanol quedó fijado por sustitución nucleófila a nivel del carbocatión. Tras el enfriamiento de los tubos que contenían las muestras, éstas fueron secadas bajo flujo de aire con un evaporador Liebig TM 56006101 (Francia) con bloque de calentamiento fijo a 40 °C, con el fin de eliminar el exceso del disolvente. Para asegurar la eliminación de dicho disolvente, se efectuó un segundo lavado añadiendo metanol

(Gradiente HPLC, Merck, Darmstadt, Alemania) y se secó de nuevo con corriente de aire.

3.6.4.4.2 Sililación

El residuo obtenido, fue recogido en 330 μL de reactivo de trimetilsililación añadido en exceso (ampolla Tri-Sil® Reagent, Pierce Chemical Co, IL, USA). Una vez añadido, dicha mezcla se puso a secar a 80 °C durante 20 minutos en un termobloque FB15103 (Fisher Scientific, Leicester, Reino Unido). Tras el enfriamiento de la muestra, el tubo se secó a una temperatura de 40 °C bajo corriente de aire y, posteriormente, se adicionó 0,5 mL de n-hexano (Merck, Darmstadt, Alemania), con el fin de extraer los derivados trimetilsililados y poder ser analizados en el cromatógrafo de gases.

3.6.4.4.3 Inyección en cromatografía en fase gaseosa

El análisis se llevó a cabo mediante cromatografía de gases (GC) en un cromatógrafo de gases HP, modelo 5890 (Hewlett-Packard, CA, USA) con detector de ionización de llama (FID) integrado. La adquisición y procesamiento de la información cromatográfica se realizó con el sistema HP Productivity Chemstation (Hewlett-Packard, CA, USA). Los derivados fueron inyectados en una columna capilar de sílice fundida recubierta al 100% con dimetilpolysiloxano de 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm de espesor, DB-1 (J&W Scientific, CA, USA) a un flujo constante de 2,0 mL/min, utilizando hidrógeno como gas portador. La temperatura del horno fue inicialmente de 120 °C, incrementándose hasta 145 °C a una velocidad de 1,5 °C/min, posteriormente aumentando hasta 180 °C a una velocidad de 0,9 °C/min, y finalmente llegando hasta 230 °C a 50 °C/min. La temperatura del inyector y del detector fue de 250 °C. El volumen de inyección fue de 1 μL y la relación de división de flujo de 20:1 split/splitless. La cuantificación se realizó determinando el factor de respuesta de los derivados de los azúcares patrones, junto con los valores de las muestras, tomando como valor de referencia el inositol (estándar interno).

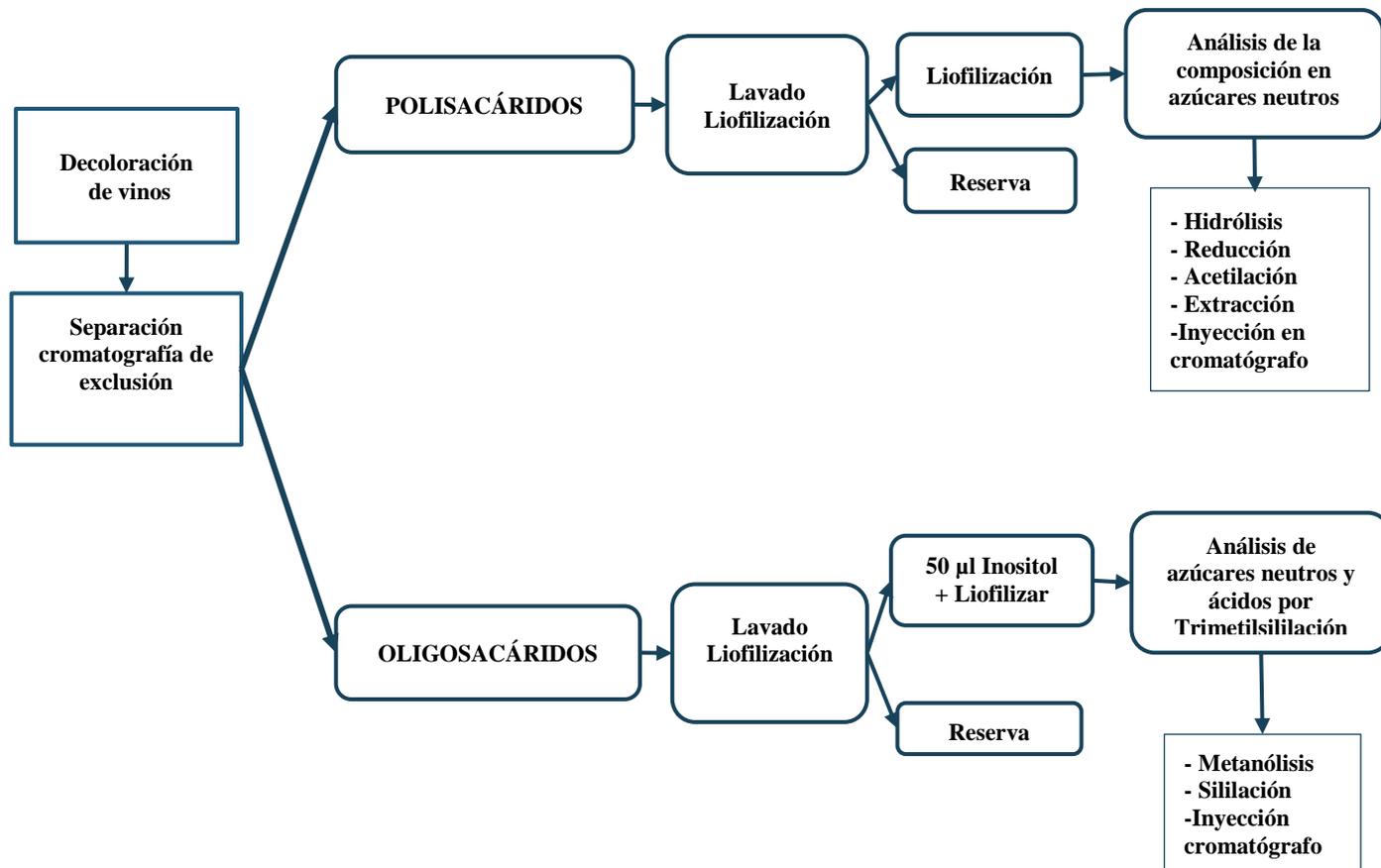


Figura 3.9 Esquema del análisis de polisacáridos y oligosacáridos en el vino.

3.7 ANÁLISIS SENSORIAL

Para determinar si existían diferencias en las características sensoriales de los vinos elaborados con uvas tratadas y uvas control, se realizó una prueba triangular (prueba de diferenciación). Se presentaron al catador tres muestras codificadas, dos de las cuales eran iguales y la tercera diferente, de modo que se le pidió que indicase cuál era el vino distinto, y el nivel de diferencia percibida entre las muestras a nivel visual, olfativo y gustativo, con una escala de 1-5 (1=nula; 2=débil; 3=media; 4= fuerte y 5=muy fuerte). También se pidió a los catadores que eligieran la muestra preferida, por lo que se utilizó la técnica del “juicio forzado”, en la que se suman únicamente las respuestas correctas y se comprueba mediante tablas estadísticas si la diferencia es significativa. La ficha de cata utilizada se muestra en la Figura 3.10. Las catas se realizaron en la Estación Enológica de Jumilla, por personal entrenado de la propia institución.



Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario
BODEGA EXPERIMENTAL - LABORATORIO ENOLÓGICO
 Avda Asunción nº 24 – 30520 Jumilla (Murcia) - Tel: 968 757 580; Fax: 968 716 026



FICHA DE CATA TRIANGULAR (TRES CATAS)

Ante usted hay tres muestras. Dos de ellas son iguales entre si. Dígame que muestra es diferente, cual prefiere y las diferencias percibidas. Es obligatorio elegir una muestra preferida, aunque no se encuentren diferencias. Puntuar los atributos que figuran en el cuadro final.

VARIEDAD: <input style="width: 100%;" type="text"/>						
MUESTRAS IGUALES <input style="width: 50px;" type="text"/>		MUESTRA DISTINTA <input style="width: 50px;" type="text"/>		MUESTRA PREFERIDA <input style="width: 50px;" type="text"/>		
ATRIBUTOS	Diferencia percibida entre las muestras					OBSERVACIONES:
	NULA	DEBIL	MEDIA	FUERTE	MUY FUERTE	
FASE VISUAL						
FASE OLFATIVA						
FASE GUSTATIVA						

Figura 3.10 Ficha de cata triangular.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre las medias. También se realizó un análisis multifactorial de la varianza (MANOVA) para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre varios factores en base a un conjunto de variables dependientes. Para la separación de medias se usó el test de rango múltiple de Duncan ($p < 0,05$). Así mismo, un análisis multivariable discriminante fue aplicado, para determinar si se podían discriminar los tratamientos de las muestras control en función de unas variables originales y, posteriormente, analizar qué variables contribuían a discriminar entre los grupos formados. Para ello se usó el paquete estadístico Statgraphics 5.0 Plus (Statpoint Technologies, INC., Warrenton, VA, USA).

**CAPÍTULO 4. EFECTO DEL MOMENTO
DE APLICACIÓN DE LOS ELICITORES SOBRE
LA PARED CELULAR**

4.1 LAS PAREDES CELULARES DE LA PIEL DE LA UVA

Desde el punto de vista enológico, las paredes celulares de la piel de la uva tienen una gran importancia por dos motivos fundamentales: la primera por su implicación en la extractabilidad de compuestos fenólicos y aromáticos de la uva, ya que suponen una barrera de difusión de estos compuestos durante la etapa de vinificación (Pellerin & Cabanis, 2000); y la segunda por ser la principal fuente de polisacáridos pécticos del vino (Doco et al., 2003). Por lo que el estudio de la estructura y composición de la pared celular de la piel de la baya, podría constituir un elemento fundamental para el control de la extractabilidad, de aquellos compuestos de interés que tienen lugar durante la etapa de maceración (Joutei et al., 1994).

De forma general, las células vegetales están rodeadas por una pared celular fina, pero de gran resistencia mecánica, la cual consta de una compleja mezcla de polisacáridos (formados mayoritariamente del carbono asimilado por fotosíntesis) y otros polímeros, que son secretados por las células y ensamblados en una red organizada, mediante enlaces covalentes y no covalentes. Durante fases específicas del desarrollo, estos polímeros pueden ser hidrolizados en sus azúcares constituyentes, introducidos en las células y utilizados para constituir nuevos polímeros. Así mismo, las paredes celulares tienen en común dos funciones principales: regular el volumen celular y determinar la forma celular (Cosgrove, 2006).

4.2 ESTRUCTURA DE LA PARED CELULAR

Aunque la pared celular es una estructura común a todos los organismos del reino vegetal, su composición varía entre especies, entre tejidos de una misma especie y entre células. En la célula vegetal, la pared se va constituyendo por la deposición de una serie de capas. Así, durante la división celular se deposita la primera capa, originando la **lámina media**, formada fundamentalmente por pectina, que mantiene la unión entre las células adyacentes (Pinelo et al., 2006). Entre la lámina media y la membrana plasmática se sigue depositando el material que va a constituir la pared celular (Revilla & Zarra, 2003).

Una vez que la placa celular está completa, se deposita en las células hijas el material que constituye la **pared celular primaria**, de escaso grosor (0,1-1,0 μm). Las paredes primarias son de gran importancia en el proceso de extensión o expansión celular, pues controlan el crecimiento (Albersheim et al., 1994). Hay dos tipos de paredes celulares primarias encontradas en las plantas superiores. Las paredes celulares de la baya de uva se basan en la pared celular primaria Tipo I, que se encuentra en plantas gimnospermas, en las dicotiledóneas (como la vid) y la mayoría de las plantas monocotiledóneas; mientras que las paredes celulares de Tipo II se encuentran en gramíneas y las familias estrechamente relacionadas a estas (Carpita et al., 2015; Carpita & Gibeaut, 1993). La pared celular primaria de las células que pertenecen al modelo de Tipo I presenta 3 capas, la primera de ellas es una red de celulosa y hemicelulosas que representa más del 50% de la pared celular. Esta red se encuentra embebida en la matriz o gel de pectinas, que supone entre el 25 y 40% del material de la pared celular. Estas estructuras mantienen la forma debido a la presencia de proteínas estructurales covalentemente unidas entre sí, las cuales representan entre el 1 y el 10% de la pared celular (Hanlin et al., 2010). Las paredes celulares del Tipo II, son generalmente pobres en pectinas y proteínas estructurales, en comparación con otras monocotiledóneas, pero pueden acumular extensas redes interconectadas de fenilpropanoides, particularmente cuando las células dejan de expandirse (Carpita et al., 2015).

En algunos tipos de células especializadas, una vez que dejan de crecer se depositan nuevas capas de material en la cara interna de la pared, constituyéndose así la **pared secundaria**, más gruesa y más rígida que la pared celular primaria, y que aparece una vez que las células han cesado su crecimiento (Carpita et al., 2015). Está formada principalmente por celulosa (40-80%), aunque también están presentes hemicelulosas (10-40%), pectinas y lignina (5-25%) (Hanlin et al., 2010). Aunque su presencia en las células de las uvas no es clara, se postula que podría desarrollarse pared secundaria en las células de la semilla. En relación a la pulpa y al hollejo, los cambios estructurales que sufren las uvas durante el proceso de maduración, parecen incompatibles con la aparición de pared celular secundaria en sus células. Sin embargo, se han aislado pequeñas cantidades de lignina a partir de las

paredes vegetales de las células de hollejo (Arnous & Meyer, 2009), lo que hace pensar en la posible aparición de pared celular secundaria durante la maduración (Quijada, 2014).

Finalmente, se constituye una pared celular completa, con una estructura sumamente organizada, formada por una red tridimensional de microfibrillas de celulosa embebida en una matriz constituida por polisacáridos (hemicelulosas y pectinas), proteínas y fenoles en una solución ligeramente ácida (Figura 4.1); que en el caso particular de la pared celular de la piel de uvas, su estructura está compuesta de polisacáridos neutros como celulosa y hemicelulosa, y sustancias ácidas pécticas, las cuales están un 62% metil-esterificadas (Pinelo et al., 2006)

Es pues, la abundancia y la composición de las paredes celulares lo que va a definir la textura de los tejidos y su capacidad para ser transformados, y particularmente en el caso de las uvas, va a tener un papel fundamental en la extractabilidad de diferentes compuestos (polifenoles, aromas, precursores, etc.) durante el proceso de vinificación (Pellerin & Cabanis, 2000).

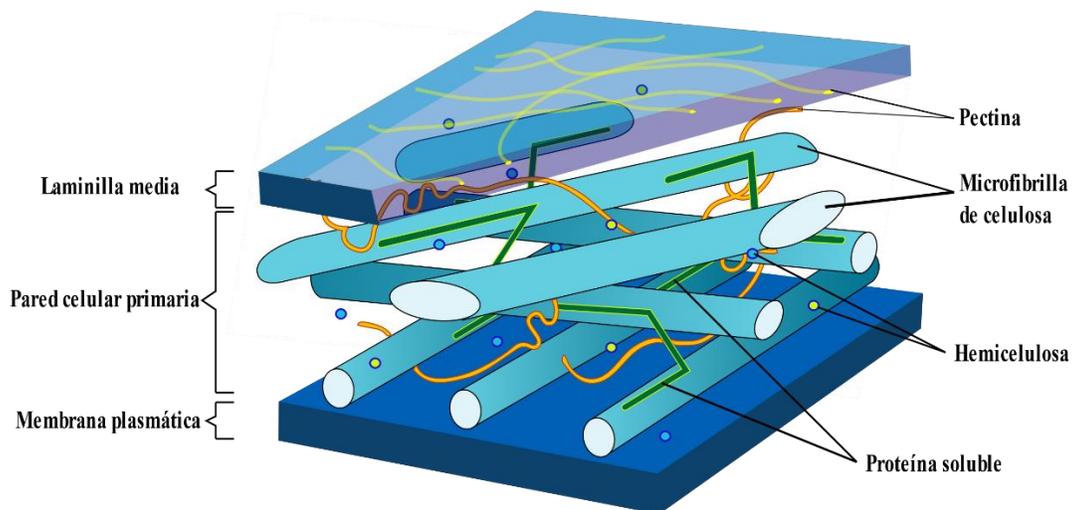


Figura 4.1 Diagrama de la organización de la pared celular.

4.3 COMPONENTES DE LA PARED CELULAR

4.3.1 POLISACÁRIDOS

Los polisacáridos de la pared celular consisten en una gran variedad de polímeros, que se nombran a partir del azúcar principal que contienen. Por ejemplo, un *glucano* es un polímero de glucosa, un *xilano* es un polímero de xilosa, etc. En los polisacáridos ramificados, el esqueleto del polisacárido se indica en la última parte del nombre; por ejemplo, el *xiloglucano* tiene un esqueleto glucano (una cadena lineal de residuos de glucosa) con azúcares xilosa unidos a él en las cadenas laterales, etc. Sin embargo, el nombre de un compuesto no indica necesariamente que tenga una estructura ramificada (Cosgrove, 2006).

4.3.2 CELULOSA

La celulosa es un polisacárido no ramificado,

formado por moléculas de glucosa que se unen mediante enlaces β -(1→4) glicosídicos formando cadenas de celobiosa. Estas cadenas se asocian entre sí en paralelo mediante puentes de hidrógeno (Figura 4.2), formando microfibrillas con estructura enrollada (Goulao et al., 2012). Las microfibrillas están separadas entre sí unos 30 nm; ese espacio está ocupado por los polisacáridos matriciales y por lignina o suberina, lo que confiere gran resistencia mecánica a la pared. Los glucanos individuales que constituyen la microfibrilla, están muy estrechamente alineados y unidos unos a otros para formar un cordón muy ordenado (cristalino), que excluye el agua y es relativamente inaccesible al ataque enzimático. En consecuencia, la celulosa es muy estable y resistente a la degradación. Estas microfibrillas de celulosa están presentes en las paredes de todas las plantas superiores, y constituyen el 30-40% del peso de las paredes de los tejidos leñosos (Revilla & Zarra, 2003).

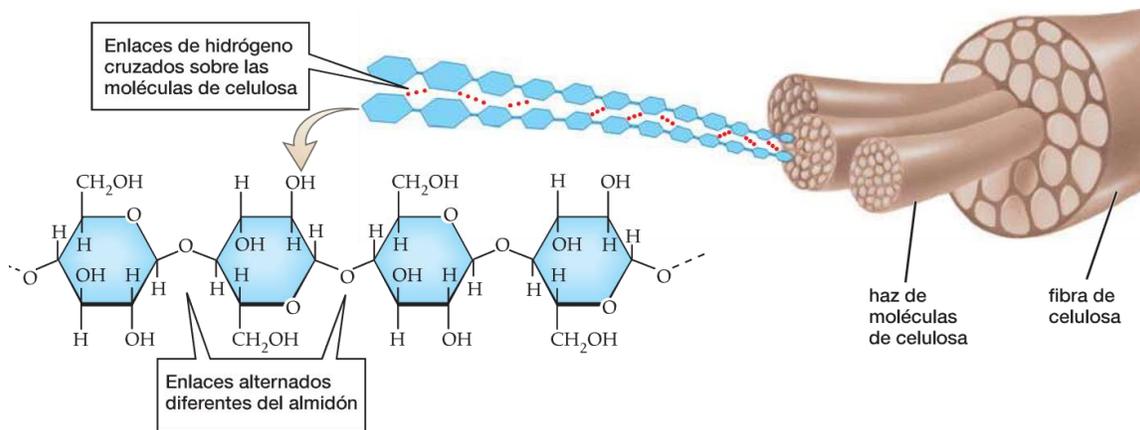


Figura 4.2 Detalle de la molécula de celulosa (Audesirk et al., 2013)

4.3.3 PECTINAS

Entre los polímeros conocidos de mayor complejidad, figuran los polisacáridos pécticos o pectinas, constituidos por una mezcla de azúcares ácidos y neutros, embebidos en la red formada por las celulosas y hemicelulosas, formando geles hidrofílicos capaces de retener el agua, lo que les hace tener un papel importante en la regulación del estado hídrico y en el transporte de iones en la planta (Quijada, 2014).

Estos compuestos se encuentran en las paredes celulares de todas las plantas, aunque su importancia cuantitativa varía: desde el 35% en las paredes primarias de las dicotiledóneas hasta el 5% en las de las gramíneas. Se considera que su presencia en las paredes celulares determina su porosidad y proporciona superficies cargadas que modulan el pH y el balance iónico; además, actúan como moléculas de reconocimiento de señales como las de los organismos simbióticos, los patógenos y los insectos. Las pectinas están constituidas por cadenas lineales de ácido α -D- galacturónico, unido mediante enlace 1 \rightarrow 4 que puede encontrarse modificado o sustituido por un número variable de ramificaciones formadas por azúcares sencillos o cadenas complejas, que dan lugar a una gran variedad de estructuras (Revilla & Zarra, 2003).

Los principales polisacáridos pécticos que se encuentran en las uvas y, por lo tanto, presumiblemente también presentes en su piel son el homogalacturonano (65%), ramnogalacturonano de Tipo I (10%), ramnogalacturonano de tipo II (2%) y cadenas laterales neutras que incluyen arabinanos y arabinogalactanos (23%) (Hanlin et al., 2010; Nunan et al., 1997; Pinelo et al., 2006; Vidal et al., 2001). Notablemente, todas las bayas contienen de forma general grandes cantidades de homogalacturonanos, en comparación con otras frutas, y las uvas tienen mayores proporciones de RG-I en comparación con otros tipos de bayas (Hilz, 2007). Además se han observado diferencias en la composición de pectina entre la pulpa y la piel; donde un contenido 3 veces mayor de fracciones de polisacáridos pécticos fue encontrado en la piel, en comparación con los tejidos de la pulpa (Vidal et al., 2001).

El homogalacturonano (HG) es un polímero del ácido D-galacturónico unido por enlaces α -(1 \rightarrow 4), que pueden estar metilesterificados. La presencia de metilación es importante debido a que neutraliza la carga negativa que presentan las cadenas sin metilar y permite la interacción con los iones Ca^{2+} formando geles. Esto va a permitir la existencia de microdominios dentro de los polisacáridos pécticos que presentan diferentes propiedades, como un mecanismo de desmetilación localizado diferente, que puede conducir al endurecimiento o al ablandamiento de la pared (Goulao et al., 2012).

El ramnogalacturonano de tipo I (RG-I) es el segundo polisacárido de las pectinas, está formado por un esqueleto que presenta un número variable de unidades de ácido galacturónico unidas por enlace α -(1 \rightarrow 4) y de ramnosa con enlace α -(1 \rightarrow 2); y tres tipos de cadenas laterales neutras, formadas principalmente por arabinanos, galactanos y arabinogalactanos (Quijada, 2014). Se han aislado tres tipos de polisacáridos de galactano en asociación con los polisacáridos RG-I: galactano y arabinogalactano de tipo I y tipo II. (Caffall & Mohnen, 2009).

El ramnogalacturonano de tipo II (RG-II) es el tipo de polisacárido más complejo y ramificado que se encuentra en las uvas y en el vino. Su esqueleto está formado por cadenas cortas (7-9 residuos) de ácido galacturónico, con ramificaciones complejas y altamente conservadas que contienen 12 tipos de residuos glicosídicos diferentes, unidos entre sí por más de 20 tipos de enlaces. Entre estos 12 tipos de residuos glucosídicos, encontramos

algunos *azúcares raros* (2-O-metil-fucosa, 2-O-metil-xilosa, apiosa, ácido acérico o 3-carboxi-5-deoxi-L-xilosa, Dha o ácido 3-deoxi-D-liso-2-heptulosónico, y Kdo o ácido 2-ceto-3-deoxi-D-manoctulosónico), los cuales solamente se encuentran en estos compuestos y se utilizan para su identificación en el vino (Pellerin et al., 1996; Pérez et al., 2003; Vidal, Williams, et al., 2003).

Los ramnagalacturonanos I y II son más abundantes en las paredes celulares de las pieles que en la pulpa, por lo que su concentración es mayor en los vinos tintos que en los vinos blancos (Vidal, Williams, et al., 2003).

En cuanto a los arabinogalactanos (AG), en las pectinas existen los del tipo I y II. Los AG-I son galactanos formados por un esqueleto de D-galactosa con uniones β -(1 \rightarrow 4), con cadenas laterales de α -arabinofuranósido. Los AG-II son polisacáridos estructuralmente diferentes, caracterizados por residuos de D-galactosa con uniones β -(1 \rightarrow 3) y β -(1 \rightarrow 6), con sustituciones α -L-arabinosa. Los AG-II están a menudo ligados a una cúpula proteica (del 2 al 10% en masa) caracterizada por la presencia de hidroxiprolina, conformando así las arabinogalactano proteínas (AGP). Las AGP en forma libre o asociadas a pectinas, están implicadas en los enlaces con el RG-I (Apolinar-Valiente, 2011).

4.3.4 HEMICELULOSAS

Las hemicelulosas son polisacáridos ramificados, que pueden interactuar de forma no covalente a través de enlaces de hidrógeno con microfibrillas de celulosa, y tienen la capacidad de recubrirlas y unir las para formar un gran entramado. En la pared celular de la piel de las uvas, los polisacáridos hemicelulósicos consisten principalmente en xiloglucanos cuyas estructuras se basan en un esqueleto de (1 \rightarrow 4) β D-glucano cualitativamente idéntico a la celulosa, pero a diferencia de la celulosa, aproximadamente el 75% de los residuos de glucosa llevan ligados residuos (1 \rightarrow 6) α D-xilosa, aproximadamente el 35% de los cuales están sustituidos con residuos de galactosa, muchos de los cuales están fucosilados (Thompson & Stephen, 2000). Se diferencian de la celulosa debido a su sustitución con otros azúcares, lo que resulta en una variación considerable en su composición y estructura. En

función de los azúcares presentes en esta estructura se distinguen varios tipos de hemicelulosas: xiloglucanos, mananos, xilanos, arabinosilanos, glucuronosilanos o glucuronoarabinosilanos (Goulao et al., 2012).

Los xiloglucanos (XG) son las hemicelulosas predominantes en la pared celular primaria de dicotiledóneas y representan el 15-25% (Carpita & Gibeau, 1993). Las cadenas laterales cortas que contienen sacáridos mono-(xilosa), di-(xilosa-galactosa) o tri-(xilosa-galactosa-fucosa) están unidas por enlaces α -1,6 en sitios regulares a la posición O-6 de las unidades de glucosa de la cadena lineal principal de XG (Goulao et al., 2012). Recientemente, los XG y los xilanos se han localizado en las uniones celulares en frutas en maduración, lo que sugiere un papel de las hemicelulosas en la adhesión celular (Ordaz-Ortiz et al., 2009), que anteriormente se atribuía a los homogalacturonanos pécticos.

Otras hemicelulosas incluyen mananos (una cadena principal de β -1,4-manosa, con o sin galactosa unida por un enlace α -1,6), que incluyen glucomanos, galactomanos, galactoglucomanos, xilanos y algunos residuos de xilosil, formando arabinosilanos, glucuronosilanos y glucuronoarabinosilanos (Goulao et al., 2012).

4.3.5 LIGNINA

La lignina es un polímero complejo constituido a partir de los alcoholes aromáticos *p*-cumarílico, coniferílico y sinapílico, unidos entre sí por enlaces éster o carbono-carbono. La composición monomérica, así como el tipo de enlaces entre ellos y su organización en la macromolécula, varían en las diferentes especies. La polimerización puede tener lugar mientras haya precursores activados y espacio en la pared, de manera que la molécula tiende a llenar todo el espacio de la pared no ocupado por otras macromoléculas, desplazando al agua. La estructura polimérica de la lignina no sólo se entrelaza con las microfibrillas de celulosa, sino que también se une a las hemicelulosas (arabinosilano) y pectinas (arabinogalactano) mediante enlaces éster a través de sus restos hidroxicinámicos (Revilla & Zarra, 2003). En el caso de las angiospermas (semillas cubiertas de fruto, como la vid), la lignina está compuesta casi exclusivamente por subunidades de guaiacilo y siringilo, pero no

hay informes disponibles sobre la longitud de la cadena de lignina de la vid (Goulao et al., 2012).

La lignina es el segundo compuesto en abundancia después de la celulosa, y puede representar una proporción importante (hasta un 35%) en algunos tipos de paredes secundarias (Revilla & Zarra, 2003). Su acumulación en las paredes secundarias lo convierten en el elemento marcador de la “secundarización” de las paredes, y su disposición transversal bloquea toda posibilidad de extensión longitudinal de las paredes y, por tanto, del crecimiento de los tejidos. Las paredes se engrosan para conseguir una resistencia mecánica creciente de la planta (Pellerin & Cabanis, 2000); por lo que se la asociado al soporte mecánico de los órganos de las plantas, y los mecanismos de defensa (Boudet, 2000).

4.3.6 PROTEÍNAS

La pared celular primaria contiene aproximadamente un 10% de proteínas estructurales, que actúan como soporte de las largas cadenas de polisacáridos (O'Neill & York, 2018). En el caso de las proteínas presentes en la pared celular de la piel de uvas, este porcentaje es menor, situándose por debajo del 5% (Lecas & Brillouet, 1994).

Se ha detectado que al final del periodo de maduración de las bayas de uva, la pérdida parcial de los polisacáridos estructurales de la pared se compensa mediante la incorporación de proteínas estructurales y la formación de reticulaciones fenólicas, especialmente en las paredes de las células de la epidermis y la sub-epidermis (Huang et al., 2005); y dado que las proteínas se limitan a las cuatro capas externas de células de la piel, éstas podrían contribuir a la fuerza necesaria del tejido para mantener la integridad de la baya, actuando como un tejido protector (Huang et al., 2005; Ortega-Regules et al., 2008).

Estas proteínas normalmente se clasifican de acuerdo con su composición predominante de aminoácidos. Así, por ejemplo, entre las más abundantes encontramos: las proteínas ricas en hidroxiprolina (extensinas), proteínas ricas en glicina (PRG), proteínas ricas en prolina (PRP), arabinogalactano proteínas (AGP) y las lectinas de solanáceas.

Asimismo, existen otras proteínas menos abundantes en las paredes o interactuando con ellas, como por ejemplo las expansinas (Cosgrove, 2006).

Las proteínas ricas en hidroxiprolina (extensinas) son las proteínas más abundantes de la pared celular de dicotiledóneas, e interactúan con los polisacáridos pécticos de la pared (Caffall & Mohnen, 2009). Si bien son conocidas como extensinas, aunque no provocan la extensión de las paredes celulares. Así mismo, se piensa que estas proteínas están involucradas en la protección de las células frente a la invasión de patógenos, porque se inducen como respuesta a los ataques microbianos (Showalter, 1993).

Las proteínas ricas en glicina (PRG) son las segundas proteínas más abundantes (O'Neill & York, 2018). Están constituidas por alrededor del 70% de glicina, y están dispuestas en unidades cortas de aminoácidos. Han sido descritas como proteínas que se expresan en respuesta a diversas condiciones de estrés y desarrollo de las plantas (Showalter, 1993). Estas proteínas están implicadas en varios aspectos del desarrollo, desde la germinación hasta los primeros estadios de la nodulación. Además, existen otros factores que pueden inducir las, como es el caso de heridas, ataques de microorganismos y la luz (Showalter, 1993).

Las arabinogalactano proteínas (AGP) son proteoglicanos que se han implicado principalmente en la adhesión celular (Majewska-Sawka & Nothnagel, 2000). Están caracterizadas por sus altas proporciones de hidroxiprolina, serina, treonina, alanina y glicina, estando ampliamente distribuidas en las plantas.

Las lectinas de solanáceas son glicoproteínas, y se han sugerido funciones como interacciones célula-célula, curación de heridas y defensa de la planta. Al parecer están localizadas en la pared celular y parecen ser similares a las extensinas de dicotiledóneas (Showalter, 1993).

4.3.7 COMPUESTOS FENÓLICOS

Ortega-Regules (2006) describió que en la pared celular primaria encontramos principalmente el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico como principales compuestos fenólicos, que generalmente se encuentran esterificando a la arabinosa y la galactosa de polisacáridos pécticos. En otras investigaciones se encontró que en las pieles de la uva, los fenoles de las paredes celulares se unen a los polisacáridos por interacciones hidrófobas y enlaces de hidrógeno (Pinelo et al., 2006), y forman parte de las paredes celulares primarias y secundarias (Lau et al., 1985). Se ha detectado además, que curiosamente se produce un patrón de interacción diferente entre proantocianinas, y el material de la pared celular de la pulpa y piel, con posibles efectos sobre la extracción de estos compuestos durante la vinificación (Goulao et al., 2012).

Así mismo, varios autores han propuesto que los compuestos fenólicos de la pared celular podrían participar en la resistencia frente a patógenos fúngicos, debido a los tipos de enlace que forma el ácido ferúlico (entrecruzamiento de tipo oxidativo), ya que al parecer tiene como función limitar la extensión de la pared celular (McNeil, 1984; Schnitzler et al., 1992). Por tanto, un conocimiento de la concentración y tipo de fenoles que forman parte de la pared celular, ayudaría en la toma de decisiones a nivel vitícola y enológico.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se describen los resultados obtenidos en el análisis de paredes celulares de la variedad Monastrell, tras la aplicación de diferentes elicitores (MeJ, BTH y una mezcla de ambos), en dos momentos diferentes del periodo de maduración durante dos campañas consecutivas. Se realizó un análisis de la cantidad de pared celular aislada a partir de la piel fresca, y seguidamente se analizaron los componentes individuales de las paredes celulares: la composición de carbohidratos (glucosa celulósica, glucosa no-celulósica y ácidos urónicos), lignina, proteínas y fenoles totales.

4.4.1 RENDIMIENTO DEL AISLAMIENTO DE PAREDES CELULARES.

Para tener una idea más aproximada de la proporción de pared celular presente en las pieles de uvas Monastrell, en la Tabla 4.1 se presentan los resultados obtenidos del peso medio de piel fresca en g/100 g de uva, y el peso medio de paredes celulares aisladas en mg/g piel fresca.

Los resultados indicaron que los valores medios de piel fresca encontrados durante las campañas 2016 y 2017, se situaron en torno a 7,6 g/100 g de uva. Observamos además que ninguno de los tratamientos con elicitores aplicados influyó en la cantidad de piel fresca obtenida.

Con respecto a la cantidad de material de pared celular aislado a partir de la piel fresca de las uvas, los resultados obtenidos fueron ligeramente superiores a los encontrados por otros autores (Apolinar-Valiente et al., 2010; Apolinar-Valiente, Romero-Cascales, Gómez-Plaza, et al., 2015), los cuales analizaron también uvas de la variedad Monastrell de la misma zona de cultivo (Cañada del Judío-Jumilla), y aislaron las paredes celulares con el mismo método de extracción.

Por otra parte, nuestros resultados revelaron que el material de pared celular aislado en 2016 se situó en 117 mg/g como valor promedio, el cual fue muy superior al material de

pared celular aislado en 2017, el cual se situó en 95 mg/g. Estas diferencias podrían atribuirse a las diferentes condiciones climáticas experimentadas en las añadas de estudio (Garrido-Bañuelos et al., 2019), especialmente entre los meses de julio y agosto de 2017 (Figura 3.2 B. Apartado 3.3.2), donde las plantas soportaron una mayor cantidad de días con temperaturas por encima de los 30 °C, además de una gran precipitación días antes de la vendimia, lo que pudo provocar desajustes en la fisiología de las uvas.

Tabla 4.1 Peso de piel (en g/100 gramos de uva fresca), y rendimiento del aislamiento de las paredes celulares (en mg pared celular/g de piel fresca), de uva Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017)

Año	Control	Envero			Mitad de maduración			
		MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH	
2016	Piel fresca	7.6 ± 1.1 a	8.1 ± 0.1 a	7.9 ± 0.1 a	7.7 ± 0.3 a	7.0 ± 0.6 a	7.2 ± 0.4 a	7.1 ± 0.4 a
	Pared celular	116 ± 6 ab	112 ± 10 ab	106 ± 8 a	115 ± 9 ab	127 ± 7 b	120 ± 8 ab	132 ± 7 b
2017	Piel fresca	7.4 ± 1 a	7.4 ± 0.7 a	7.4 ± 0.9 a	8.1 ± 0.6 a	8.3 ± 0.8 a	7.6 ± 0.8 a	7.7 ± 0.6 a
	Pared celular	88 ± 7 a	94 ± 6 a	93 ± 6 a	94 ± 6 a	100 ± 6 a	102 ± 6 a	95 ± 4 a

Abreviaciones: MeJ: Metil Jasmonato; BTH: Benzotiadiazol. Los datos representan las medias ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$).

En cuanto a los resultados obtenidos en 2016, observamos que las uvas tratadas durante el envero, presentaron ligeramente una menor cantidad de pared celular en la piel que las uvas tratadas en mitad-de-maduración, siendo las uvas tratadas con BTH en las que se aisló menor cantidad de material de pared celular (106 ± 8 mg/g). No obstante, no se detectaron diferencias de forma general entre los distintos tratamientos y las uvas control.

Los resultados de 2017 indicaron que ninguno de los tratamientos aplicados en la etapa de envero, causó diferencias en la cantidad de material celular aislado de las pieles. Así mismo, cuando los tratamientos se aplicaron en mitad-de-maduración, tampoco causaron diferencias significativas en este parámetro si lo comparamos con las uvas sin tratar.

Este conocimiento sobre los cambios producidos en la pared celular, nos puede servir para la toma de decisiones a nivel enológico, ya que diversos estudios han demostrado la correlación existente entre la cantidad de pared celular encontrada en uvas, con algunos de

los procesos que se producen durante la vinificación. Así, Ortega-Regules et al. (2006) constataron que la variedad Monastrell presentó una mayor cantidad de pared celular que las variedades Cabernet Sauvignon, Syrah y Merlot, y que este parámetro estaba directamente correlacionado con los peores índices de extracción de polifenoles observados en Monastrell, en comparación con los índices obtenidos en las otras tres variedades. En la misma línea, Hernández-Hierro et al. (2014) observaron que tras un análisis de componentes principales, el "material insoluble total (paredes celulares)" de las pieles de uvas de la variedad Tempranillo, exhibió la mayor oposición a la "extracción de antocianos", mientras que los componentes de la pared celular (celulosa, RG-II y polifenoles), se correlacionaron positivamente con la extracción de antocianos, infiriendo que la cantidad de pared celular es un factor crucial para la extracción de antocianos, y que la composición cualitativa dentro de la pared celular también juega un papel importante.

4.4.2 COMPONENTES DE LA PARED CELULAR

En este ensayo se realizó un análisis individual de los componentes de la pared celular, así como un análisis multifactorial, analizando los factores: año, tratamiento y momento de aplicación de dichos tratamientos. Por lo que las diferencias que se puedan apreciar entre los distintos factores se discutirán en un apartado específico.

Los distintos carbohidratos encontrados en las paredes celulares de la piel, indicaron la presencia de celulosa (glucosa celulósica), hemicelulosa (glucosa no-celulósica) y polisacáridos pécticos (ácidos urónicos).

4.4.2.1 Glucosa celulósica (celulosa)

La celulosa se obtiene a partir de la glucosa liberada después de la realización de la hidrólisis de Seaman (Ortega-Regules, 2006), tal como se detalló en el método de extracción (Apartado 3.5.3.2.1.3 de Materiales y Métodos). Los resultados mostraron como este

componente representó alrededor del 15% de la pared celular de las muestras analizadas durante las dos campañas estudiadas (Figuras 4.3 A y B).

En la campaña 2016, los análisis de las uvas tratadas durante el envero (Figura 4.3 A), indicaron que el tratamiento MeJ+BTH consiguió incrementar la concentración de celulosa, en comparación con las uvas control. Así mismo, los tratamientos BTH y MeJ+BTH aplicados en mitad-de-maduración, también indujeron incrementos en la biosíntesis de celulosa de las paredes celulares.

En cuanto a los tratamientos aplicados en el envero de 2017 (Figura 4.3 B), el tratamiento MeJ provocó una disminución en la concentración de celulosa con respecto al control; por el contrario, el tratamiento BTH incrementó la cantidad de celulosa de las paredes celulares. En el caso de las uvas tratadas en mitad-de-maduración, no presentaron diferencias significativas con respecto a las muestras control para este parámetro.

Con el análisis de los resultados de las dos campañas, observamos que el tratamiento BTH aplicado en mitad-de-maduración, fue capaz de inducir una mayor biosíntesis de celulosa en las paredes celulares de las pieles de uvas Monastrell. Este hecho podría afectar directamente a las defensas de la planta frente a organismos potencialmente patógenos, o en la extracción de compuestos fenólicos durante el proceso de maceración, ya que la celulosa es un componente primordial en el mantenimiento celular y la estructura del tejido, por la red tridimensional de microfibrillas que forma en las paredes, confiriéndole resistencia mecánica a los tejidos al actuar como barrera física (Revilla & Zarra, 2003).

4.4.2.2 Glucosa no-celulósica (hemicelulosa)

Con respecto a la concentración de hemicelulosa de las paredes celulares, los resultados obtenidos mostraron una marcada diferencia entre las dos campañas estudiadas, (Figura 4.3 C y D); donde las muestras analizadas en 2016 presentaron una mayor concentración de hemicelulosa que las obtenidas en las muestras analizadas en el año 2017.

Los análisis de 2016 (Figura 4.3 C) mostraron diferencias en los resultados obtenidos según el momento de aplicación del tratamiento. Así, los tratamientos MeJ y MeJ+BTH aplicados en enero, provocaron una disminución en la concentración de hemicelulosa si la comparamos con las uvas control. Mientras que el tratamiento MeJ aplicado en mitad-de-maduración, fue el único que indujo a un incremento en la concentración de hemicelulosa de las paredes celulares de la piel de la variedad Monastrell.

En el año 2017, los tratamientos MeJ y MeJ+BTH aplicados en enero (Figura 4.3 D), nuevamente disminuyeron la concentración de hemicelulosa de las paredes celulares, tal como ocurrió en el año 2016. En los tratamientos aplicados a mitad-de-maduración, BTH también provocó una disminución en la concentración de hemicelulosa.

Los resultados obtenidos durante las dos campañas indicaron que los tratamientos MeJ y MeJ+BTH aplicados en enero, provocaron una disminución en la concentración de hemicelulosa de las paredes celulares de la piel de Monastrell. A tal efecto, al igual que sucede con las fibrillas de celulosa, las hemicelulosas también son fundamentales en el mantenimiento de la estructura organizada de las paredes celulares; y a pesar de que la hemicelulosa fue el polisacárido estructural con menor concentración en las paredes celulares de Monastrell (2-4%), en comparación con la celulosa (15%) y pectina (30%), una disminución en su concentración, ya sea por factores medioambientales o la aplicación de elicitores, también afectaría las características físico-químicas de las paredes, ya que interactuarían en menor medida con las microfibrillas de celulosa, perdiendo la capacidad de formar un gran entramado.

4.4.2.3 Ácidos urónicos (pectinas).

Son los principales componentes de los polisacáridos pécticos, los cuales actúan como sustancias cementantes y contribuyen a la adhesión intracelular y a la fuerza de la pared celular (Apolinar-Valiente, 2011), y están presentes principalmente en la pared primaria (Keegstra, 2010).

En este estudio, los análisis realizados durante las dos campañas (Figuras 4.3 E y F), mostraron que las pectinas fueron los principales polisacáridos estructurales en la pared celular de la piel de Monastrell, cuya concentración media supuso aproximadamente un 30% de la pared celular.

Los resultados de 2016 indicaron diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en envero y mitad-de-maduración (Figura 4.3 E). Una menor proporción de polisacáridos pécticos se observó en todos los tratamientos de mitad-de-maduración con respecto a los realizados en envero y también con respecto a las uvas control. No obstante, MeJ+BTH aplicado en envero también provocó una disminución de polisacáridos pécticos en las paredes celulares de las uvas tratadas, con respecto a las uvas control.

En cambio, en la campaña 2017 (Figura 4.3 F), una menor concentración de polisacáridos pécticos fue observada en las paredes celulares de las uvas tratadas durante el envero, en comparación con la obtenida en las uvas tratadas en mitad de maduración. En cuanto a los tratamientos aplicados en envero, MeJ, BTH y MeJ+BTH provocaron una disminución en la concentración de este compuesto. Mientras que las uvas tratadas en mitad-de-maduración, no presentaron diferencias significativas en la concentración de polisacáridos pécticos de la pared celular, si las comparamos con las uvas control.

Por lo tanto, el tratamiento MeJ+BTH aplicado en envero fue el único que provocó una disminución en la concentración de pectinas en las dos campañas estudiadas. No obstante, la tendencia general tras la aplicación de elicitores, fue una reducción de los polisacáridos pécticos en la piel de las bayas. Este efecto también podría afectar negativamente a los mecanismos de defensa de la vid, ya que la pared celular además de actuar como barrera física frente a organismos patógenos, también actúa como fuente de moléculas con actividad biológica como las oligosacarinas (Revilla & Zarra, 2003). Estas oligosacarinas son fragmentos biológicamente activos, procedentes de la degradación de las pectinas de las paredes celulares, con algunos efectos fisiológicos y del desarrollo como, la estimulación de la síntesis de fitoalexinas, el estallido oxidativo, la síntesis de etileno, la

despolarización de la membrana, la síntesis inducida de proteínas PR, además de señales de heridas locales y sistémicas, etc. (John et al., 1997).

Así mismo, otro efecto negativo de la disminución de la concentración de derivados pécticos en las paredes celulares de las pieles de la uva, podría ser una menor disposición de estos compuestos para ser liberados durante los procesos de maceración, produciendo vinos con una sensación más astringente. Este es el caso de los RG-II, uno de los polisacáridos pécticos más abundantes en el vino (Pellerin et al., 1996), el cual está presente en el mosto de uva desde el inicio de la vinificación, indicando que se libera parcialmente a lo largo del periodo de maceración (Doco et al., 1996). Los RG-II se han correlacionado con propiedades organolépticas del vino, ya que son capaces de suavizar la sensación de astringencia (Vidal et al., 2004).

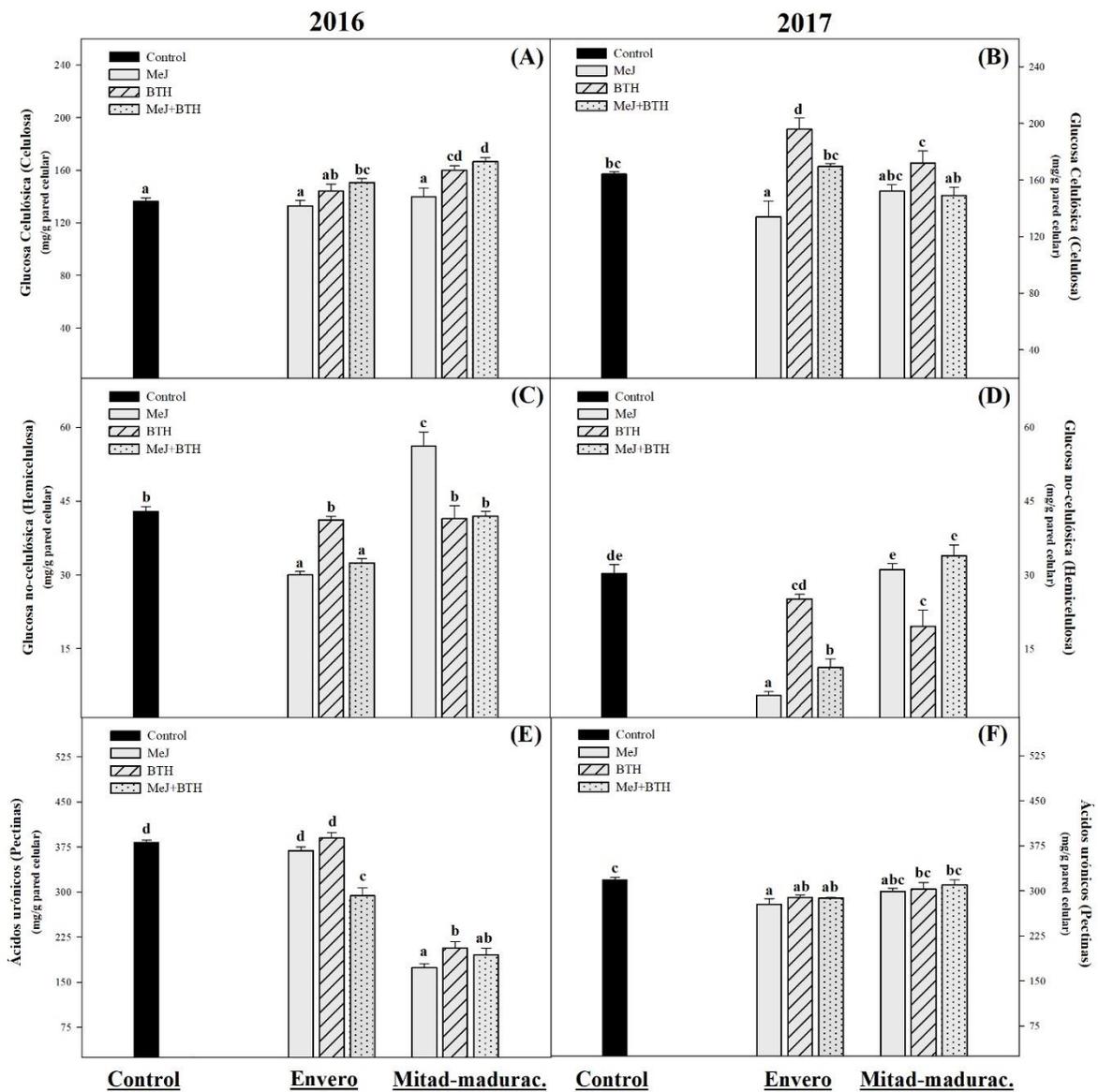


Figura 4.3 Concentración de glucosa celulósica (A y B), glucosa no-celulósica (C y D) y ácidos urónicos (E y F) de paredes celulares de piel de uva Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

4.4.2.4 Lignina

En nuestro estudio, la lignina encontrada en las muestras representó entre el 40-45% de la composición de las paredes celulares, siendo el segundo componente más abundante después de los polisacáridos estructurales (celulosa, hemicelulosa y pectinas).

En la campaña 2016 se observaron diferencias entre los momentos de aplicación de los tratamientos (Figuras 4.4 A). Se apreció claramente que los tratamientos aplicados durante el envero fueron los que menos contribuyeron en la acumulación de lignina, frente a los aplicados en mitad-de-maduración. No obstante, los tratamientos MeJ y MeJ+BTH aplicados en envero, incrementaron la concentración de lignina si los comparamos con el control. En el caso de los tratamientos de mitad-de-maduración, observamos que todos los tratamientos incrementaron la concentración de lignina de las paredes celulares, donde MeJ fue el tratamiento que obtuvo los valores más altos.

En la campaña 2017 (Figura 4.4 B), también se apreciaron diferencias entre los momentos de aplicación de los tratamientos, pero en este caso, los tratamientos aplicados durante el envero influyeron en mayor medida tras su aplicación. En el caso de los tratamientos durante el envero, MeJ fue el que más incrementó la concentración de lignina en las paredes celulares, seguido del tratamiento MeJ+BTH, sin embargo, el tratamiento con BTH no influyó en la concentración de este componente. En los tratamientos realizados en mitad-de-maduración, se observaron ligeros incrementos, pero no lo suficientes como para diferenciarse estadísticamente de las muestras control.

Con todo lo anterior, constatamos que durante los dos años estudiados los tratamientos MeJ y MeJ+BTH aplicados en envero, incrementaron la concentración de lignina en paredes celulares de la piel de uvas Monastrell. A este respecto, se conoce que el depósito de lignina o lignificación en la pared celular secundaria se produce en las últimas etapas, cuando la célula ha parado de dividirse y expandirse, aunque su biosíntesis también puede ser inducida por condiciones de estrés biótico y abiótico (Boerjan et al., 2003; Vanholme et al., 2010); por lo que los tratamientos antes mencionados, pueden haber

inducido su biosíntesis. Sin embargo, fue un comportamiento contrario al que encontramos en el caso de la hemicelulosa (glucosa no-celulósica) (Figuras 4.4 C y D), en las que se observó una disminución en su concentración tras la aplicación de MeJ y MeJ+BTH durante el envero. En relación a esto, el depósito de lignina entre las microfibrillas de celulosa puede incrementar el espesor de las paredes, confiriéndole una mayor resistencia mecánica (Apolinar-Valiente, 2011), y dado su carácter hidrofóbico, su presencia en las paredes celulares fuerza a que el agua se desplace, incrementando la resistencia y rigidez (Revilla & Zarra, 2003). No obstante, a pesar de que la presencia de hemicelulosa fue baja en las paredes celulares de nuestras muestras (2-4%), una disminución en su concentración podría afectar la resistencia estructural, ya que se reducirían los enlaces cruzados entre la lignina estructural y la hemicelulosa durante la lignificación (Mueller-Harvey et al., 1986).

4.4.2.5 Proteínas

Las proteínas estructurales de la pared celular es otro de los compuestos que se ha correlacionado con los mecanismos de defensa de la planta, ya que se expresan en respuesta a diversas condiciones de estrés y desarrollo de las plantas (Cassab & Varner, 1988; Showalter, 1993).

En este ensayo, las paredes celulares de las uvas analizadas en 2016, presentaron una mayor concentración de proteínas que las uvas analizadas en 2017 (Figuras 4.4 C y D). Estas diferencias representaron una concentración de proteínas de más del doble en 2016 que en 2017, poniendo de manifiesto que la síntesis de proteínas estructurales también fue altamente sensible a las condiciones ambientales.

Los análisis realizados en 2016 mostraron que todos los tratamientos lograron incrementar la concentración de proteínas de las paredes celulares, ya sea en los tratamientos aplicados en envero o mitad-de-maduración (Figura 4.4 C). Destacaron sobre todo los tratamientos realizados en envero, donde el tratamiento MeJ dio lugar a una mayor concentración de proteínas, seguido del tratamiento BTH y MeJ+BTH si los comparamos con los resultados obtenidos en las uvas control. En el caso de los tratamientos realizados en

mitad-de-maduración, el incremento que provocaron con respecto al control fue similar para todos ellos.

Sin embargo, en la campaña 2017 (Figura 4.4 D), los tratamientos apenas indujeron cambios en la concentración de proteínas de las paredes celulares, tanto en los aplicados en envero como los aplicados en mitad de maduración. Durante este año, el tratamiento MeJ aplicado en el envero, fue el único que dio lugar a incrementos en la concentración de proteínas de las paredes celulares de la piel.

Por lo tanto, los resultados obtenidos durante las dos campañas de estudio indicaron que el tratamiento MeJ aplicado en uvas Monastrell durante el envero, fue el único que incrementó la concentración de proteínas de las paredes celulares de la piel de Monastrell, durante los dos años estudiados. Aunque hay que recalcar que se notó una ligera tendencia en el incremento de la concentración de proteínas, tras la aplicación de la mayoría de elicitores. En relación a esto, hay que tener en cuenta que la abundancia de estas proteínas estructurales varía mucho en función del tipo de célula, la maduración y la estimulación previa como lesiones, ataque por patógenos o tratamiento con elicitores, los cuales incrementan la expresión de genes que codifican muchas de estas proteínas (Cosgrove, 2006). Pero además de este incremento en la expresión de genes, se ha observado que proteínas estructurales ricas en prolina se hacen rápidamente insolubles tras alguna herida o tratamiento con elicitores, cuyo hecho se ha asociado con un estallido oxidativo, y con mecanismos que incrementan la rigidez mecánica de las paredes celulares. Lo que se corrobora con algunos estudios de extracción *in vitro*, que mostraron que las proteínas estructurales recién secretadas son relativamente solubles, pero llegan a ser más y más insolubles durante la maduración celular o en respuesta a una lesión. No obstante, la naturaleza bioquímica del proceso de insolubilización es incierta (Cosgrove, 2006).

4.4.2.6 Fenoles totales

Las condiciones ambientales soportadas en la zona de ensayo también tuvieron una gran influencia sobre la concentración de fenoles totales que conforman la pared celular de

la piel, ya que todas las muestras analizadas en 2016 presentaron una mayor concentración que las uvas analizadas en 2017 (Figuras 4.4 E y F).

En las muestras de paredes celulares de la campaña 2016 (Figuras 4.4 E), se observó de forma general un aumento en la concentración de fenoles totales tanto en los tratamientos aplicados en envero como a mitad-de-maduración. Observamos que todos los tratamientos aplicados en envero (excepto el tratamiento con BTH), incrementaron los fenoles totales de la pared celular de las pieles de uvas tratadas. Así mismo, los tres tratamientos aplicados en mitad-de-maduración, también presentaron una mayor concentración de fenoles en la pared celular comparados con las muestras de uvas control, siendo el tratamiento MeJ+BTH el que dio lugar a un mayor incremento.

En la campaña 2017 (Figura 4.4 F), los tratamientos aplicados en envero influyeron en mayor medida frente a los tratamientos aplicados en mitad-de-maduración. En esta campaña observamos que los tratamientos MeJ y MeJ+BTH aplicados durante el envero, incrementaron la concentración de fenoles totales de las paredes celulares. En cambio, ninguno de los tratamientos aplicados en mitad-de-maduración dio lugar a incrementos en la concentración de este componente.

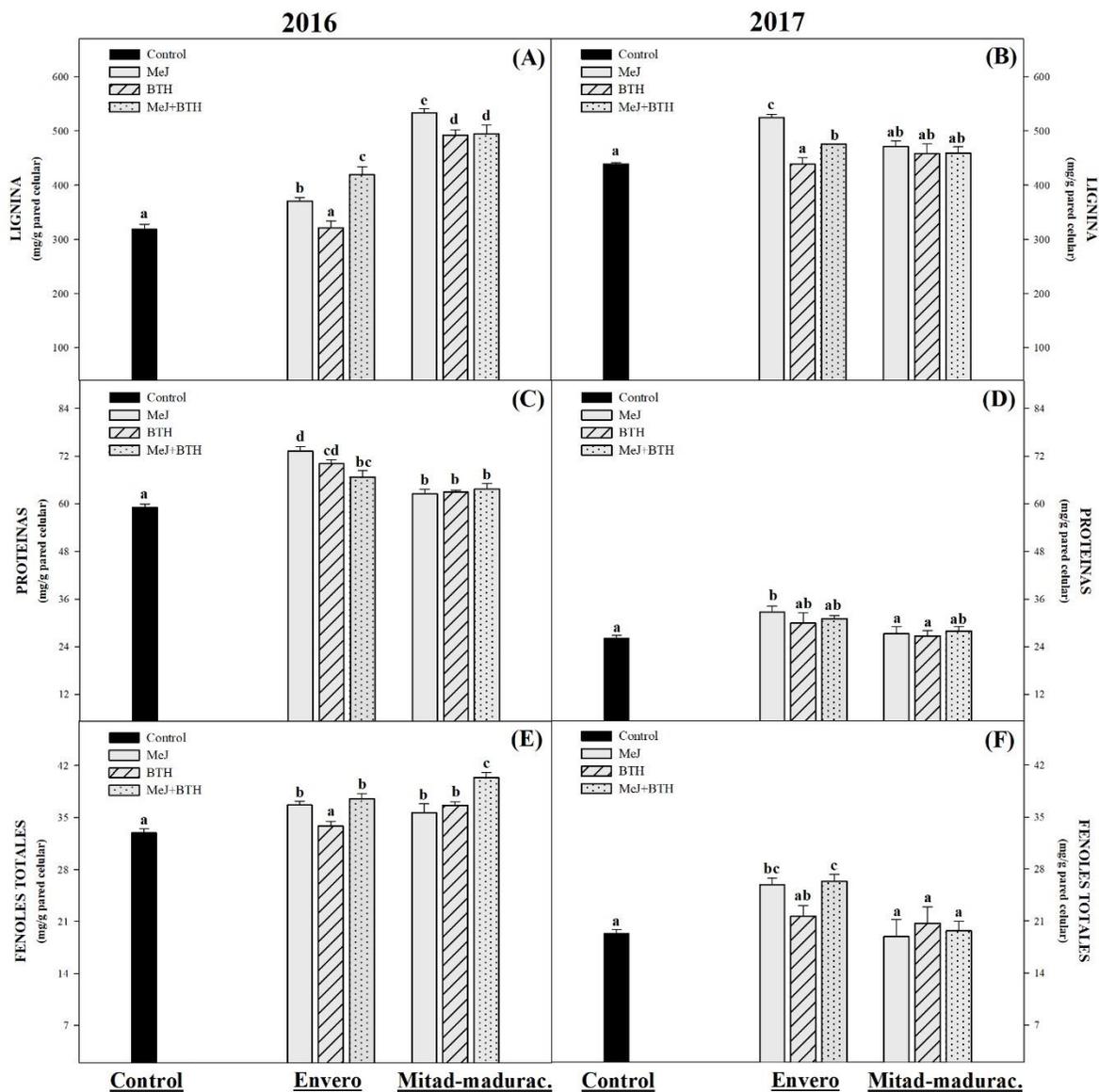


Figura 4.4 Concentración de lignina (A y B), proteínas (C y D) y fenoles totales (E y F) de paredes celulares de piel de uva Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

Al igual que ocurrió con la lignina, los tratamientos MeJ y MeJ+BTH aplicados durante el envero de las dos campañas estudiadas, provocaron incrementos en la concentración de fenoles totales de las paredes celulares. Este incremento podría mejorar los mecanismos de defensa de las bayas Monastrell ante un ataque fúngico, ya que se ha observado que cuando las células vegetales son dañadas o tratadas con moléculas elicitoras

de masa molecular pequeña, activan respuestas de defensa que dan lugar a la producción de una alta concentración de H₂O₂, radicales superóxidos y otras ERO en la pared celular. Este estallido oxidativo parece formar parte de la respuesta defensiva contra la invasión por patógenos. Las ERO pueden atacar directamente a los organismos patógenos, y pueden detener de forma indirecta una posterior invasión por los mismos, al causar una rápida reticulación o entrecruzamiento de los compuestos fenólicos de la pared (Brisson et al., 1994).

En general, los cambios provocados por los tratamientos MeJ y MeJ+BTH durante el envero, fueron más evidentes probablemente por el mayor tiempo transcurrido desde su aplicación (envero) hasta la vendimia (análisis de uvas); en comparación con el tiempo transcurrido entre los tratamientos realizados en mitad-de-maduración y la vendimia. Esto pudo haber dado un mayor margen de acción a las rutas biosintéticas, en la generación y ensamblaje de los componentes estructurales de la pared celular. En este contexto, se ha descrito que, tras la aparición de un estímulo en las plantas, los últimos eventos que se desencadenan en sus mecanismos de defensa son, entre otras cosas, el fortalecimiento de las paredes celulares y la producción de compuestos antimicrobianos, incluidas las fitoalexinas y las proteínas RP, que en conjunto desempeñan un papel fundamental en la contención de los patógenos (Hammond-Kosack & Jones, 1996).

4.4.3 ANÁLISIS MULTIVARIABLE

Se realizó una técnica de análisis multivariable (Tabla 4.2), para obtener una perspectiva global de la influencia de las condiciones ambientales soportadas en cada campaña, el tipo de tratamiento usado, así como el momento de aplicación de estos sobre los componentes de la pared celular de la piel de uvas Monastrell.

Con este análisis fue posible confirmar que las condiciones ambientales experimentadas en cada una de las campañas, fue determinante en la composición de las paredes celulares de la piel de uvas, donde destacamos las condiciones adversas sufridas

durante 2017, ya que se observaron mayores periodos con temperaturas por encima de los 30 °C en comparación con 2016 (Figura 3.2. Apartado 3.3.2), lo que provocó un adelanto del inicio del envero en la variedad Monastrell, en aproximadamente 15 días. Estas condiciones extremas durante 2017, pudieron haber provocado la disminución a prácticamente la mitad la concentración de hemicelulosa, proteínas y fenoles totales en las paredes celulares; por el contrario, se apreció un incremento de celulosa y lignina. No obstante, las pectinas no se vieron afectadas por el efecto añada. A este respecto, en un estudio preliminar también encontramos diferencias destacables en la concentración de los componentes de la pared celular de las variedades Monastrell, Merlot y Cabernet Sauvignon de distintas añadas, a excepción de la pectina y celulosa, cuyas concentraciones no se vieron afectadas (Paladines-Quezada, Moreno-Olivares, Fernández-Fernández, Bautista-Ortín, et al., 2019). Así mismo, en un estudio realizado en la variedad Syrah (Garrido-Bañuelos et al., 2019), los autores también observaron marcadas diferencias en la concentración de los componentes de la pared celular de dos añadas distintas, cuyas diferencias las atribuyeron a las mayores temperaturas soportadas en uno de los años de ensayo; pero a diferencia de nuestro estudio, estos autores encontraron diferencias marcadas en la concentración de pectinas.

En el caso de la aplicación de los tratamientos en las distintas etapas de maduración de Monastrell, estos también afectaron de forma heterogénea a la composición de la pared celular. Pudimos constatar que las uvas tratadas en mitad-de-maduración presentaron una mayor concentración de hemicelulosa y lignina; y a su vez, una menor concentración de pectinas en sus paredes celulares, en comparación con las uvas tratadas en envero. Con respecto a este factor (momento de aplicación), no encontramos información suficiente acerca de la respuesta de las paredes celulares a la aplicación de elicitores en distintas etapas de maduración, para contrastarla con nuestros resultados.

En cuanto al tipo de tratamiento usado y su influencia en cada uno de los componentes de la pared celular, observamos que el tratamiento con BTH fue el único que incrementó la concentración de celulosa. Por otra parte, observamos que todos los tratamientos (MeJ, BTH y MeJ+BTH) provocaron una disminución en la concentración de pectinas, y por el contrario contribuyeron a una mayor acumulación de lignina de las paredes celulares. En el caso de la

concentración de hemicelulosa, proteínas y fenoles totales, no se registraron diferencias significativas entre las uvas tratadas con elicitores y las uvas control. Parte de estos resultados se pueden corroborar con los obtenidos en un estudio anterior (Paladines-Quezada, Moreno-Olivares, Fernández-Fernández, Bautista-Ortín, et al., 2019), en el que MeJ y BTH aplicado al inicio del envero, provocaron una disminución en la concentración de pectinas de las paredes celulares de la piel de la variedad Cabernet Sauvignon, indicando que la respuesta a la aplicación de estos tratamientos podría tener una dependencia varietal.

En las interacciones entre los distintos factores, observamos que la pectina presentó diferencias significativas en todas las interacciones realizadas, siendo la interacción más significativa Año x Momento de Aplicación (AxMA) ($p < 0.001$). La lignina fue otro de los componentes que presentó diferencias significativas en todas las interacciones, a excepción de la interacción Año x Tratamiento (AxT); y al igual que la pectina, la interacción más significativa fue AxMA ($p < 0.001$). Del mismo modo, la hemicelulosa fue otro de los componentes que presentaron diferencias significativas en casi todas las interacciones realizadas; pero a diferencia de la pectina y lignina, la hemicelulosa no registró diferencias en la interacción AxMA, sin embargo, su interacción más significativa ($p < 0.001$) fue en la interacción Tratamiento x Momento de Aplicación (TxMA).

Este análisis general puso de manifiesto que estos 3 componentes de la pared celular (pectina, lignina y hemicelulosa), fueron los más susceptibles a sufrir cambios, cuando interaccionaron los 3 factores estudiados.

En conjunto, las variaciones generadas por los tratamientos en los componentes de las paredes celulares de la piel, hacen intuir que pueden ser capaces de conferir características estructurales más reforzadas en las uvas tratadas, y afectar los procesos de extracción de los constituyentes de la piel como polifenoles y aromas; pero podrían beneficiar directamente a las defensas de la planta frente a organismos potencialmente patógenos. Así mismo, la reducción de pectinas en la piel de las bayas tras la aplicación de los elicitores, podría afectar la concentración de polisacáridos pécticos liberados a los vinos.

Table 4.2 Análisis multivariable de los componentes de las paredes celulares de la piel de uvas Monastrell, tratada con MeJ, BTH y MeJ+BTH, en dos momentos diferentes de maduración: envero y mitad-de-maduración, durante dos campañas (2016 y 2017).

FACTOR		Componentes de la pared celular					
		Glucosa Celulósica (Celulosa)	Glucosa no-celulósica (Hemicelulosa)	Ácidos Urónicos (Pectinas)	Lignina	Proteína	Fenoles Totales
AÑO	2016	146 ± 14 a	40 ± 8 b	295 ± 89 a	414 ± 84 a	66 ± 5 b	36 ± 2 b
	2017	162 ± 22 b	22 ± 11 a	298 ± 18 a	467 ± 33 b	29 ± 4 a	22 ± 4 a
MOMENTOS DE APLICACIÓN	Envero	153 ± 23 a	27 ± 13 a	326 ± 46 b	414 ± 71 a	49 ± 20 a	29 ± 7 a
	Mitad de maduración	156 ± 15 a	36 ± 12 b	254 ± 59 a	482 ± 34 b	44 ± 18 a	28 ± 10 a
TRATAMIENTOS	Control	150 ± 15 ab	37 ± 7 a	351 ± 35 b	379 ± 66 a	43 ± 18 a	26 ± 7 a
	MeJ	139 ± 15 a	29 ± 18 a	287 ± 70 a	471 ± 69 b	48 ± 21 a	29 ± 8 a
	BTH	168 ± 23 c	32 ± 11 a	297 ± 69 a	427 ± 71 ab	47 ± 20 a	28 ± 8 a
	MeJ+BTH	158 ± 12 bc	29 ± 12 a	277 ± 46 a	460 ± 35 b	46 ± 19 a	30 ± 9 a
INTERACCIONES	A x T	ns	*	*	ns	ns	ns
	A x MA	ns	ns	***	***	ns	**
	T x MA	ns	***	*	**	**	ns
	A x T x MA	*	*	*	*	ns	ns

Abreviaciones: MeJ: Metil Jasmonato; BTH: Benzotiadiazol. Todos los componentes individuales de la pared celular están expresados en mg g⁻¹ de pared celular. Fenoles totales (mg de ácido gálico), proteínas (mg de albúminas de suero bovino), lignina (mg), ácidos urónicos (mg de ácido galacturónico), glucosa celulósica y no-celulósica (mg de glucosa). Diferentes letras en la misma columna y factor indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$). Separación por el test de rangos múltiples a un nivel del 99,9 % *** ($p < 0.001$), 99 % ** ($p < 0.01$) y 95 % * ($p < 0.05$) y ns no significativo.

**CAPÍTULO 5. EFECTO DEL MOMENTO
DE APLICACIÓN DE LOS ELICITORES
SOBRE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA**

5.1 INTRODUCCIÓN

En el capítulo 2 hablamos de la importancia de los compuestos fenólicos en el ámbito de la vitivinicultura, y su influencia en las propiedades organolépticas y funcionales de la uva y del vino. En este capítulo abordaremos la biosíntesis, clasificación, estructura y características químicas de las principales familias de compuestos fenólicos presentes en las uvas y vinos. Además, se presentarán los resultados obtenidos en los distintos compuestos fenólicos, y algunos de los parámetros más relacionados.

5.2 BIOSÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La biosíntesis de compuestos fenólicos se realiza a través de las vías flavonoide y fenilpropanoide, a partir del aminoácido fenilalanina (producto de la vía del ácido siquímico), que vincula el metabolismo de los carbohidratos con la biosíntesis de los aminoácidos aromáticos y los metabolitos secundarios (Castellarin et al., 2012; Sparvoli et al., 1994). En la Figura 5.1 se muestra un esquema de la biosíntesis fenólica que comienza con la fenilalanina, y termina con compuestos que se acumulan como productos solubles en las células de las bayas de uva. Mientras que en las células que producen lignina, los ácidos cinámicos libres y sus ésteres de CoA se convierten en alcohol p-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinápico. Estos alcoholes son los sustratos de las reacciones de polimerización que producen lignina (Adams, 2006).

Se ha visto, que solo los antocianos de la piel parecen comportarse de forma similar a los productos finales típicos, y parecen mostrar poca renovación una vez formados. Los otros grupos de compuestos fenólicos muestran patrones de acumulación y posterior declive durante la maduración, lo que sugiere su degradación, utilización en la biosíntesis de otros compuestos o asociación covalente con otros componentes celulares. En todos los casos se sabe mucho más acerca de la forma en que se producen las diversas clases de polifenoles de la uva, que acerca de lo que sucede con ellas cuando muestran una disminución en la baya durante la maduración (Adams, 2006).

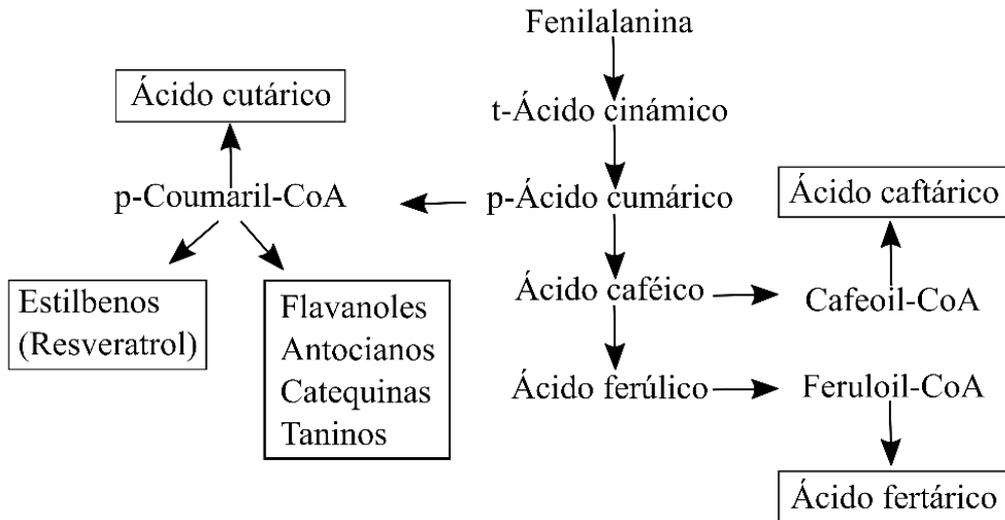


Figura 5.1 Ruta bioquímica que conduce a la formación de los principales grupos de compuestos fenólicos solubles presentes en las uvas. Adaptado de Adams, 2006.

La secuencia biosintética que conduce a los flavonoides comienza en la reacción de la chalcona sintasa (Figura 5.2) donde la p-cumaril-CoA se combina con tres malonil-CoA para dar una chalcona y CO₂. Si el éster de CoA utilizado por la chalcona sintasa es el del ácido cafeico, entonces el producto de la chalcona tendría el patrón de sustitución en el anillo B que corresponde al que se encuentra en la catequina, la epicatequina y la cianidina (Adams, 2006).

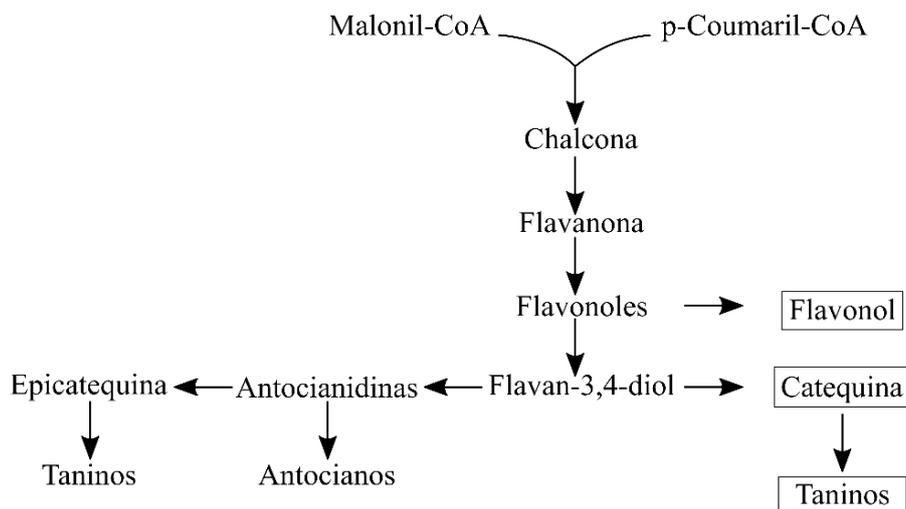


Figura 5.2 Ruta bioquímica de los mayores flavonoides presentes en las uvas. Adaptado de Adams, 2006.

Sin embargo, si la reacción de la chalcona sintasa en la uva utiliza predominantemente p-cumaril-CoA, como se muestra típicamente, entonces la uva también debe tener hidroxilasas 3' y flavonoides 3'5' muy eficientes para explicar el predominio de los compuestos dihidroxilados y trihidroxilados que se encuentran en la baya. La presencia de kaempferol y dihidro-kaempferol junto con sus 3 glucósidos sustituidos, apoya la idea de que al menos parte de la chalcona sintasa utiliza p-cumaril CoA . En cualquier caso, se cree que la hidroxilación del anillo B para dar los derivados dihidroxilados y trihidroxilados ocurre a nivel de la flavonona o el flavonol (Boss et al., 1996).

5.3 CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

Este tipo de compuestos se caracterizan por poseer un anillo bencénico aromático con al menos un grupo hidroxilo (-OH) y una cadena lateral funcional (-R). En función del número de anillos y del número y tipo de sustituyentes unidos a ellos, en las uvas y vinos podemos distinguir dos grandes grupos (Figura 5.3): los compuestos fenólicos no flavonoides y los flavonoides (Cheynier et al., 2000; Crozier et al., 2009).

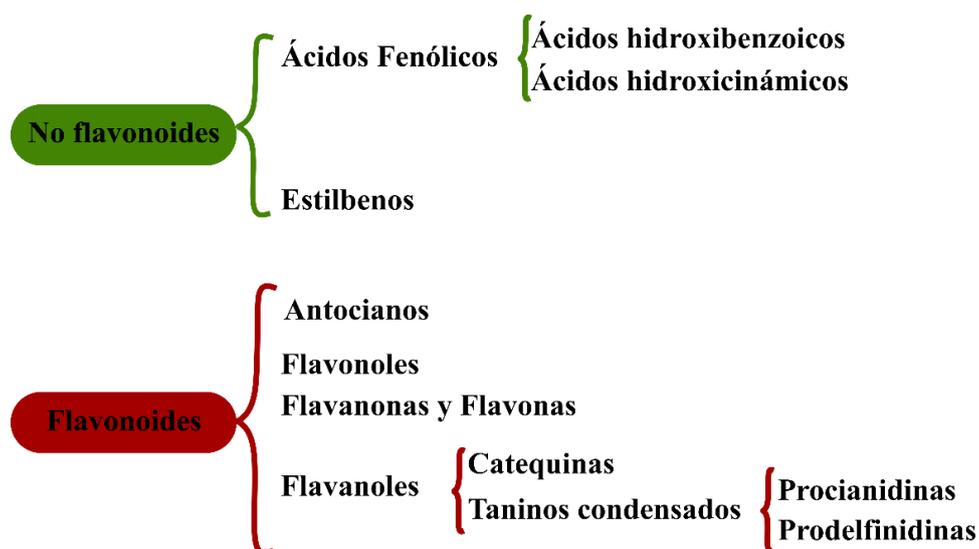


Figura 5.3 Clasificación de los compuestos fenólicos

5.3.1 COMPUESTOS FENÓLICOS NO FLAVONOIDES

Los compuestos fenólicos no flavonoides presentes en la uva y en el vino son los ácidos fenólicos y estilbenos (Cheynier et al., 2000). La importancia de algunos de estos compuestos, está determinada por su participación en la astringencia y amargor de los vinos (Boulton, 2001; Hufnagel & Hofmann, 2008), o en el pardeamiento de vinos blancos (Singleton et al., 1984).

5.3.1.1 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos en función de su estructura se pueden clasificar en dos subgrupos: ácidos hidroxibenzoicos, que tienen en común una estructura C6-C1; y ácidos hidroxicinámicos, que tienen en común una estructura C6-C3 (Figura 5.4). Los dos tipos de ácidos pueden estar en forma libre o esterificada con el ácido tartárico u otros componentes del vino. Los ácidos fenólicos son incoloros, pero la esterificación con el ácido tartárico les hace particularmente oxidables (Singleton et al., 1984), y pueden influir además en la astringencia y amargor de los vinos (Boulton, 2001).

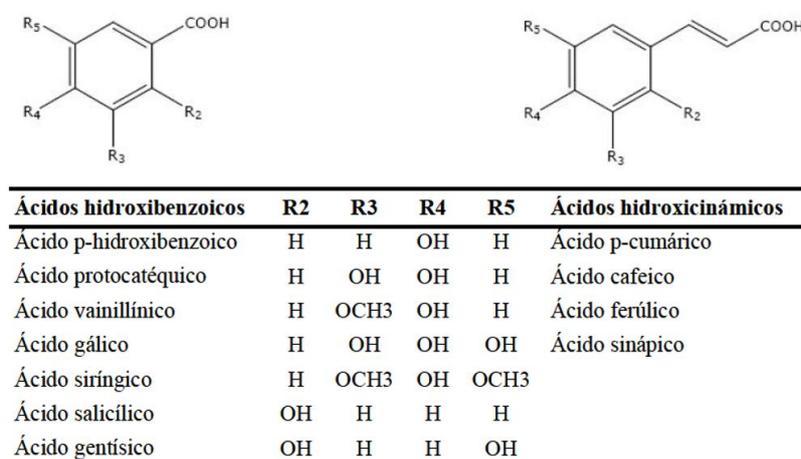


Figura 5.4 Estructura química de los ácidos fenólicos (Ribéreau-Gayon et al., 2003)

El ácido hidroxibenzoico más abundante en la uva y en el vino es el ácido gálico. En la uva se lo puede encontrar en forma de éster de flavan-3-ol como (-)-epicatequina-3-galato. Este ácido se encuentra también en concentraciones importantes en el vino,

especialmente en vinos criados en barricas de roble, al ser liberado al vino por la hidrólisis de los taninos hidrolizables de la madera (Garrido & Borges, 2013).

Los ácidos hidroxicinámicos por su parte, se acumulan en vacuolas de células de la piel y de la pulpa como ésteres tartáricos, y sus concentraciones oscilan entre 0,06 a 0,78 mg/g de piel, en función del tipo de ácido y de la cepa (Quijada, 2014), siendo los principales el ácido caftárico, cutárico y fertárico.

En los vinos se encuentran formando glicósidos o ésteres, o combinados con antocianos, en concentraciones en torno a 100 mg/L (Rentzsch et al., 2009). Además, pueden tener un gran impacto organoléptico en el vino al reaccionar con los antocianos formando copigmentos, que contribuyen a la estabilidad del color de los vinos jóvenes (Boulton, 2001).

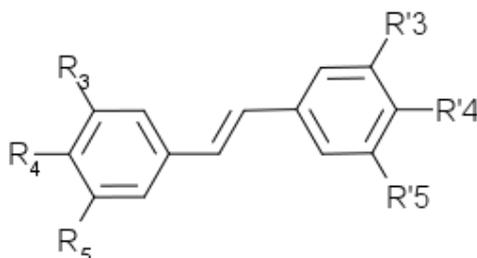
5.3.1.2 Estilbenos

Los estilbenos son compuestos sintetizados por las plantas como respuesta a ataques fúngicos (principalmente *Botrytis cinerea*), y a otras situaciones de estrés biótico y abiótico (Bavaresco et al., 2009; Portu, 2017), confiriendo mayor resistencia a la planta frente a enfermedades. Por ejemplo, tras un ataque fúngico en las hojas, el trans-veratrol es sintetizado y transformado en derivados más tóxicos como son las viniferinas (Jeandet et al., 2002; Ruiz-García, 2014).

Estos compuestos se encuentran mayoritariamente en la piel de la uva, y son cedidos al mosto durante el proceso de vinificación. A pesar de encontrarse en concentraciones mucho más bajas que el resto de compuestos fenólicos, y de no influir de manera clara en las características sensoriales de los vinos (Del Barrio-Galán, 2012; Quijada, 2014), en los últimos años han despertado un gran interés en el campo de la enología, debido a los posibles beneficios que ejercen sobre la salud humana (Athar et al., 2007; Gil-Cortiella, 2013; Opie & Lecour, 2007).

Estos compuestos pertenecen al grupo de las fitoalexinas, cuya estructura está formada por dos anillos bencénicos unidos por un doble enlace (C6-C2- C6), lo que les convierte en compuestos altamente reactivos (Del Rio et al., 2013). Además, los

estilbenos más representativos en la uva y en el vino son el trans-resveratrol y su derivado glucosilado, el trans-piceido (Figura 5.5). En el caso del resveratrol, es sabido que tiene la capacidad de formar complejos oligoméricos y poliméricos conocidos como viniferinas (Flamini et al., 2013). Las formas polimerizadas se encuentran principalmente en las partes lignificadas de la planta, como el raspón, los sarmientos o las raíces (Esatbeyoglu et al., 2016; Portu, 2017; Winterhalter et al., 2015).



	R ₃	R ₄	R ₅	R' ₃	R' ₄	R' ₅
<u>Piceatanol</u>	OH	H	OH	OH	OH	H
<u>Trans-resveratrol</u>	OH	H	OH	H	OH	H
<u>Trans-pterostilbeno</u>	OCH ₃	H	OCH ₃	H	OH	H
<u>Trans-piceido</u>	Gluc	H	OH	H	OH	H

Figura 5.5 Estructura de los principales estilbenos de *Vitis vinifera*.

Si bien, la concentración de los estilbenos depende principalmente de la incidencia de algunas enfermedades fúngicas y de otros factores de estrés, el contenido está también relacionado con numerosos factores, entre los que se incluye la variedad de uva, factores climáticos, radiación ultravioleta, y prácticas enológicas entre otras (Bavaresco et al., 2009; Larronde et al., 2003; Lopez-Alfaro et al., 2013).

5.3.2 COMPUESTOS FENÓLICOS FLAVONOIDES

Los compuestos fenólicos flavonoides se caracterizan por tener una estructura básica de 15 átomos de carbono (Figura 5.6), conformando un sistema C₆-C₃-C₆, que consiste básicamente en 2 anillos aromáticos denominados A y B, unidos por una cadena de 3 átomos de carbono, que normalmente está cerrado formando un anillo heterociclo oxigenado denominado C (Cheynier et al., 2000). Esta estructura de carbono es

responsable de la diversidad química de esta familia de compuestos (Garrido & Borges, 2013).

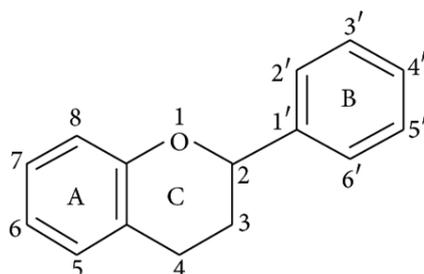


Figura 5.6 Estructura básica de los compuestos fenólicos flavonoides.

Los compuestos fenólicos flavonoides han sido descritos como los compuestos fenólicos más abundantes tanto en la uva como en el vino. En la uva se localizan principalmente en las capas periféricas de la piel y en algunas capas externas de la semilla, siendo los principales representantes: los flavonoles, los antocianos, y los flavan-3-oles o flavanoles (Teixeira et al., 2013).

5.3.2.1 Antocianos

Los antocianos (del griego *anthos* flor y *kyanos* azul) son los compuestos responsables de la pigmentación roja, púrpura y azul de las bayas de uva y, consecuentemente, del vino tinto (Teixeira et al., 2013). Se sintetizan básicamente en la piel de las variedades de uva tinta, aunque en las variedades tintoreras están presentes también en la pulpa (Castillo-Muñoz, Fernández-González, et al., 2009; Cheynier et al., 2000). En la célula se localizan en los antocianoplastos, orgánulos especializados para su generación y almacenamiento (Nogales-Bueno, 2017), cuya acumulación en las variedades de uva tinta empieza en el envero, y alcanza su máximo en las últimas fases de maduración de la baya, cuando la síntesis se detiene (Teixeira et al., 2013).

Estructuralmente, si los antocianos se encuentran en forma de aglicona se habla de antocianidinas mientras que si se hallan glicosilados se denominan antocianos o antocianinas (se encuentra unida a un monoglucósido, normalmente glucosa) (Cheynier et al., 2000) (Figura 5.7).

En *Vitis vinifera* encontramos que los antocianos más comúnmente presentes son: la delphinidina, la cianidina, la petunidina, la peonidina y la malvidina 3-glucósido, 3-(6-acetil)-glucósido y 3-(6-p-cumaril)-glucósido, la peonidina y la malvidina 3-(6-cafeil)-glucósido, siendo la malvidina-3-*O*-glucósido generalmente la principal antocianina presente junto con sus formas aciladas (He, Mu, et al., 2010). No obstante, varios autores han descrito la presencia de 3-*O*-glucósido de pelargonidina en la uva, aunque en concentraciones bajas (Castillo-Muñoz, Fernández-González, et al., 2009; He et al., 2010).

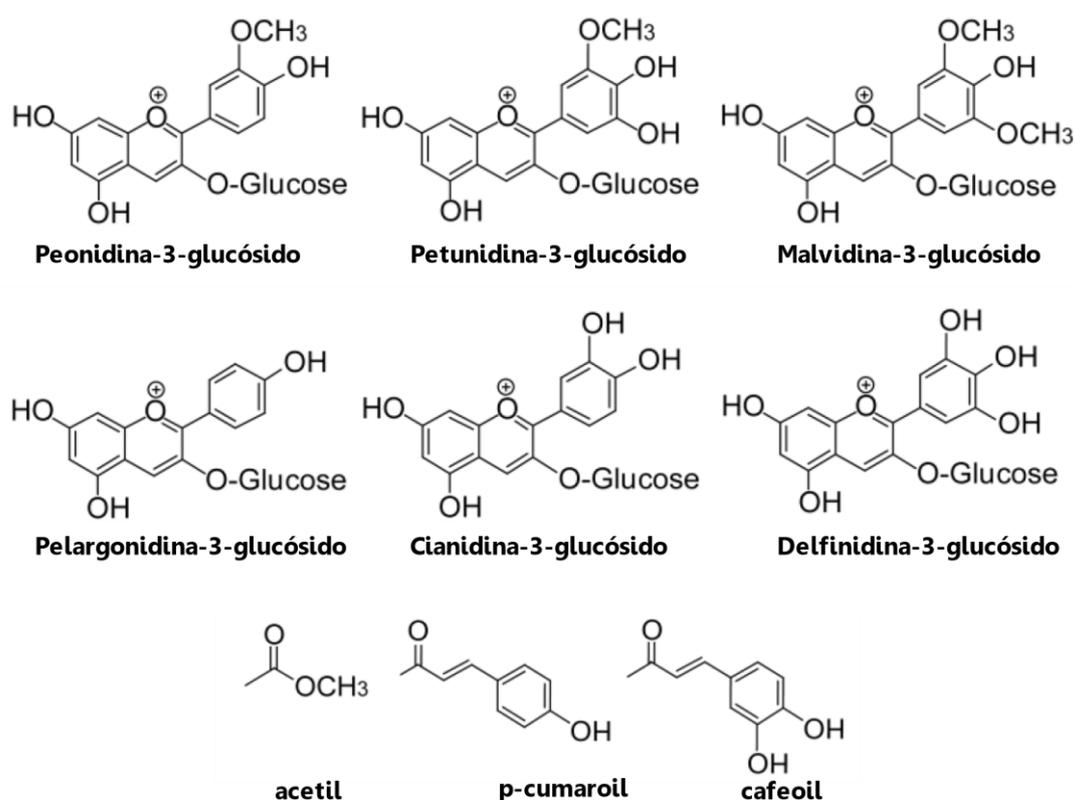


Figura 5.7 Estructuras de antocianos monoglucósido y grupos acil ligados a antocianos monoglucósido en uva.

En este sentido, se ha descrito que el número y tipo de sustituyentes del anillo B (Ver figura 5.6), determinará las propiedades de los antocianos. Por ejemplo, los antocianos trihidroxilados (derivados de malvidina, delphinidina y petunidina) presentan tonalidades más azules que los dihidroxilados (derivados de cianidina y peonidina), mientras que los antocianos metilados (derivados de peonidina, petunidina y malvidina) muestran tonalidades más rojas (Jackson, 2008).

Así mismo, diversos estudios han demostrado que el perfil de los antocianos es característico para cada variedad (Arozarena et al., 2000; Gil-Muñoz et al., 2010); sin embargo, la concentración de los mismos depende en gran medida de la variedad de uva, del estado de madurez, de la zona de producción, las condiciones climáticas, etc. (Gil-Muñoz et al., 2010; Mazza, 1995). Por lo que podremos encontrar, que las pieles de uvas tintas presenten concentraciones en el rango entre 500 y 3000 mg/Kg (Ferrandino et al., 2012). No obstante, la concentración de antocianos en los vinos dependerá tanto del que presenten las uvas a la entrada en bodega, como de las técnicas de vinificación empleadas. El contenido máximo de antocianos en el mosto-vino se alcanza unos días después de iniciarse la maceración de las uvas, y va disminuyendo a continuación debido a fenómenos de precipitación de materia coloidal, de adsorción en las paredes celulares de las levaduras y a la transformación de los antocianos en compuestos derivados (He et al., 2012b; Quijada, 2014).

5.3.2.2 Flavonoles

Los flavonoles son pigmentos ligeramente amarillos que, en el caso de las bayas de uva, se sintetizan en la piel, y están estrechamente relacionados con la protección de la uva frente a la radiación ultravioleta (Ruidavets et al., 2000); por lo que su síntesis depende principalmente del grado de iluminación que reciben los racimos (Carbonell-Bejerano et al., 2014). En los vinos blancos, son responsables del color amarillo (Castillo-Muñoz et al., 2010); mientras que en los vinos tintos, el color de los flavonoles se ve enmascarado por los pigmentos rojos de los antocianos, y, a pesar de encontrarse en bajas concentraciones en los vinos tintos, su presencia es importante ya que forman complejos de copigmentación muy estables con los antocianos (Boulton, 2001; Martínez-Pinilla et al., 2012).

Los flavonoles sintetizados en las bayas de uva solamente existen como forma heterósida (3-*O*-glicósidos), unidos fundamentalmente a glucosa, galactosa y ácido glucurónico (Castillo-Muñoz, Gómez-Alonso, et al., 2009), entre los que encontramos al kaempferol, la quercetina, la miricetina, y sus formas metiladas, la isoramnetina, la laricitrina y la sirinetina (Figura 5.8) (Goddard et al., 2010; Sampaio & Gonçalves, 2008). En las bayas de uvas, las concentraciones de flavonoles varían ampliamente desde

10 a 300 mg/Kg, dependiendo de la variedad (Ferrandino et al., 2012). Además, el contenido de flavonoles es en promedio más alto en las variedades tintas que en las blancas (Gerós et al., 2012).

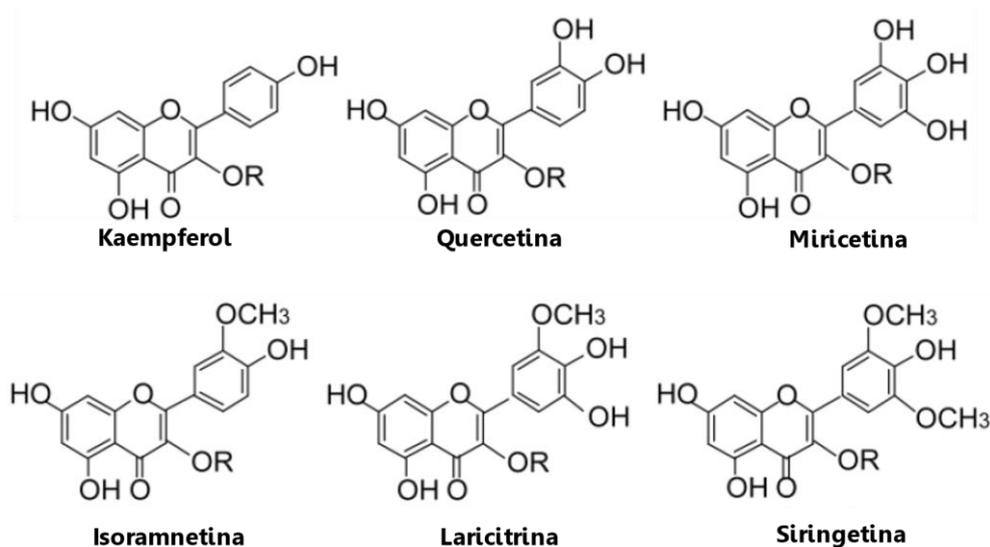


Figura 5.8 Estructuras de flavonoles en uva.

Sin embargo, en el vino pueden encontrarse tanto los flavonoles glicosilados, como sus correspondientes agliconas libres, resultantes de la hidrólisis ácida de los correspondientes glicósidos que tiene lugar durante la fermentación alcohólica (Castillo-Muñoz, Gómez-Alonso, et al., 2009). Son fácilmente extraíbles durante la vinificación, aunque son poco solubles en agua y requieren de la presencia del etanol; además contribuyen a las sensaciones gustativas del vino, por el carácter amargo conferido por los derivados de quercetina, mientras que compuestos como la siringetina-3-*O*-glucósido y la quercetina-3-*O*-rutinósido contribuyen a la astringencia (Casassa & Harbertson, 2014; Gómez-Míguez et al., 2006; Schwarz et al., 2005).

5.3.2.3 Flavanoles o flavan-3-oles

Los compuestos fenólicos más abundantes en las bayas de uva son los flavanoles o flavan-3-oles. Se encuentran en forma de monómeros o como parte de estructuras poliméricas conocidas como proantocianidinas o taninos condensados, que se originan a partir de los flavanoles monoméricos. En la uva encontramos cinco flavanoles

monoméricos (Figura 5.9): (+)-catequina y su isómero (-)-epicatequina, (+)-galocatequina, (-)-epigalocatequina y (-)-epicatequina-3-*O*-galato (Mattivi et al., 2009). Estos flavanoles monoméricos son detectables en todas las partes de la baya, encontrando las mayores concentraciones en las semillas, seguidas de la piel, y en mucho menor medida en la pulpa (Kennedy et al., 2000; Verries et al., 2008).

Las proantocianidinas por su parte, son polímeros compuestos por subunidades de flavanol que se enlazan por medio de enlaces interflavánicos 4-6 y 4-8. Pertenecen a un grupo muy diverso de compuestos, que varían en tamaño dependiendo del número de subunidades, que van desde dímeros hasta polímeros con más de 40 subunidades (Downey et al., 2003; Hanlin & Downey, 2009).

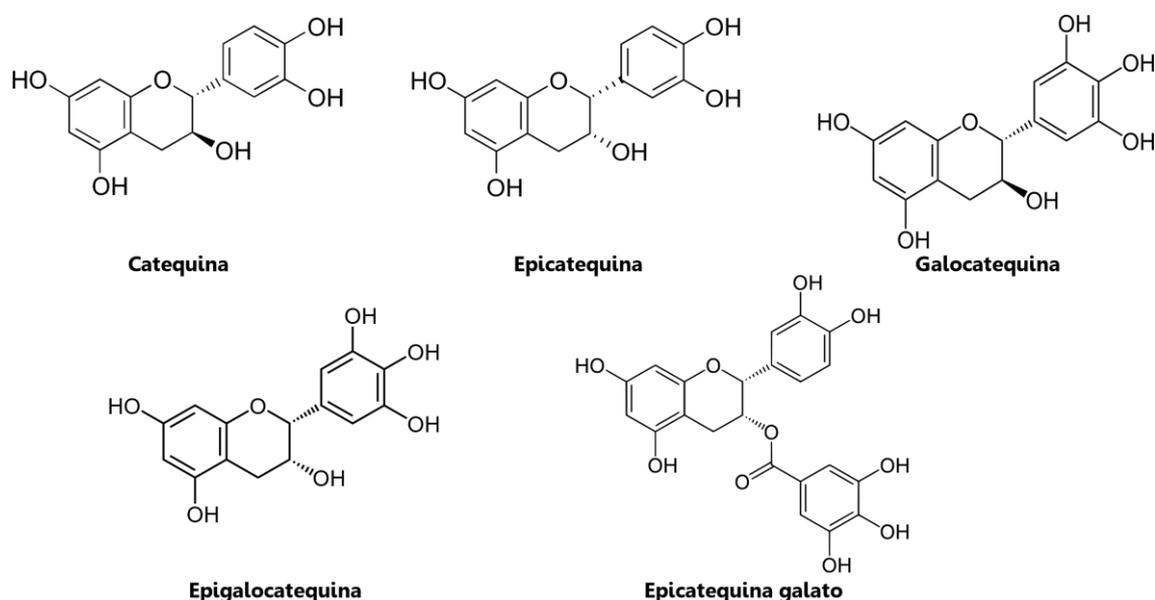


Figura 5.9 Estructura química de los flavan-3-oles en uva

La composición de flavanoles y proantocianidinas en las semillas y la piel de las bayas es diversa entre variedades, pero relativamente estable dentro de cada variedad, lo que sugiere un efecto de genotipo predominante (Mattivi et al., 2009). Los flavanoles dihidroxilados: catequina, epicatequina y la forma galoilada, epicatequina-3-*O*-galato, predominan en las semillas. La piel de las bayas también contiene estas formas, así como los flavanoles trihidroxilados, galocatequina y epigalocatequina (Gerós et al., 2012). Además, las proantocianidinas tienen características distintas dependiendo de si proceden de las pieles o semillas. Así, las proantocianidinas de las pieles se distinguen de las de

semillas, por un grado medio de polimerización más elevado y una menor proporción de unidades galoiladas (Cheynier et al., 2000).

El concepto de grado medio de polimerización (gmP) hace relación al tamaño medio de las proantocianidinas, el cual fluctúa durante el desarrollo y la maduración del fruto (Downey et al., 2003; Kennedy et al., 2001; Pastor del Rio & Kennedy, 2006). En las semillas, el gmP puede ser del orden de 11, y de 30 en la piel de ciertas variedades (Prieur et al., 1994; Souquet et al., 1996). Por su parte, el gmP en los vinos es normalmente más bajo que en las bayas (alrededor de 7), ya que durante la vinificación sólo se extrae una fracción variable de flavanoles y proantocianidinas presentes en las uvas (Mattivi et al., 2009; Pastor del Rio & Kennedy, 2006). En cambio, el porcentaje de galoilación se refiere a la proporción de unidades galoiladas, las cuales se forman cuando un polímero de catequina incluye una molécula de ácido gálico esterificada en el carbono 3. En este caso hablaríamos de una unidad de catequina galoilada (Cheynier et al., 2000; Souquet et al., 1996). Por lo tanto, el gmP y el porcentaje de galoilación forman parte de las características estructurales de las proantocianidinas. Éstas, junto con la concentración de proantocianidinas presentes en uvas y vinos, tienen una importante relación con las características sensoriales de los vinos tintos, como son el color, amargor y astringencia (Vidal et al., 2003). En definitiva, el conocimiento de la concentración y la composición estructural de las proantocianidinas de la uva y del vino es esencial para definir las características del vino (Busse-Valverde, 2013).

En lo referente al color, pese a que estos compuestos son incoloros en disolución, pueden formar asociaciones con los antocianos presentes en los vinos, dando lugar a fenómenos de copigmentación o a la formación de nuevos pigmentos, con características colorimétricas diferentes a los antocianos nativos (Quijada, 2014). Los aspectos relacionados con la participación de las proantocianidinas en las características colorimétricas del vino, se detallan más adelante (apartado 5.5.3).

En cuanto a la sensación de astringencia de un vino, ésta se debe a la capacidad que tienen las proantocianidinas de interaccionar con las proteínas de la saliva. Estas interacciones dependen en gran medida, de la composición y el tamaño de las propias proantocianidinas (Sarni-Manchado et al., 1999; Vidal et al., 2003), y de la naturaleza de la proteína. Actualmente se acepta que la astringencia aumenta con el grado medio de

polimerización de la proantocianidina y con la proporción de subunidades galoiladas (Chira et al., 2009, 2012; De Freitas & Mateus, 2001). Por el contrario, los flavanoles monoméricos y sus polímeros más pequeños son los principales responsables del sabor amargo (Peleg et al., 1999).

5.3.3 EL COLOR DEL VINO Y PARÁMETROS DE COPIGMENTACIÓN

El color del vino es una de las características organolépticas más importantes, no sólo porque es la primera e inmediata imagen que percibimos de él, sino también porque es indicador de otros aspectos relacionados con su sabor (Bautista-Ortín, 2005). Además, a la hora de evaluar su calidad, proporciona al catador y al consumidor información sobre los defectos y virtudes del vino, su edad, evolución y estado de conservación (Jackson, 2009). Este parámetro está relacionado en gran medida con la presencia de antocianos y taninos (proantocianidinas). Por lo que las medidas iniciales, y todas las modificaciones que se den en el color del vino dependerán de varios factores como: el grado de extracción de antocianos y taninos durante el período de maceración, de las condiciones del medio y de las posteriores modificaciones de estas moléculas durante el proceso de envejecimiento (Romero-Cascales, 2008).

Otro de los procesos que contribuyen a explicar el incremento y la estabilización del color del vino tinto, es el fenómeno conocido como copigmentación (el de mayor importancia para vinos jóvenes). Cabe destacar que a medida que los vinos envejecen, la copigmentación va perdiendo influencia frente a la formación de nuevos pigmentos derivados de los antocianos procedentes de la uva (Boulton, 2001).

La copigmentación es un fenómeno que se produce típicamente en medio acuoso y que afecta a los antocianos monoméricos a la vez que a otros compuestos fenólicos presentes en el medio, denominados cofactores de copigmentación o copigmentos (Ruiz-García, 2014). Este fenómeno consiste en la formación de complejos, en los que el antociano bajo una de sus formas coloreadas se asocia a otra molécula (copigmento), dando lugar a estructuras tipo sándwich con un número de capas variable comprendidas entre 2 y 10 (Bautista-Ortín, 2005). La formación del complejo antociano-copigmento se basa en interacciones débiles no covalentes (de baja energía) que se forman con facilidad,

pero también que se pueden disociar fácilmente, y están relacionadas con interacciones hidrofóbicas de tipo π - π entre los anillos aromáticos del antociano y el copigmento (He et al., 2012a).

Según la naturaleza del copigmento implicado, la copigmentación puede ser intramolecular cuando un antociano se une con otro antociano, o intermolecular cuando un antociano se une a otra molécula diferente (ácido cinámico, flavanol y flavonol o sus glicósidos). Las formas flavilium son atrapadas por los copigmentos, produciéndose un desplazamiento del equilibrio de la hidratación hacia las formas flavilium (rojas) o hacia bases quinónicas (azules) (Moreno-Pérez, 2013; Romero-Cascales, 2008; Vivar-Quintana et al., 2002).

Las estructuras tipo sándwich fruto de la copigmentación, generan un entorno hidrofóbico que protege al antociano de la adición nucleófila, que conlleva la desaparición del color (He et al., 2012a), de tal manera que una proporción mayor de antocianos de la que correspondería de acuerdo con el pH del vino contribuirán al color, siempre que en el medio existan los copigmentos adecuados. Por lo que la copigmentación da lugar a un incremento de la intensidad de color (efecto hiperocrómico) y a un viraje de éste hacia tonalidades más azuladas (efecto batocrómico) (Boulton, 2001).

La copigmentación en vinos jóvenes involucra prácticamente la mitad de los antocianos monoméricos, pudiendo llegar a representar entre el 30 y el 50 % del color del vino, a pesar de que hay algunos resultados contradictorios que indican que la copigmentación se mantiene más allá de la crianza en barrica o en botella. Por lo general se acepta que este fenómeno de copigmentación pierde importancia a partir de los nueve meses, debido fundamentalmente a la transformación de los antocianos monoméricos libres en pigmentos poliméricos que, debido a su estructura, no se pueden copigmentar (Gil-Cortiella, 2013). De hecho, se ha postulado que precisamente la copigmentación puede ser el paso previo a la formación de pigmentos poliméricos más estables, facilitando la formación de uniones covalentes entre antocianos y flavanoles (Escribano-Bailón et al., 1996), de tal modo que se podría decir que la copigmentación permite actuar como un reservorio de antocianos, permitiendo que los antocianos extraídos permanezcan coloreados y estables en solución hasta que se formen pigmentos poliméricos mucho más estables.

5.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se describen los resultados obtenidos durante las dos campañas, de los análisis de uvas de la variedad Monastrell tratadas en campo con MeJ, BTH y una mezcla de ambos, en dos etapas distintas de maduración de las bayas; así como los vinos elaborados a partir de estas uvas. En la uva se analizaron los parámetros físico-químicos habituales en el momento de la vendimia, además de un análisis más detallado por cromatografía líquida de la composición fenólica.

Así mismo, tras finalizar la fermentación alcohólica del vino, se determinaron varios de los parámetros clásicos relacionados con su calidad, tales como el grado alcohólico, acidez total, pH y acidez volátil. Además, se midieron varias características fenólicas y cromáticas por espectrofotometría. Finalmente, al igual que en la uva, se realizó un análisis pormenorizado por cromatografía líquida de la composición fenólica.

5.4.1 CALIDAD DE LA UVA EN EL MOMENTO DE LA VENDIMIA

Los resultados obtenidos para los diferentes parámetros medidos se muestran en la Tabla 5.1. Estos resultados indicaron que durante la campaña 2016, el peso medio de 100 bayas fue de 154,8 gramos, frente a los 165,7 gramos registrados en 2017. El mayor peso de las bayas observado en este último año, pudo deberse a una mayor absorción de agua por parte de la planta, debido a que en 2017 se registró una mayor precipitación entre los meses de julio y agosto (54,2 mm), en comparación con los 2,6 mm acumulados durante el mismo periodo en 2016 (Figura 3.2. Apartado 3.3.2). Este hecho pudo haber acelerado el crecimiento de las bayas a través de la expansión celular (Coombe & Bishop, 1980), ya que durante esta etapa se produce una gran actividad fisiológica debido al crecimiento y maduración de las bayas, acumulándose una cantidad significativa de agua, y en consecuencia aumentando su peso. Reyerer et al. (1999) también observaron que las uvas de la variedad Monastrell alcanzaron un mayor tamaño con el aumento de las precipitaciones, ya que esta variedad responde rápidamente a la disponibilidad de agua. Hay que tener en cuenta que el tamaño de la baya es considerado un factor de calidad, al ser la piel el lugar donde se concentran los componentes principales que serán liberados durante la vinificación (Doco & Brillouet, 1993; Saulnier et al., 1991). Por lo que un

mayor tamaño de uva repercutirá en una menor relación piel/pulpa, lo que significa que los compuestos fenólicos y aromáticos se encontrarán más diluidos en el mosto (Moreno-Pérez, 2013; Ortega-Regules, 2006).

Por otra parte, el efecto de la aplicación de elicitores sobre el peso medio de las bayas durante 2016, mostró que los tratamientos aplicados en mitad-de-maduración tuvieron un mayor efecto sobre este parámetro, en comparación con los tratamientos aplicados en envero. Así encontramos, que el tratamiento con MeJ+BTH aplicado en envero fue el único que logró incrementar el peso medio de las bayas. En relación a esto, otros estudios en los que también se realizaron tratamientos en la época de envero, encontraron que BTH aplicado en Monastrell incrementó el peso de las bayas solamente en una de las dos añadas de estudio (Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012); lo mismo sucedió con MeJ aplicado sobre las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon de un estudio preliminar, en el que también se incrementó el peso de las bayas solo en una de los dos años de estudio (Paladines-Quezada, Moreno-Olivares, Fernández-Fernández, Bautista-Ortín, et al., 2019). Así mismo, se observaron incrementos del peso de las bayas por la aplicación de MeJ y BTH en la variedad Syrah, mientras que Merlot y Monastrell no sufrieron cambios (Gil-Muñoz, Bautista-Ortín, et al., 2017); sin embargo, en otro ensayo no se observaron incrementos tras la aplicación de MeJ en la variedad Tempranillo (Garde-Cerdán et al., 2016; Portu et al., 2015). Por otro lado, encontramos que todos los tratamientos aplicados a las plantas en mitad-de-maduración (MeJ, BTH, y MeJ+BTH) causaron incrementos en el peso de las bayas, siendo el tratamiento BTH el que más incrementó este parámetro.

En la campaña 2017, las bayas de Monastrell también respondieron de forma diferente a los tratamientos según el momento de aplicación. Nuevamente observamos que la respuesta a los tratamientos aplicados en mitad-de-maduración sobre el peso de las bayas, fue más notable que los tratamientos aplicados en envero. De hecho, en envero no se registraron diferencias entre el peso medio de las uvas tratadas y las uvas control. Pero en mitad-de-maduración, los tratamientos MeJ y BTH sí que provocaron incrementos en el peso medio de las bayas, obteniendo por tanto resultados similares a lo observado en los tratamientos de mitad-de-maduración de 2016.

Con respecto a los °Brix analizados en las dos campañas, la concentración media de las uvas en 2016 fue de 25,7 °Brix; una concentración mucho mayor que los 22,5 °Brix registrados en 2017 (Tabla 5.1). En este sentido, varios factores pudieron haber influido sobre esta variable, ya que la maduración del racimo puede variar según el cultivar y las condiciones ambientales (Jackson, 2008). Más arriba se sugirió que el incremento del peso de las bayas observado en 2017, se pudo producir por un aumento en la absorción de agua, debido a las mayores precipitaciones registradas durante ese año. Este incremento del peso de las bayas también pudo generar la dilución del contenido de azúcares presentes en las uvas, traducándose en una lectura de °Brix más baja.

A esas mayores precipitaciones experimentadas en 2017, deberían sumarse un mayor número de días con temperaturas máximas por encima de los 30 °C, en el periodo comprendido entre el inicio del envero y la vendimia, los cuales sumaron 33 días en 2017 y 22 días en 2016 (Figura 3.3. Apartado 3.3.2). Además, en 2017 el inicio del envero se adelantó 15 días, y la fecha de vendimia se realizó 5 días antes, si lo comparamos con la campaña 2016, alargando en 10 días el periodo de maduración de las uvas Monastrell. No obstante, a pesar de este incremento en el periodo de maduración en 2017, la concentración de azúcares fue menor en el momento de la vendimia. En relación a este hecho, se ha descrito que temperaturas por encima de los 30 °C influyen negativamente en la acumulación de azúcares en las bayas (Bergqvist et al., 2001; Spayd et al., 2002), como sucedió en este ensayo.

En la campaña 2016, la aplicación de tratamientos no provocó cambios estadísticamente significativos en la concentración de °Brix de las uvas tratadas, si las comparamos con las uvas control; tanto en los tratamientos que fueron aplicados en envero como los aplicados a mitad-de-maduración. No obstante, observamos un ligero incremento de °Brix, aunque no estadísticamente significativo, en las bayas tratadas con BTH durante mitad-de-maduración. A este respecto, los estudios encontrados sobre el efecto de la aplicación de MeJ y BTH en la concentración de azúcares, han mostrado resultados variados. Así encontramos que la aplicación de MeJ tampoco provocó cambios en los °Brix de la variedad Tempranillo (Garde-Cerdán et al., 2016; Portu et al., 2015, 2018) y Syrah (Fernández-Marín et al., 2014); sin embargo, provocaron una reducción de °Brix en la variedad Merlot (Paladines-Quezada, Moreno-Olivares, Fernández-

Fernández, Bautista-Ortín, et al., 2019), Syrah (Gil-Muñoz, Bautista-Ortín, et al., 2017), en varios clones de Monastrell (Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2013), o en la variedad Sangiovese (D'Onofrio et al., 2018) en la que se observó un retraso de 10 días en la madurez tecnológica.

Las uvas tratadas con MeJ durante el envero de la campaña 2017, también mostraron un valor de °Brix inferior al de las uvas control. Y en el caso de las uvas tratadas en mitad-de-maduración, el tratamiento con BTH produjo uvas con mayor concentración de azúcares que las uvas control, tal como lo observado en 2016, indicando quizás que el tratamiento con BTH puede adelantar el proceso de maduración de Monastrell. Sin embargo, otros investigadores observaron una menor concentración de °Brix tras la aplicación de BTH en la variedad Syrah (Fernandez-Marin et al., 2013).

Por otra parte, los análisis del pH de la uva en el momento de la vendimia no mostraron diferencias entre los años estudiados, ya que el valor medio registrado durante las dos campañas fue de 3,83 aproximadamente. De la misma forma, la aplicación de elicitors durante 2016 no causó diferencias entre el pH de las uvas tratadas y las uvas control. Sin embargo, en la campaña 2017, las uvas tratadas durante el envero con MeJ y MeJ+BTH, registraron valores de pH más bajos que las uvas control. Lo mismo ocurrió con las uvas tratadas con MeJ+BTH en mitad-de-maduración de ese mismo año.

Finalmente, los datos de acidez total, ácido tartárico y ácido málico no mostraron diferencias interanuales, y tampoco se observó ningún cambio por la aplicación de los tratamientos. Sin embargo, el análisis de ácido málico de las uvas de la campaña 2016, reveló que las vides tratadas con BTH durante el envero y MeJ en mitad-de-maduración, produjeron uvas con menor concentración de ácido málico que las uvas control. En lo referente al efecto de MeJ y BTH sobre el pH, acidez total, ácido tartárico y ácido málico, nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos en investigaciones previas (Garde-Cerdán et al., 2018; Gutiérrez-Gamboa et al., 2019; Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al., 2013; Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2013), donde los autores también mostraron una ligera o ausente influencia de la aplicación de elicitors sobre estos parámetros.

Tabla 5.1 Características físico-químicas de la uva en el momento de la vendimia durante dos campañas (2016-2017).

Año	Control	Envero			Mitad de maduración			
		MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH	
2016	Peso de 100 bayas (g)	147.8 ± 6.2 a	146.7 ± 7.8 a	143.1 ± 10.7 a	162.9 ± 7.1 bc	156.1 ± 6.1 b	166.2 ± 9.5 c	160.6 ± 7.2 bc
	°Brix	25.9 ± 0.4 abc	25.2 ± 0.3 ab	25.6 ± 0.7 abc	26.1 ± 0.5 bc	25.0 ± 0.6 a	26.7 ± 0.6 c	25.5 ± 0.7 ab
	pH	3.9 ± 0.0 a	3.8 ± 0.0 a	3.8 ± 0.1 a	3.9 ± 0.0 a	3.8 ± 0.1 a	3.9 ± 0.1 a	3.9 ± 0.1 a
	Acidez total (g/L)*	2.9 ± 0.4 a	2.8 ± 0.3 a	2.7 ± 0.1 a	2.7 ± 0.3 a	2.6 ± 0.4 a	2.8 ± 0.1 a	2.7 ± 0.1 a
	Ácido tartárico (g/L)	4.1 ± 0.7 a	4.1 ± 0.8 a	3.8 ± 0.4 a	4.0 ± 0.5 a	3.8 ± 0.5 a	3.8 ± 0.5 a	3.9 ± 0.3 a
	Ácido málico (g/L)	1.5 ± 0.2 b	1.3 ± 0.0 ab	1.2 ± 0.1 a	1.5 ± 0.2 b	1.2 ± 0.1 a	1.5 ± 0.1 b	1.5 ± 0.1 b
2017	Peso de 100 bayas (g)	160.0 ± 7.2 a	157.4 ± 7.7 a	166.3 ± 10.3 a	166.7 ± 3.3 a	182.3 ± 0.8 b	178.0 ± 4.3 b	161.4 ± 3.1 a
	°Brix	22.6 ± 0.6 b	21.5 ± 0.9 a	22.8 ± 1.1 b	22.2 ± 0.4 ab	22.6 ± 0.5 b	24.2 ± 0.6 c	22.1 ± 0.6 ab
	pH	3.9 ± 0.1 c	3.8 ± 0.1 ab	3.9 ± 0.1 bc	3.7 ± 0.0 a	3.8 ± 0.1 abc	3.8 ± 0.1 abc	3.8 ± 0.1 ab
	Acidez total (g/L)	2.5 ± 0.4 a	3.1 ± 0.5 a	2.7 ± 0.4 a	3.1 ± 0.1 a	2.8 ± 0.4 a	2.8 ± 0.3 a	2.9 ± 0.3 a
	Ácido tartárico (g/L)	3.7 ± 0.5 a	4.5 ± 1.5 a	3.9 ± 0.6 a	4.0 ± 0.7 a	4.0 ± 0.6 a	3.9 ± 0.5 a	3.9 ± 0.6 a
	Ácido málico (g/L)	1.2 ± 0.0 ab	1.3 ± 0.1 bc	1.1 ± 0.1 a	1.3 ± 0.1 bc	1.2 ± 0.1 abc	1.3 ± 0.1 bc	1.2 ± 0.1 abc

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotiadiazol. Los datos representan las medias ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$). * Acidez total expresada como g/L de ácido tartárico.

5.4.2 PARAMETROS DE CALIDAD DE LOS VINOS

Los análisis del grado alcohólico registraron una clara diferencia entre los vinos elaborados en los dos años de estudio (Tabla 5.2), ya que los valores medios de los vinos de 2016 alcanzaron 15,2 °, un valor muy superior a los 12,9 ° alcanzados en 2017. Estas diferencias en el grado alcohólico fueron evidentes, debido a los valores medios obtenidos en los °Brix de la uva a la entrada en bodega, que fueron de 25,7 °Brix en 2016 y 22,5 °Brix en 2017 (Apartado 5.6.1). Como es sabido, la principal transformación en el proceso de vinificación se debe a la acción de las levaduras, que mediante la fermentación alcohólica metabolizan los azúcares presentes en el mosto convirtiéndolo en alcohol etílico (Pellerin & Cabanis, 2000). Por lo que un menor porcentaje de azúcares en la uva de partida, como lo ocurrido en la campaña 2017, condujo a vinos con una menor graduación alcohólica. Es preciso señalar que los valores medios del grado alcohólico de nuestros vinos son altos, pero característicos de regiones del sur de España.

En cuanto al grado alcohólico alcanzado por los diferentes vinos elaborados en 2016, encontramos ligeras diferencias entre los vinos procedentes de uvas tratadas en el envero y mitad-de-maduración. En el caso de los vinos procedentes de uvas tratadas en envero, las únicas diferencias encontradas fueron en los vinos elaborados con uvas tratadas con MeJ, los cuales registraron un menor grado alcohólico que los vinos de uvas control. Así mismo, en los vinos elaborados con uvas tratadas durante mitad-de-maduración observamos que las uvas tratadas con MeJ, también fueron las únicas que produjeron vinos con menor grado alcohólico que los vinos de uvas control. Esto se puede justificar debido a los °Brix registrados en las uvas en el momento de la vendimia, ya que en el caso de las uvas tratadas con MeJ durante el envero o mitad-de-maduración, fueron ligeramente inferiores que las uvas control, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Por el contrario, los vinos de uvas tratadas con BTH durante mitad-de-maduración, presentaron una mayor graduación alcohólica que los vinos de uvas control, y esto fue debido a que las uvas tratadas con BTH registraron más °Brix que las uvas control, aunque las diferencias no fueran significativas. Pocos estudios han analizado el grado alcohólico alcanzado por los vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ o BTH, y los que lo realizaron, mostraron que este parámetro fue similar al de

los vinos control; como en el caso de MeJ aplicado en uvas de la variedad Tempranillo (Portu et al., 2015) o en la variedad Syrah (Fernández-Marín et al., 2014).

En los vinos elaborados en 2017, se observó que la graduación alcohólica fue similar entre los vinos procedentes de uvas tratadas en el envero y en mitad-de-maduración; es decir, en el caso de los tratamientos durante el envero, se observó que las uvas tratadas con BTH fueron las únicas que produjeron vinos con mayor graduación alcohólica que los vinos de uvas control. Lo mismo sucedió con los tratamientos durante mitad-de-maduración, en el que uvas tratadas con BTH también registraron una mayor graduación alcohólica que los vinos de uvas control, justificándose de nuevo por los °Brix obtenidos por estas uvas en el momento de la vendimia. No obstante, el resto de los tratamientos no presentó una tendencia clara durante las dos campañas.

Por otro lado, los análisis de la acidez total de los vinos elaborados durante los dos años de estudio registraron un valor medio de 7,7 (g/L), sin mostrar diferencias significativas entre las muestras para las dos campañas estudiadas. Con respecto a estos resultados, hay que considerar la corrección de acidez realizada con ácido tartárico al inicio de la maceración (Apartado 3.6.1), lo cual justificaría que no se observaran diferencias entre los valores de acidez total de los vinos analizados.

Así mismo, los análisis de pH de las muestras de vino registraron valores medios de 3,20 en los vinos elaborados de 2016, y de 3,28 en los de 2017; y al igual que en la acidez total, todas las muestras de vino registraron valores similares, ya que obviamente el pH es un parámetro directamente dependiente de la acidez total.

En lo referente a la acidez volátil de los vinos elaborados, encontramos que en 2016 el valor medio alcanzado fue de 0,47 g/L, mientras que en 2017 se situó en 0,39 g/L. Esta acidez volátil está compuesta fundamentalmente por el ácido acético, generado durante la fermentación alcohólica por las levaduras *Saccharomyces* y otras levaduras presentes en la uva, y posteriormente los contenidos aumentan por producción bacteriana durante la fermentación maloláctica, y durante el envejecimiento en barrica (Boulton et al., 1999). Por tanto, si se toma en cuenta que los vinos se analizaron al finalizar la fermentación alcohólica, y que las concentraciones no sobrepasaron los límites permitidos en los vinos tintos de la DOP "Jumilla" (0,8 g/L) (BOE 97. Disposición 593,

2012); se puede considerar que la acidez volátil fue generada principalmente por la acción de las levaduras; y dado que se usó el mismo tipo de levaduras durante las dos campañas, las diferencias encontradas se pueden atribuir al estado de madurez de las uvas en el momento de la vendimia, que en 2016 se vendimiaron en un estado de maduración más avanzado que en 2017. En este sentido se ha descrito que los vinos elaborados con uvas menos maduras presentan una menor acidez volátil (Boulton et al., 1999; Lasanta, 2009), como lo ocurrido en nuestros ensayos.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en los resultados de la acidez volátil de los vinos de la campaña 2016, ya sea en vinos elaborados a partir de uvas tratadas en envero o mitad-de-maduración. Lo mismo ocurrió en los vinos elaborados en 2017; aunque se observó una concentración ligeramente mayor en los vinos procedentes de uvas tratadas con BTH (en envero y mitad-de-maduración), en comparación con los vinos de uvas control; sin embargo, las diferencias no fueron significativas. Existe escasa información al respecto de este parámetro, por lo que nuestros resultados solo los podemos contrastar con dos estudios en los que se aplicó MeJ sobre uvas de la variedad Syrah (Fernández-Marín et al., 2014) y Tempranillo (Portu et al., 2015), en los cuales no encontraron diferencias significativas en la acidez volátil de los vinos de uvas tratadas y los vinos de uvas control.

Por último, la homogeneidad observada en los resultados de la acidez total, acidez volátil y pH de los vinos elaborados en cada campaña, nos indican en principio que el protocolo de vinificación se siguió correctamente, y que el estado sanitario de la uva al inicio del proceso de vinificación fue el adecuado, por lo que la evolución de la fermentación en todos los depósitos fue uniforme.

Tabla 5.2 Análisis de los parámetros de calidad de los vinos al final de la fermentación alcohólica durante dos campañas (2016 y 2017).

Año	Control	Envero			Mitad de maduración			
		MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH	
2016	Alcohol (% vol)	15.2 ± 0.1 c	14.4 ± 0.1 a	15.1 ± 0.1 bc	15.2 ± 0.1 c	14.8 ± 0.1 b	15.7 ± 0.1 d	15.0 ± 0.0 bc
	Acidez total (g/L) *	7.7 ± 0.1 a	7.6 ± 0.1 a	7.7 ± 0.1 a	7.8 ± 0.2 a	7.9 ± 0.0 a	7.8 ± 0.1 a	7.7 ± 0.0 a
	pH	3.2 ± 0.0 ab	3.2 ± 0.0 ab	3.2 ± 0.0 a	3.2 ± 0.0 ab	3.2 ± 0.0 ab	3.2 ± 0.0 b	3.2 ± 0.0 ab
	Acidez volátil (g/L) **	0.5 ± 0.0 a	0.5 ± 0.0 a	0.5 ± 0.0 a	0.5 ± 0.0 a	0.5 ± 0.0 a	0.5 ± 0.0 a	0.5 ± 0.0 a
2017	Alcohol (%)	12.6 ± 0.2 a	12.0 ± 0.5 a	13.8 ± 0.1 b	12.7 ± 0.1 a	12.7 ± 0.7 a	13.8 ± 0.1 b	12.5 ± 0.4 a
	Acidez total (g/L)	7.8 ± 0.3 a	7.6 ± 0.4 a	7.9 ± 0.2 a	7.9 ± 0.2 a	7.8 ± 0.2 a	7.7 ± 0.2 a	7.5 ± 0.1 a
	pH	3.3 ± 0.0 a	3.3 ± 0.1 a	3.3 ± 0.0 a	3.3 ± 0.0 a	3.3 ± 0.0 a	3.3 ± 0.0 a	3.3 ± 0.1 a
	Acidez volátil (g/L)	0.4 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 a	0.4 ± 0.0 a

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotiadiazol. Los datos representan las medias ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila, indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$). *Acidez total expresada como g/L de ácido tartárico. **Acidez volátil expresada como g/L de ácido acético.

5.4.3 CARACTERÍSTICAS FENÓLICAS Y CROMÁTICAS DEL VINO MEDIDOS POR ESPECTROFOTOMETRÍA

Tras finalizar la fermentación alcohólica, se determinaron varios parámetros espectrofotométricos en el vino, entre los que se incluyen parámetros fenólicos como: índice de polifenoles totales (IPT) y antocianos totales. Además, se analizaron parámetros de color como: intensidad de color (IC), luminosidad (L^*) y tono; y parámetros de copigmentación como: fracción de color correspondiente a los antocianos copigmentados (FCA), fracción de color debida a antocianos libres (FFA) y fracción de color debida a pigmentos poliméricos (FPP).

De forma general, e independientemente de los tratamientos usados en campo, observamos diferencias considerables entre los dos años de ensayo. Los detalles de los resultados obtenidos se describen a continuación.

5.4.3.1 Parámetros fenólicos del vino: índice de polifenoles totales (IPT) y antocianos totales.

Los resultados del análisis del índice de polifenoles totales (IPT) obtenidos durante las dos campañas (Figura 5.10 A y B), mostraron de forma general que los vinos elaborados en 2016 registraron en promedio un índice de 51, un valor muy por encima de los 38 observados en los vinos de 2017. En relación a esto, se ha visto que mayores temperaturas resultan en una menor síntesis de compuestos fenólicos y en su mayor degradación, por lo que el color de las uvas y de los vinos se ve perjudicado (Mira de Orduña, 2010; Portu, 2017).

Además, en el análisis de IPT de los vinos de la campaña 2016 (Figura 5.10 A), se observó que los tratamientos realizados en el envero, produjeron vinos con mayores IPT que los vinos elaborados con uvas tratadas en mitad-de-maduración. De igual forma, se detectó que todas las uvas tratadas en el envero produjeron vinos con mayores IPT que los vinos de uvas control; destacando el tratamiento con BTH, seguido de MeJ y MeJ+BTH. Sin embargo, en los tratamientos de mitad-de-maduración, solo las uvas

tratadas con MeJ dieron lugar a vinos con mayores IPT que los vinos procedentes de uvas control.

En cambio, los análisis de IPT de los vinos de 2017 (Figura 5.10 B) revelaron que ninguno de los vinos elaborados con uvas tratadas con elicitores (ya sea en envero o mitad-de-maduración), presentaron diferencias significativas con respecto a los IPT de los vinos de uvas control.

Por su parte, los análisis de antocianos totales de los vinos elaborados durante las dos campañas (Figura 5.10 C y D), indicaron que los vinos de la campaña 2016 presentaron mayores concentraciones de antocianos totales que los vinos de 2017, tal como ocurrió con los IPT analizados anteriormente. Así mismo, pudimos comprobar que los análisis de antocianos totales medidos por espectrofotometría, se corresponden de una manera bastante parecida con los analizados por HPLC (Figura 5.14 A y B); constatando que la metodología usada para medir antocianos totales por espectrofotometría, permite darnos una idea aproximada de los resultados que se obtendrán por metodologías más complejas como la de cromatografía líquida, aunque en este último caso solo se analizan los compuestos monoméricos.

En cuanto a los análisis de los vinos de la campaña 2016 (Figura 5.10 C), observamos que las uvas tratadas durante el envero, presentaron mayores concentraciones de antocianos totales que los vinos precedentes de uvas tratadas en mitad-de-maduración. Además, todos los vinos procedentes de uvas tratadas durante el envero, mostraron claramente una mayor concentración de antocianos totales que los vinos de uvas control, siendo el tratamiento con BTH el que mostró el mayor incremento. No obstante, en los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración, solo observamos una mayor concentración de antocianos totales, en los vinos de uvas tratadas con MeJ, si lo comparamos con los vinos procedentes de uvas control.

En la campaña 2017 (Figura 5.10 D), detectamos que los vinos de uvas tratadas durante mitad-de-maduración, registraron mayores concentraciones de antocianos totales que los vinos de uvas tratadas en envero. Sin embargo, entre los vinos de uvas tratadas en envero, solo detectamos una mayor concentración de antocianos totales, en los vinos de uvas tratadas con BTH. Por otra parte, prácticamente todos los vinos procedentes de uvas

tratadas durante mitad-de-maduración presentaron mayor concentración de antocianos totales que los vinos de uvas control, siendo el tratamiento con MeJ el que presentó mayores diferencias significativas con respecto a los vinos de uvas control.

En relación a los IPT y antocianos totales medidos espectrofotométricamente en el vino, otros estudios también registraron que vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ y BTH, presentaron valores más altos que los vinos procedentes de uvas control (Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al., 2013; Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012).

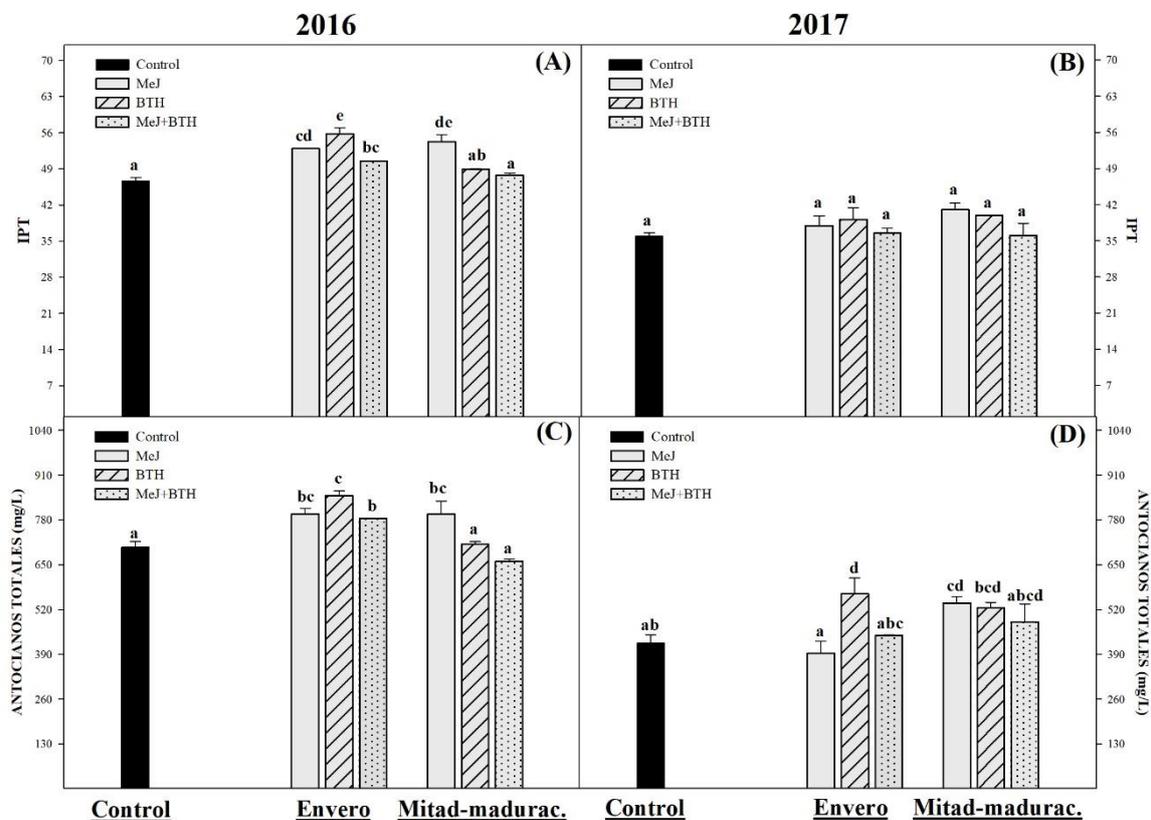


Figura 5.10 Características fenólicas medidas por espectrofotometría en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas acorde al test de Duncan ($p < 0.05$).

5.4.3.2 Parámetros cromáticos del vino: Intensidad de color IC, luminosidad (L*) y tono.

Se analizó también la intensidad de color (IC) de los vinos elaborados, ya que es uno de los parámetros más importantes para determinar su calidad, debido sin duda, a que el color es uno de los primeros atributos percibido por los consumidores (Fernandes et al., 2017), y donde los antocianos son los principales compuestos responsables de esta propiedad (Gómez-Plaza et al., 2001).

Los resultados mostraron claras diferencias entre la IC de los vinos elaborados en cada campaña (Figura 5.11 A y B). Así, observamos que la IC de los vinos de 2016 presentó un valor promedio de 22,6, frente a una IC de 13,4 registrada en los vinos de 2017.

Aquí encontramos, que los vinos elaborados con uvas tratadas durante el envero de 2016 (Figura 5.11 A), presentaron mayor IC que los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración. Se pudo constatar que todos los vinos de uvas tratadas en envero, mostraron una mayor intensidad de color que los vinos procedentes de uvas control, destacando el tratamiento con BTH, seguido de MeJ y MeJ+BTH. En el caso de los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración, observamos que únicamente las uvas tratadas con MeJ produjeron vinos con una mayor IC que los vinos de uvas control y, por el contrario, las uvas tratadas con BTH y MeJ+BTH dieron lugar a vinos con menor IC que los vinos de uvas control.

Los resultados de la IC de los vinos elaborados en 2017 (Figura 5.11 B), indicaron que entre los vinos de uvas tratadas en envero y mitad-de-maduración, no existían diferencias. En el caso específico de vinos de uvas tratadas en envero, se observó que las uvas tratadas con BTH fueron las únicas que produjeron vinos con mayor IC que los vinos de uvas control. Por otra parte, los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración registraron una IC similar a la de los vinos de uvas control.

Por tanto, la mayor parte del efecto positivo observado en las uvas por la aplicación de elicitores, fue reflejado en la IC de los vinos. En este sentido, varios estudios han descrito que uvas de la variedad Monastrell tratadas con MeJ y BTH durante la época

de envero, dieron lugar a vinos con una mayor IC que los vinos de uvas control (Paladines-Quezada, Moreno-Olivares, Fernández-Fernández, Bautista-Ortín, et al., 2019; Paladines-Quezada, Moreno-Olivares, Fernández-Fernández, Bleda-Sánchez, et al., 2019; Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al., 2013; Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012). La misma tendencia fue observada en ensayos con MeJ, tras aplicarlo en las variedades Syrah (Fernández-Marín et al., 2014); Merlot (Paladines-Quezada, Moreno-Olivares, Fernández-Fernández, Bautista-Ortín, et al., 2019); Graciano (Portu et al., 2018) o Tempranillo (Portu et al., 2015). Cabe destacar la similitud observada entre la gráfica de resultados de antocianos totales (Figura 5.10 C y D), y la gráfica de los resultados de la intensidad de color (Figura 5.11 A y B). Con lo que podemos corroborar, que los antocianos son los principales responsables de la intensidad de color de los vinos.

Por otra parte, cuando se midió la luminosidad (L^*) en los vinos elaborados durante las dos campañas (Figuras 5.11 C y D), encontramos que aquellos vinos con una L^* más baja, fueron los mismos que presentaron una mayor IC (Figura 5.11 A y B); algo que resulta bastante evidente según los conceptos de colorimetría. Por tanto, los vinos de uvas tratadas en el envero de 2016 con MeJ, BTH y MeJ+BTH, así como aquellos tratados con MeJ (mitad-de-maduración), registraron una L^* inferior al de los vinos de uvas control. Este también fue el caso de los vinos elaborados en 2017 con uvas tratadas en el envero con BTH. En relación a esto, varios estudios han registrado resultados similares, como fue el caso de vinos de uvas Monastrell tratadas con MeJ y BTH (Paladines-Quezada, 2019; Ruiz-García et al., 2012); o vinos de uvas Syrah tratadas solo con MeJ (Fernández-Marín et al., 2014).

Por último, cuando se midió la tonalidad de los vinos (Figura 5.11 E y F), se comprobó que los vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ y BTH durante el envero de la campaña 2016 (Figura 5.11 E) mostraron tonos más bajos (rojo-azulados), típicos de los vinos jóvenes (Levengood & Boulton, 2004), en comparación con los tonos más amarillentos de los vinos de uvas control; lo mismo ocurrió con los vinos de uvas tratadas con MeJ en mitad-de-maduración de ese mismo año. Sin embargo, durante la campaña 2017 (Figura 5.11 F) los vinos mostraron tonalidades similares a los vinos de uvas control, ya sea en vinos procedentes de uvas tratadas en envero o en mitad-de-maduración.

Sin lugar a duda, la menor concentración de antocianos en las pieles de las uvas de la campaña 2017, repercutió directamente en los parámetros de color de los vinos elaborados, dando como resultado vinos con menor IC, y por tanto con una L* mayor.

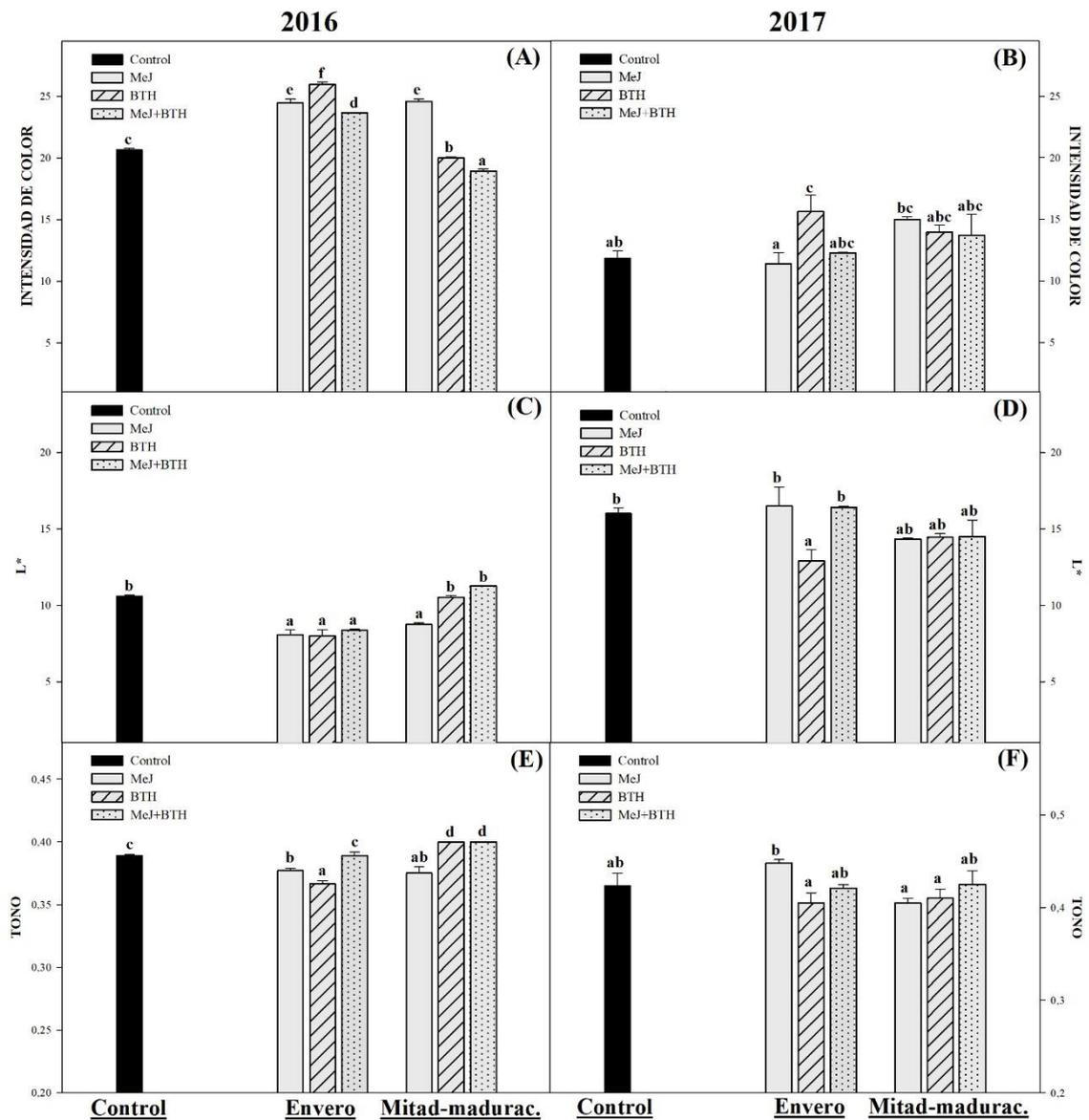


Figura 5.11 Características cromáticas medidas por espectrofotometría en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas acorde al test de Duncan ($p < 0.05$).

5.4.3.3 Parámetros de copigmentación

Se realizó un análisis de diferentes parámetros relacionados con el fenómeno de copigmentación (Figura 5.12), que es un fenómeno en los que se llevan a cabo mecanismos de estabilización del color a corto plazo, y que experimentan principalmente los vinos tintos jóvenes (Levengood & Boulton, 2004). Además, existen distintos factores que influyen en la importancia y la estabilidad de los complejos de copigmentación, entre los que destacan la estructura y la concentración relativa de antocianos y copigmentos (Boulton, 2001).

En cuanto a los resultados obtenidos durante las dos campañas, estos indicaron que la aplicación de elicitores en la viña (ya sea durante el invierno o en mitad-de-maduración), no influyó prácticamente en ninguno de los parámetros de copigmentación medidos en los vinos elaborados. Sin embargo, cuando analizamos los resultados de las dos campañas en su conjunto, nos permitió comparar los porcentajes de aportación al color de los vinos por parte de las distintas fracciones, en las que los antocianos pueden ser encontrados en los vinos tintos jóvenes.

Así, en la fracción de color correspondiente a los antocianos copigmentados (FCA), se pudo observar una marcada diferencia entre los vinos de las dos campañas, registrándose en 2016, vinos con un valor medio del 51%, frente al 36% registrado en los vinos de 2017 (Figura 5.12 A y B). Esta mayor aportación al color por parte de la FCA en los vinos de 2016, pudo deberse a la mayor concentración de antocianos y flavonoles encontrados en los vinos de ese año (Ver apartados 5.4.5.2 y 5.4.6.2), generando un efecto hiperocrómico, o lo que es lo mismo, produciendo una mayor intensidad de color en los vinos (Boulton, 2001). A este respecto, se ha descrito que los flavonoles son los mejores copigmentos, seguidos de los ácidos hidroxicinámicos, aunque sus bajas concentraciones en el medio disminuyen su influencia (Berké & De Freitas, 2005).

En cambio, los flavan-3-oles monómeros y los oligómeros de proantocianidina, a pesar de ser copigmentos menos efectivos, pueden llegar a tener relevancia en el fenómeno de la copigmentación debido a su mayor concentración en el medio (Berké & De Freitas, 2005). A este respecto, la distribución de las masas moleculares de las proantocianidinas de los vinos (Figuras 5.20 E y F), indicaron que las proantocianidinas

oligoméricas (eluídas entre 12,3 y 13,7 min) y monoméricas (eluídas entre 13,7 y 16 min) de los vinos elaborados en 2016, registraron mayores concentraciones que los vinos de 2017, lo que pudo haber contribuido también a ese mayor porcentaje de color correspondiente a los antocianos copigmentados en los vinos de 2016; contribuyendo a una mayor estabilidad del color en el tiempo, y protegiéndolos de oxidaciones o polimerizaciones (Boulton, 2001; Escribano-Bailón et al., 1996).

Por otra parte, el valor medio de la fracción de color debida a antocianos libres (FFA) también mostró diferencias entre las dos campañas (Figura 5.12 C y D), ya que detectamos un valor medio del 38% en los vinos de 2016, un valor muy por debajo del 52% registrado en los vinos de 2017. Esta mayor proporción de antocianos libres registrada en los vinos de 2017, hacen que estos vinos puedan ser más susceptibles de sufrir oxidaciones hacia formas incoloras (Zamora, 2003).

No obstante, la aportación al color de los vinos por parte de la fracción de pigmentos poliméricos (FPP) fue igual durante las dos campañas, en las cuales se registró un valor medio del 11% (Figura 5.12 E y F), estos pigmentos poliméricos, debido a su estructura, ya no se pueden copigmentar, por lo que se podrían considerar como compuestos más estables (Escribano-Bailón et al., 1996).

Hay que señalar también, que además de la estructura y la cantidad de pigmentos y copigmentos presentes en el vino, hay otros factores que ejercen una gran influencia sobre la estabilidad de los complejos de copigmentación, como la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la concentración de etanol, (Boulton, 2001; Hermosín-Gutiérrez, 2003); provocando que se produzca una competencia entre los fenómenos de copigmentación, las reacciones de polimerización de proantocianidinas, oxidaciones enzimáticas, etc., durante la elaboración y envejecimiento del vino. Por lo que el predominio de unas sobre otras, determinará la evolución del color y las propiedades organolépticas del vino (Moreno-Pérez, 2013).

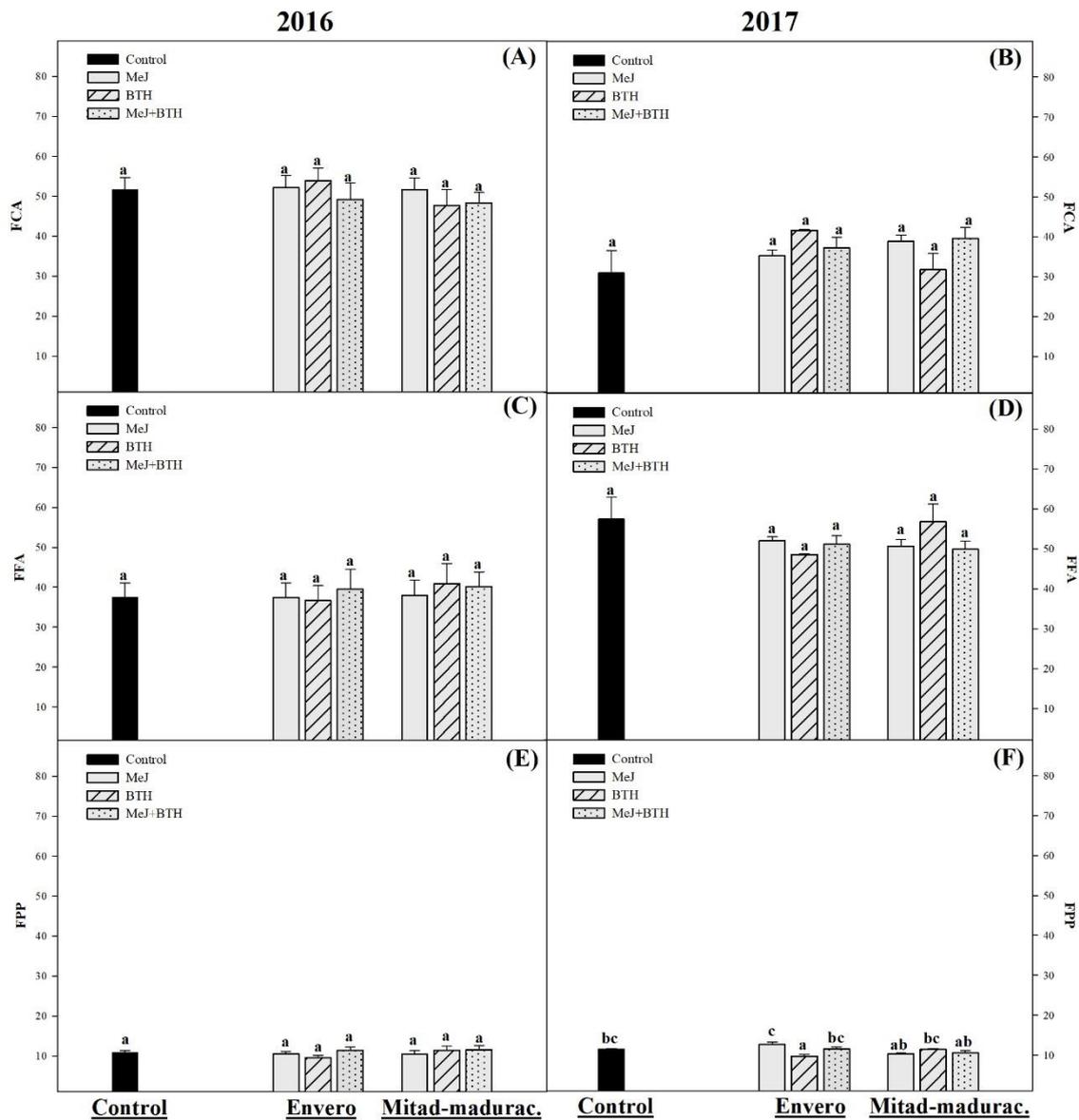


Figura 5.12 Parámetros de copigmentación medidos por espectrofotometría en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

Pero sin duda, el factor más influyente en el color final de los vinos, es la proporción entre antocianos y taninos; ya que, si la proporción entre ellos es similar, se origina un ambiente idóneo para su combinación, y por tanto para la estabilización del color, en la que todas las reacciones de combinación son posibles. Sin embargo, si la concentración de antocianos es superior a la de taninos, una proporción de antocianos quedará libre, siendo susceptibles de sufrir oxidaciones hacia fenoles incoloros (Zamora,

2003), tal como se mencionó anteriormente. Además, en estas circunstancias la polimerización de taninos se verá perjudicada, ya que la mayor parte de taninos se habrá combinado con los antocianos. También se puede dar el caso contrario; es decir, una mayor concentración de taninos que de antocianos, donde habría una tendencia hacia la polimerización por parte de los taninos en exceso, provocando una evolución del color hacia tonalidades amarillas (Moreno-Pérez, 2013).

Estudios recientes han demostrado también que las paredes celulares suspendidas en el vino, y que proceden principalmente de las pieles de las uvas, son capaces de interaccionar fuertemente con los antocianos y taninos del vino, provocando que estos polifenoles compitan entre ellos por los sitios de adsorción con las paredes celulares (Bautista-Ortín et al., 2016); de tal manera que una proporción sustancial de taninos puede ser adsorbida por las paredes, o que los antocianos se acoplen a los sitios de adsorción, favoreciendo la extractabilidad de los taninos (Bautista-Ortín et al., 2015, 2016), pero en este caso, podría tener como consecuencia la disminución de la intensidad de color.

5.4.4 COMPOSICION FENÓLICA POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA EN UVAS Y VINOS

5.4.5 CONCENTRACIÓN DE ANTOCIANOS EN UVAS Y VINOS

5.4.5.1 Análisis de antocianos por HPLC en pieles de uvas en el momento de la vendimia.

Los antocianos totales presentados en las Figuras 5.13 A y B, corresponden a la suma de antocianos no-acilados y acilados. En este cultivar (Monastrell) predominaron los antocianos no-acilados (grupo mayoritario), entre los que se identificaron los antocianos individuales 3-*o*-glucósidos de delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina (Tabla 5.3). En el caso de los antocianos acilados, Monastrell es una variedad caracterizada por una baja proporción de este grupo de antocianos (Romero-Cascales et al., 2005), no obstante se encontraron 3-acetilglucósidos y derivados de *trans-p*-cumaril de delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina; así como también se identificaron derivados *cis-p*-cumaril y cafeoil de malvidina. Los perfiles de antocianos obtenidos para los diferentes tratamientos fueron similares, y reflejan los encontrados por otros autores y por uno de nuestros estudios preliminares en la variedad Monastrell (Gil-Muñoz, Moreno-Olivares, et al., 2018; Gómez-Plaza et al., 2017; Paladines-Quezada, Moreno-Olivares, Fernández-Fernández, Bleda-Sánchez, et al., 2019). En este sentido, es comúnmente aceptado que el perfil antociánico en la uva está fuertemente vinculado a la herencia genética de cada variedad, pudiendo utilizarse como una herramienta taxonómica para la clasificación de las mismas (Arozarena et al., 2000; Gil-Muñoz et al., 2010).

Sin embargo, cuando analizamos las concentraciones obtenidas en cada campaña, encontramos que durante 2016 la síntesis de antocianos de las uvas Monastrell, fue muy superior a la registrada en 2017, indistintamente de los tratamientos aplicados (Figuras 5.13 A y B). Estos resultados sugieren que las condiciones climáticas extremas, como las altas temperaturas soportadas en el periodo de maduración de la campaña 2017, pudieron haber afectado las rutas biosintéticas de esta variedad, ya sea por degradación y/o

inhibición de la síntesis de antocianos (Spayd et al., 2002; Yamane et al., 2006), afectando a su acumulación y distribución en la piel de las bayas (Bergqvist et al., 2001; Vivas de Gaulejac et al., 2001). En referencia a esto, se ha demostrado que las diferencias interanuales en una misma variedad, pueden ser mucho mayores que las diferencias intervarietales durante el mismo año (Cacho et al., 1992; Ortega-Regules, 2006).

Por ello, los efectos de la temperatura en la composición de las uvas han sido estudiados extensamente (principalmente en cámaras de crecimiento o invernaderos) (Buttrose et al., 1972; Dokoozlian & Kliewer, 1996). Por ejemplo, las diferencias de temperatura entre el día y la noche es un factor muy influyente en la síntesis de antocianos, ya que las uvas desarrollan mejores coloraciones con temperaturas diurnas entre 15 a 25 °C y temperaturas nocturnas de 10 a 20 °C (Spayd et al., 2002). Si las temperaturas son elevadas durante el día y la noche, la biosíntesis de antocianos se reduce sustancialmente o es completamente inhibida en cultivares sensibles como Tokay o Emperador (Crippen & Morrison, 1986; Kliewer, 1977), y fuertemente reducida en variedades con más color como Pinot Noir (Kliewer, 1970). Así mismo, se han registrado en uvas de la variedad Cabernet Sauvignon mantenidas a 20 °C de temperatura diurna, concentraciones de antocianos dos o tres veces superiores, comparado con cepas mantenidas a temperaturas diurnas de 30° C (Buttrose et al., 1972); sin embargo, el mayor contenido de antocianos a temperaturas más bajas no estaba relacionado con las concentraciones de sólidos solubles, que tendían a ser mayores a las temperaturas diurnas más altas.

Así mismo, en nuestro caso , durante 2017 se registraron fuertes lluvias (40 mm) unos días antes de la vendimia (SIAM, 2019), que pudieron provocar la dilución de estos compuestos debido a la mayor absorción de agua por parte de la vid (Romero-Azorín, García-García, et al., 2016; Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012), tal como lo observado en la concentración de azúcares de las bayas.

Además, la decisión del momento de vendimia fue marcada por la madurez tecnológica, y no por la madurez fenólica, por lo que pudo darse el caso de que no se haya vendimiado en el punto de mayor concentración polifenólica de Monastrell. En relación a esto, en un estudio reciente se analizó la evolución de la maduración de uvas Monastrell, Merlot y Syrah, tratadas con MeJ y BTH durante la época del envero (Gómez-Plaza et al., 2017), donde encontraron que la máxima concentración de compuestos fenólicos no

siempre se alcanzó al final del período de maduración, sino algunos días antes de la vendimia.

Por otra parte, si hablamos más específicamente de los efectos de los tratamientos aplicados durante la campaña 2016, encontramos que todas las uvas tratadas con elicitores presentaron mayores concentraciones de antocianos totales que las uvas control (Figura 5.13 A). En el caso de los tratamientos aplicados en enero, observamos que el incremento obtenido fue similar en uvas tratadas con MeJ, BTH y MeJ+BTH. Del mismo modo, estudios recientes han demostrado que la aplicación exógena de MeJ, puede incrementar la concentración de antocianos en uvas de vinificación de la variedad Monastrell (Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al., 2013; Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012, 2013); Syrah (Fernández-Marín et al., 2014); Tempranillo (Portu et al., 2015) y Graciano (Portu et al., 2018). Así mismo, la aplicación de tratamientos con BTH, incrementaron la concentración de antocianos de las bayas de uva de la variedad Merlot (Iriti et al., 2004). Sin embargo, todos estos ensayos con MeJ y BTH fueron aplicados únicamente durante la época de enero, resultando complicado realizar un análisis comparativo con los resultados obtenidos en nuestros ensayos.

Así mismo, cuando analizamos los resultados de los tratamientos aplicados en mitad-de-maduración, encontramos que todos ellos provocaron incrementos en la concentración de antocianos totales de las pieles de uvas, y además en la misma proporción que en el caso de los tratamientos aplicados en enero. En relación a esto, aunque con un tipo de elicitador distinto, se han descrito varios ensayos enfocados en la acumulación de antocianos o el desarrollo del color de la piel, mediante la aplicación de ácido abscísico antes, durante y después del enero, en uvas para elaboración de zumos (Yamamoto et al., 2015), en uvas de mesa (Peppi et al., 2007; Shahab et al., 2019, 2020), o en uvas de vinificación (Giribaldi et al., 2010; Jeong et al., 2004), todos ellos con resultados satisfactorios. Por otro lado, la aplicación de ácido abscísico 3-4 días después del enero en bayas del cultivar ‘Olympia’, permitió incrementar significativamente el contenido de antocianos en pieles, dos a tres semanas después de su aplicación (Matsushima et al., 1989). Sin embargo, todos estos estudios presentaron una gran variabilidad en cuanto al momento óptimo de aplicación, para lograr el máximo

incremento en la época de cosecha. Por lo que resulta imposible generalizar el momento idóneo de aplicación, de un determinado elicitador sobre una determinada variedad de uva.

En los análisis de uva de la campaña 2017 (Figura 5.13 B), observamos que los tratamientos aplicados en mitad-de-maduración, fueron los más efectivos incrementando la concentración de antocianos totales, en comparación con los tratamientos aplicados durante el envero. Los resultados mostraron que el tratamiento con MeJ+BTH aplicado durante el envero, fue el único que logró aumentar la concentración de antocianos totales, apuntando a un posible efecto sinérgico debido a la combinación de los elicitores aplicados. Se han realizado pocas investigaciones sobre el sinergismo o antagonismo entre MeJ y BTH, aunque se han descrito interacciones sinérgicas en tomate (O'Donnell et al., 2003) y en uva de mesa (Considine et al., 2009). Además, un reciente estudio indicó que uvas Monastrell tratadas con MeJ+BTH presentaron un mayor contenido de antocianos que las uvas control (Ruiz-García, et al., 2013), sin embargo, los autores señalaron que los resultados no fueron mejores que un estudio anterior (Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012), el cual implicaba la aplicación por separado de MeJ y BTH, comprobando al menos la inexistencia de antagonismo entre los dos elicitores. En cuanto a los tratamientos aplicados durante mitad-de-maduración, encontramos que todos los tratamientos fueron capaces de incrementar la concentración de antocianos totales de las uvas tratadas, siendo el tratamiento con MeJ el más efectivo, si lo comparamos con las uvas control.

Con respecto a los antocianos no-acilados, observamos que durante las dos campañas constituyeron alrededor del 80% del total de antocianos en la piel de las bayas (Figuras 5.13 C y D). Este alto porcentaje obtenido para este tipo de compuestos, prácticamente determinó los resultados obtenidos en la concentración de antocianos totales descritos más arriba; es decir, si analizamos la concentración de antocianos no-acilados durante las dos campañas, observamos que los incrementos registrados debido a los tratamientos, coinciden con los incrementos registrados en antocianos totales. Así, en 2016 los tratamientos MeJ y BTH aplicados durante el envero, incrementaron la concentración de antocianos no-acilados con respecto a las uvas control; mientras que MeJ y MeJ+BTH los incrementaron cuando fueron aplicados en mitad-de-maduración. Por otro lado, en la campaña 2017, el tratamiento MeJ+BTH fue el único de los tratamientos aplicados durante el envero que aumentó la concentración de antocianos no-

acilados. En cambio, todos los tratamientos aplicados a mitad-de-maduración influyeron positivamente en el incremento de este grupo de antocianos, si los comparamos con las uvas control.

Adicionalmente, los antocianos acilados representaron el 20 % restante de los antocianos totales. Aquí observamos que todos los tratamientos aplicados en la campaña 2016 incrementaron la concentración de este grupo de antocianos, ya sea cuando se aplicaron en envero o en mitad-de-maduración (Figura 5.13 E). Sin embargo, en 2017, la concentración de antocianos acilados no aumentó después de la aplicación de los elicitores (Figura 5.13 F); de hecho, las uvas tratadas durante la etapa de envero mostraron concentraciones más bajas que las uvas control, mientras que las uvas tratadas en mitad-de-maduración mostraron concentraciones similares a las uvas control.

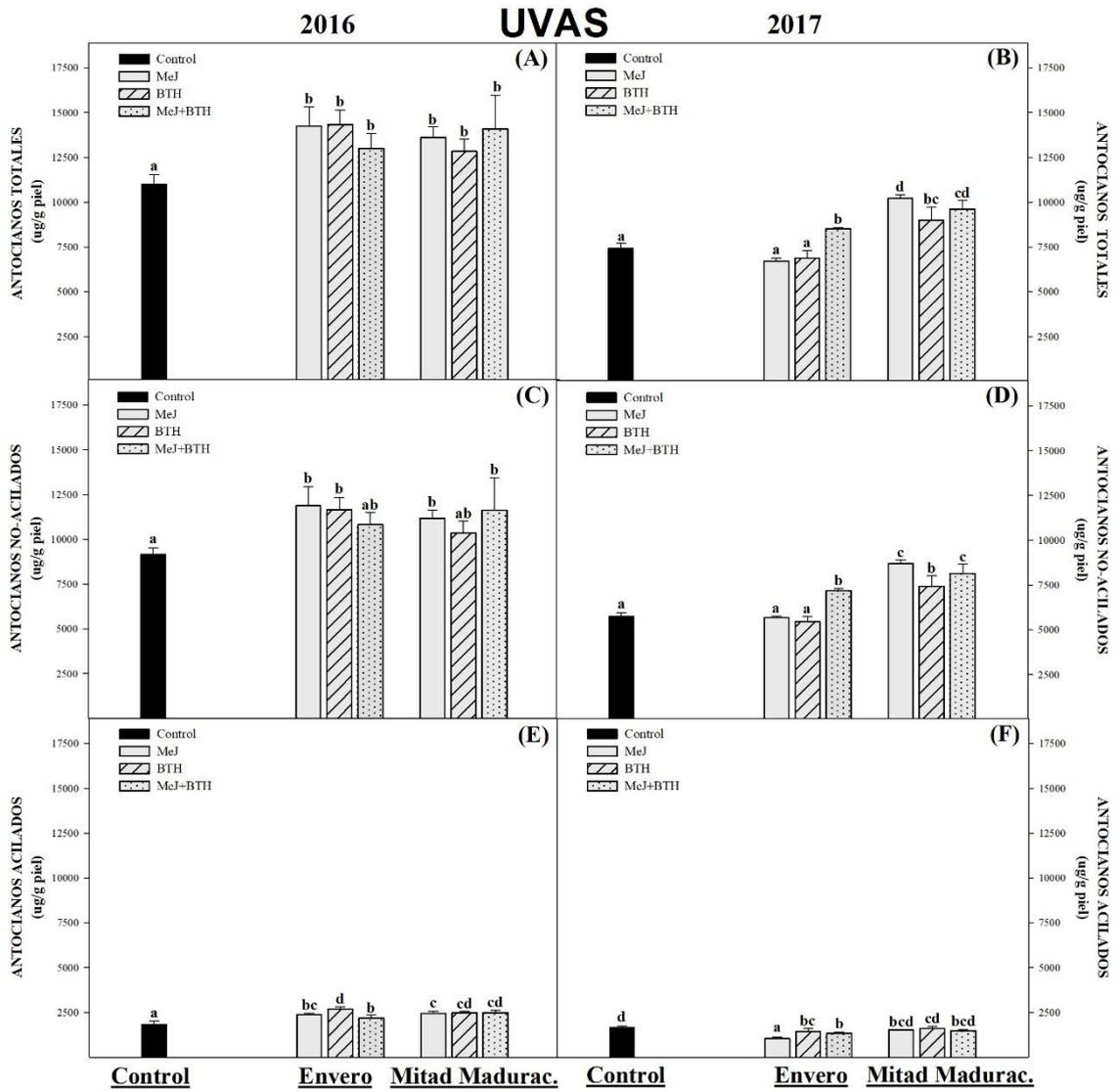


Figura 5.13 Concentración de antocianos medidos por HPLC en la piel de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

Tabla 5.3 Concentración de antocianos ($\mu\text{g/g}$ piel) en uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).

Año	Antocianos ($\mu\text{g/g}$ piel)	Control	Envero			Mitad-de-maduración		
			MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH
2016	Del	1129 \pm 161 a	1457 \pm 255 b	1361 \pm 34 b	1401 \pm 57 b	1349 \pm 51 ab	1274 \pm 34 ab	1423 \pm 110 b
	Cian	1271 \pm 6 ab	1442 \pm 19 abc	1296 \pm 40 ab	1708 \pm 21 bc	1425 \pm 61 ab	1068 \pm 225 a	1858 \pm 612 c
	Pet	1276 \pm 81 a	1667 \pm 117 d	1609 \pm 16 d	1492 \pm 8 b	1551 \pm 56 bc	1482 \pm 33 b	1624 \pm 69 d
	Pn	1387 \pm 102 ab	1731 \pm 6 ab	1673 \pm 24 ab	1684 \pm 17 ab	1610 \pm 110 ab	1333 \pm 291 a	1786 \pm 492 b
	Malv	4108 \pm 195 a	5579 \pm 587 cd	5714 \pm 171 d	4535 \pm 367 ab	5247 \pm 305 bcd	5204 \pm 165 bcd	4932 \pm 727 bc
	Del Ac	31 \pm 9 a	46 \pm 4 b	42 \pm 4 ab	44 \pm 3 b	45 \pm 8 b	51 \pm 10 b	49 \pm 8 b
	Cian Ac	30 \pm 3 a	44 \pm 3 bc	39 \pm 4 ab	45 \pm 3 bc	43 \pm 4 bc	35 \pm 7 ab	52 \pm 13 c
	Pet Ac	54 \pm 7 a	90 \pm 9 c	85 \pm 8 bc	75 \pm 4 b	73 \pm 4 b	80 \pm 4 bc	75 \pm 6 b
	Pn Ac	41 \pm 5 a	59 \pm 4 b	58 \pm 9 b	52 \pm 9 ab	54 \pm 7 ab	49 \pm 10 ab	62 \pm 3 b
	Malv Ac	208 \pm 22 a	311 \pm 18 cd	315 \pm 13 d	260 \pm 20 b	286 \pm 20 bcd	315 \pm 18 d	275 \pm 29 bc
	Malv Cum cis	27 \pm 5 a	33 \pm 3 bc	41 \pm 3 d	30 \pm 3 ab	34 \pm 2 bc	34 \pm 1 bc	37 \pm 3 cd
	Del Cum	113 \pm 23 a	133 \pm 9 b	161 \pm 3 c	138 \pm 8 b	151 \pm 4 bc	143 \pm 10 bc	146 \pm 8 bc
	Malv Caf	26 \pm 0 a	28 \pm 4 ab	32 \pm 2 ab	26 \pm 1 a	32 \pm 2 ab	32 \pm 4 ab	34 \pm 7 b
	Cian Cum	141 \pm 2 a	149 \pm 10 ab	164 \pm 9 ab	174 \pm 9 bc	157 \pm 9 ab	143 \pm 17 a	196 \pm 35 c
	Pt Cum	196 \pm 31 a	224 \pm 23 ab	291 \pm 4 e	228 \pm 15 bc	262 \pm 7 de	255 \pm 14 bcd	259 \pm 17 cde
	Pn Cum	163 \pm 17 ab	160 \pm 41 a	211 \pm 34 ab	180 \pm 26 ab	190 \pm 16 ab	186 \pm 27 ab	213 \pm 23 b
Malv Cum trans	808 \pm 70 a	1105 \pm 125 bc	1251 \pm 39 c	932 \pm 92 a	1115 \pm 125 bc	1154 \pm 25 bc	1078 \pm 117 b	
2017	Del	759 \pm 21 a	859 \pm 120 ab	783 \pm 56 a	1039 \pm 49 d	1093 \pm 10 d	986 \pm 45 cd	912 \pm 79 bc
	Cian	511 \pm 42 a	1145 \pm 270 b	573 \pm 124 a	1120 \pm 70 b	1925 \pm 56 c	867 \pm 93 ab	1964 \pm 382 c
	Pet	889 \pm 17 a	846 \pm 120 a	885 \pm 55 a	1061 \pm 43 bc	1130 \pm 24 c	1094 \pm 66 bc	1009 \pm 60 b
	Pn	567 \pm 52 a	749 \pm 137 b	539 \pm 43 a	995 \pm 1 b	1578 \pm 45 d	1026 \pm 98 c	1489 \pm 101 c
	Malv	3048 \pm 187 bc	2080 \pm 246 a	2675 \pm 295 b	2968 \pm 106 b	2975 \pm 73 b	3447 \pm 315 c	2765 \pm 81 b
	Del Ac	29 \pm 2 a	30 \pm 2 a	31 \pm 1 ab	32 \pm 2 abc	37 \pm 1 c	36 \pm 4 bc	36 \pm 1 bc
	Cian Ac	22 \pm 1 a	33 \pm 4 b	23 \pm 1 a	35 \pm 1 b	59 \pm 1 c	35 \pm 2 b	58 \pm 7 c
	Pet Ac	53 \pm 2 b	46 \pm 8 a	52 \pm 3 b	58 \pm 1 cd	60 \pm 3 de	66 \pm 3 e	59 \pm 2 d
	Pn Ac	24 \pm 1 a	24 \pm 3 a	23 \pm 1 a	32 \pm 0 b	54 \pm 1 d	42 \pm 2 c	51 \pm 3 d
	Malv Ac	217 \pm 15 cd	133 \pm 14 a	176 \pm 21 b	173 \pm 2 b	194 \pm 0 bc	225 \pm 20 d	185 \pm 18 b
	Malv Cum cis	34 \pm 2 c	23 \pm 2 a	31 \pm 4 bc	25 \pm 1 a	25 \pm 1 a	27 \pm 2 ab	25 \pm 1 a
	Del Cum	113 \pm 2 c	82 \pm 14 a	105 \pm 10 bc	99 \pm 9 bc	93 \pm 2 ab	100 \pm 6 bc	96 \pm 4 ab
	Malv Caf	26 \pm 6 a	18 \pm 5 a	19 \pm 1 a	17 \pm 2 a	18 \pm 1 a	25 \pm 7 a	22 \pm 6 a
	Cian Cum	89 \pm 10 a	93 \pm 8 ab	86 \pm 8 a	113 \pm 9 b	134 \pm 2 c	107 \pm 13 ab	137 \pm 17 c
	Pet Cum	199 \pm 6 d	113 \pm 25 a	175 \pm 24 cd	141 \pm 9 b	154 \pm 4 bc	166 \pm 12 bc	153 \pm 7 bc
	Pn Cum	94 \pm 8 bc	68 \pm 7 a	83 \pm 10 b	102 \pm 4 c	140 \pm 3 e	127 \pm 4 d	125 \pm 3 d
Malv Cum trans	769 \pm 58 c	378 \pm 50 a	627 \pm 117 b	513 \pm 26 b	545 \pm 0 b	632 \pm 53 b	534 \pm 60 b	

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotiadiazol; Del, Delfinidina-3-monoglucósido; Cian, Cianidina-3-monoglucósido; Pet, Petunidina-3-monoglucósido; Pn, Peonidina-3-monoglucósido; Malv, Malvidina-3-monoglucósido; Ac, Acetil glucósidos; Cum, cumaril glucósidos; y Caf, cafeoil glucósidos. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$).

5.4.5.2 Análisis de antocianos por HPLC en vinos al final de la fermentación alcohólica.

Como en las uvas, los antocianos totales analizados en los vinos corresponden a la suma de antocianos no-acilados y acilados (Figura 5.14). En este caso, los antocianos no-acilados representaron aproximadamente el 75% del total de antocianos y, además de los antocianos encontrados en las uvas, se identificaron las vitisinas A y B. La formación de estos últimos compuestos ocurre durante la fermentación alcohólica a través de la reacción de malvidina 3-O-glucósido con ácido pirúvico (vitisina A) o con acetaldehído (vitisina B) (Portu et al., 2015). Las concentraciones obtenidas en los antocianos individuales se muestran en detalle en la Tabla 5.4.

Como era de esperar, en base a los resultados obtenidos en las uvas durante las dos campañas, observamos de forma general que los vinos elaborados en 2016 mostraron una mayor concentración de antocianos totales que los obtenidos en 2017 (Figuras 5.14 A y B).

En cuanto a los vinos elaborados en 2016 (Figura 5.14 A), encontramos que la concentración de antocianos totales, fue mayor solamente en aquellos vinos elaborados con uvas tratadas con BTH durante el envero; mientras que los vinos procedentes de uvas tratadas con BTH y MeJ+BTH durante mitad-de-maduración, tuvieron concentraciones incluso más bajas que los vinos control.

Los resultados obtenidos en 2017 (Figura 5.14 B), indicaron nuevamente que los vinos de uvas tratadas con BTH durante el envero, contenían concentraciones más altas de antocianos totales que los vinos de uvas control, tal como sucedió en 2016. No obstante, los vinos procedentes de uvas tratadas durante mitad-de-maduración, presentaron concentraciones ligeramente superiores de antocianos totales que los vinos control, pero no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Por último, si comparamos los resultados de los antocianos totales en las uvas (Figuras 5.13 A y B) y los antocianos totales en los vinos (Figuras 5.14 A y B), podemos observar que no todas las uvas que registraron una mayor concentración de antocianos totales tras la aplicación de elicitores, dieron lugar a vinos con mayor concentración de

antocianos que los vinos procedentes de uvas control. A este respecto, se han publicado resultados similares en varios estudios de la variedad Monastrell, tras la aplicación de MeJ y BTH (Paladines-Quezada, Moreno-Olivares, Fernández-Fernández, Bleda-Sánchez, et al., 2019; Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al., 2013), o MeJ sobre las variedades Tempranillo y Graciano (Portu et al., 2018), en los que también se apreciaron incrementos de antocianos en las bayas de uva, sin embargo, estos incrementos no se reflejaron en los vinos elaborados. Se ha demostrado que el conocimiento de las cantidades de antocianos en los hollejos de la uva, no es suficiente para estimar las concentraciones de antocianos en el vino, y esta falta de correlación se ha atribuido comúnmente a la retención parcial de estos antocianos, en las células de la piel debido al efecto barrera de las paredes celulares (Bautista-Ortín et al., 2016). Este hecho sugiere, tal como se explicó en el (Apartado 4.4.3), que la aplicación de elicitores principalmente MeJ y MeJ+BTH, pudieron conferir características estructurales más reforzadas a las paredes celulares de la piel de las uvas tratadas, dificultando la extracción de antocianos durante el proceso de vinificación.

Al igual que sucedió con los antocianos totales, los vinos de uvas tratadas con BTH durante el envero de 2016, fueron los únicos que mostraron una mayor concentración de antocianos no-acilados con respecto a los vinos de uvas control (Figura 5.14 C). En cambio, ninguno de los vinos de uvas tratadas durante mitad-de-maduración, mostraron mayores concentraciones de antocianos no-acilados que los vinos de uvas control. En el caso de la campaña 2017 (Figura 5.14 D), nuevamente detectamos que los vinos de uvas tratadas con BTH durante el envero, mostraron más antocianos no-acilados que los vinos de uvas control. Y por su parte, los vinos de uvas tratadas durante mitad-de-maduración, presentaron ligeros incrementos de antocianos no-acilados con respecto al control, pero no fueron estadísticamente significativas.

Con respecto a la concentración de antocianos acilados de los vinos elaborados en 2016 (Figura 5.14 E), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los vinos analizados, ya sea con uvas tratadas durante el envero o mitad-de-maduración. Sin embargo, en la campaña 2017 (Figura 5.14 F), los vinos de uvas tratadas con BTH durante el envero, mostraron mayores concentraciones de antocianos acilados que los vinos control. Lo mismo sucedió con los vinos de uvas tratadas con BTH en mitad-de-maduración. Hay que destacar la importancia que desempeñan los antocianos acilados en

el color de los vinos, debido a que participan en el proceso de copigmentación intramolecular, incrementando y estabilizando el color del vino (Ortega-Regules, 2006), por lo que una mayor concentración de antocianos acilados, se puede traducir en un incremento de la calidad sensorial de los vinos.

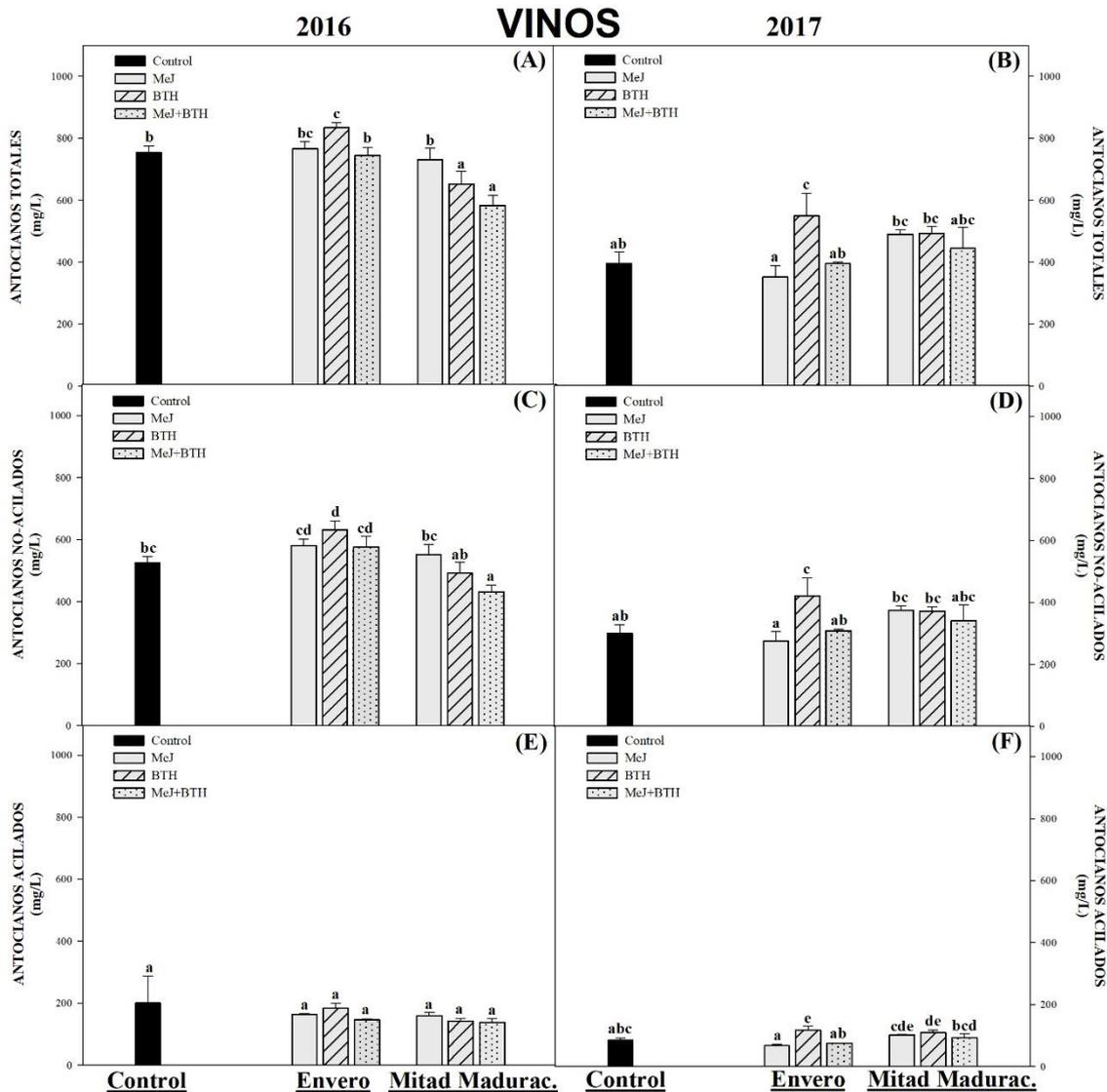


Figura 5.14 Concentración de antocianos medidos por HPLC en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

Tabla 5.4 Concentración de antocianos (mg/L) medidos por HPLC, en vinos al final de la fermentación alcohólica, elaborados con uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).

Año	Antocianos	Envero				Mitad-de-maduración		
		Control	MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH
2016	Del	46.3 ± 1.9 bc	54.3 ± 0.5 de	58.1 ± 0.5 ef	59.9 ± 0.4 f	50.0 ± 4.1 cd	41.6 ± 3.2 b	333.3 ± 1.7 a
	Cian	23.9 ± 1.1 bc	20.7 ± 2.1 ab	22.2 ± 2.1 abc	26.3 ± 0.1 c	31.5 ± 3.0 d	19.9 ± 1.4 ab	17.8 ± 0.9 a
	Pet	78.8 ± 1.4 b	89.4 ± 1.0 cd	95.0 ± 3.6 d	92.6 ± 3.6 d	81.1 ± 7.8 bc	70.8 ± 5.7 b	58.9 ± 2.6 a
	Pn	58.4 ± 1.2 ab	49.1 ± 7.3 a	53.7 ± 6.9 ab	53.9 ± 7.3 ab	63.8 ± 3.1 b	52.1 ± 0.5 ab	45.9 ± 2.9 a
	Malv	319.1 ± 3.8 bc	367.7 ± 15.7 de	403.2 ± 19.2 e	353.4 ± 4.9 cd	324.9 ± 16.1 bc	308.0 ± 24.0 ab	275.1 ± 14.2 a
	Vitisina A	7.1 ± 3.0 b	5.3 ± 0.1 ab	4.8 ± 0.3 ab	5.9 ± 0.5 ab	5.3 ± 0.2 ab	4.7 ± 0.2 ab	3.9 ± 0.5 a
	Del acetato	20.20 ± 10.3 a	13.2 ± 1.0 a	12.6 ± 1.1 a	14.3 ± 0.1 a	12.4 ± 1.1 a	11.2 ± 1.4 a	10.0 ± 1.6 a
	Vitisina B	8.8 ± 4.4 a	10.0 ± 3.7 a	8.2 ± 2.3 a	11.0 ± 2.9 a	8.6 ± 2.9 a	7.9 ± 2.3 a	7.1 ± 1.9 a
	Acetil vitisina A	9.4 ± 8.9 a	6.9 ± 4.5 a	6.4 ± 4.2 a	4.6 ± 1.8 a	7.2 ± 5.2 a	5.0 ± 0.1 a	3.6 ± 1.2 a
	Cian acetato	11.8 ± 5.3 a	9.4 ± 0.2 a	9.0 ± 0.6 a	9.6 ± 0.7 a	9.2 ± 0.1 a	8.3 ± 0.1 a	7.3 ± 0.7 a
	Pet acetato	7.2 ± 5.9 a	6.5 ± 4.1 a	5.1 ± 2.6 a	6.6 ± 4.4 a	6.2 ± 0.8 a	4.8 ± 1.2 a	5.1 ± 2.8 a
	Pn acetato	15.3 ± 2.0 a	15.0 ± 1.4 a	17.2 ± 2.5 a	14.3 ± 0.7 a	15.1 ± 2.9 a	13.7 ± 1.7 a	12.9 ± 2.7 a
	Malv acetato + Del cum	25.0 ± 5.7 a	25.0 ± 0.1 a	26.0 ± 1.4 a	23.5 ± 0.7 a	22.5 ± 0.7 a	22.0 ± 1.4 a	21.0 ± 1.4 a
	Pn caf	9.0 ± 4.2 a	7.5 ± 0.7 a	5.9 ± 0.1 a	7.5 ± 0.7 a	5.8 ± 0.2 a	6.1 ± 0.1 a	5.8 ± 0.6 a
	Cian caf+cum	10.7 ± 3.7 a	8.4 ± 0.5 a	9.3 ± 0.5 a	8.3 ± 0.9 a	9.9 ± 0.8 a	8.5 ± 0.2 a	7.7 ± 0.7 a
	Pet cum	15.4 ± 4.7 ab	14.3 ± 0.7 ab	17.5 ± 1.7 b	12.03 ± 0.2 ab	14.3 ± 2.0 ab	12.0 ± 1.0 ab	11.4 ± 1.7 a
	Malv cum cis	8.8 ± 2.0 b	4.0 ± 0.2 a	3.9 ± 0.9 a	4.2 ± 1.3 a	3.9 ± 0.0 a	2.9 ± 0.7 a	3.5 ± 0.1 a
	Pn cum	23.1 ± 4.9 b	10.2 ± 3.7 a	11.1 ± 2.2 a	7.9 ± 0.4 a	9.7 ± 1.4 a	9.5 ± 1.1 a	8.5 ± 1.6 a
	Malv cum trans	41.8 ± 0.3 ab	5.10 ± 1.1 c	64.9 ± 0.8 d	38.2 ± 3.2 a	49.6 ± 2.3 c	43.0 ± 4.0 ab	44.4 ± 2.8 bc
2017	Del	22.1 ± 1.9 a	26.2 ± 1.3 ab	37.3 ± 3.0 c	30.8 ± 0.3 bc	33.6 ± 2.5 bc	33.0 ± 0.4 bc	28.6 ± 6.2 ab
	Cian	9.9 ± 0.1 a	16.2 ± 1.9 ab	16.9 ± 0.9 ab	19.5 ± 0.8 b	30.3 ± 2.1 c	16.8 ± 0.3 ab	24.3 ± 8.1 bc
	Pet	41.3 ± 4.1 a	41.0 ± 4.5 a	61.1 ± 10.3 b	46.1 ± 0.3 a	52.4 ± 1.8 ab	52.6 ± 1.4 ab	46.3 ± 7.6 a
	Pn	24.9 ± 1.0 a	28.2 ± 4.7 ab	41.9 ± 2.7 bc	33.3 ± 0.8 abc	54.7 ± 4.2 d	40.6 ± 0.2 bc	45.6 ± 11.9 cd
	Malv	202.9 ± 18.4 ab	163.6 ± 15.0 a	263.8 ± 36.4 c	179.5 ± 3.0 a	204.2 ± 3.4 ab	229.3 ± 12.9 bc	195.5 ± 18.3 ab
	Vitisina A	3.8 ± 1.0 a	3.6 ± 0.5 a	4.7 ± 0.3 a	4.1 ± 0.3 a	4.8 ± 0.7 a	3.7 ± 0.2 a	3.7 ± 1.1 a
	Del acetato	6.2 ± 0.1 a	6.2 ± 1.0 a	8.7 ± 0.9 bc	6.9 ± 0.1 a	7.4 ± 1.1 ab	9.0 ± 0.4 c	7.2 ± 0.2 ab
	Vitisina B	1.9 ± 0.2 a	2.0 ± 0.1 a	2.2 ± 0.2 a	2.2 ± 0.0 a	2.4 ± 0.1 a	2.5 ± 0.2 a	2.3 ± 0.5 a
	Acetil vitisina A	4.5 ± 0.3 a	4.4 ± 0.5 a	5.0 ± 0.1 ab	4.9 ± 0.0 ab	5.0 ± 0.2 a	5.7 ± 0.2 b	4.7 ± 0.9 a
	Cian acetato	4.1 ± 0.5 a	5.4 ± 1.8 a	9.8 ± 0.9 b	8.3 ± 0.1 b	10.5 ± 0.1 b	10.4 ± 0.2 b	9.4 ± 1.8 b
	Pet acetato	5.3 ± 0.4 a	4.9 ± 0.4 a	6.9 ± 0.0 b	5.3 ± 0.0 a	6.6 ± 0.2 b	6.8 ± 0.3 b	6.0 ± 0.9 ab
	Pn acetato	8.0 ± 0.8 ab	6.8 ± 1.0 a	11.15 ± 1.4 c	7.7 ± 0.2 ab	11.0 ± 0.3 c	10.8 ± 0.6 c	9.7 ± 1.8 bc
	Malv acetato + Del cum	14.5 ± 0.7 ab	12.0 ± 0.8 a	18.5 ± 2.1 b	12.0 ± 0.1 a	16.1 ± 1.4 ab	17.0 ± 1.4 b	15 ± 1 ab
	Pn caf	3.8 ± 0.1 cd	2.7 ± 0.1 a	4.5 ± 0.3 e	3.0 ± 0.1 ab	3.6 ± 0.1 bc	4.2 ± 0.5 de	3.5 ± 0.1 bc
	Cian caf+cum	4.1 ± 0.0 a	3.8 ± 0.4 a	6.3 ± 0.6 c	4.5 ± 0.1 ab	7.1 ± 0.0 c	5.9 ± 0.0 c	5.7 ± 1.2 bc
	Pet cum	6.8 ± 0.7 bc	4.6 ± 0.2 a	9.3 ± 1.3 d	5.1 ± 0.2 ab	7.7 ± 0.3 cd	8.0 ± 0.7 cd	7.0 ± 1.3 bc
	Malv cum cis	2.9 ± 0.2 ab	2.2 ± 0.0 a	3.1 ± 0.3 b	2.1 ± 0.3 a	2.8 ± 0.2 ab	3.2 ± 0.7 b	2.8 ± 0.0 ab
	Pn cum	4.2 ± 0.0 a	3.0 ± 0.4 a	7.1 ± 0.6 c	3.6 ± 0.1 a	6.7 ± 0.2 bc	6.8 ± 0.0 bc	5.6 ± 1.2 b
	Malv cum trans	25.4 ± 2.5 a	14.8 ± 0.5 a	32.0 ± 3.5 d	16.2 ± 0.8 ab	23.1 ± 1.1 c	27.0 ± 2.8 cd	21.7 ± 3.0 bc

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotiadiazol; Del, Delfinidina-3-monoglucósido; Cian, Cianidina-3-monoglucósido; Pet, Petunidina-3-monoglucósido; Pn, Peonidina-3-monoglucósido; Malv, Malvidina-3-monoglucósido; Caf, cafeoil glucósidos; Cum, Cumaril glucósidos. Los datos representan las medias ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$).

5.4.6 CONCENTRACIÓN DE FLAVONOLES EN UVAS Y VINOS

5.4.6.1 Análisis de flavonoles por HPLC en pieles de uvas en el momento de la vendimia.

Se realizó un análisis de flavonoles de forma paralela al análisis de antocianos del apartado anterior, ya que los dos compuestos están estrechamente relacionados en la misma ruta biosintética. De hecho comparten la mayor parte de la ruta, de modo que un aumento en la actividad de las enzimas en la ruta biosintética de flavonoides, también puede afectar la concentración de estos compuestos (Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012). En el análisis por HPLC de los flavonoles individuales de las pieles de Monastrell (Tabla 5.5), se identificaron las formas glicosiladas de miricetina, quercetina, kampferol, siringetina e isoramnetina; lo cual coincide con lo encontrado por otros autores en la misma variedad de uva (Moreno-Pérez, 2013; Ruiz-García et al., 2012; Ruiz-García, et al., 2013).

Además, se calculó el valor medio de flavonoles totales en cada campaña, y se constató que durante 2016 se sintetizó una concentración de 51 $\mu\text{g/g}$ piel, frente a los 41 $\mu\text{g/g}$ piel de 2017; es decir, una diferencia del 20% entre una campaña y otra. En principio, estas diferencias interanuales pudieron deberse a lo que algunos autores han señalado sobre la biosíntesis de flavonoles en uvas, y es que ésta depende en mayor medida de la exposición a la radiación solar que otros compuestos fenólicos, lo que favorece la acumulación de flavonoles en uvas al aumentar las horas de exposición (Castillo-Muñoz, Gómez-Alonso, et al., 2009; Koyama et al., 2012; Mattivi, 2006). En este sentido, durante la etapa de maduración de las uvas (desde el envero hasta la vendimia), las viñas experimentaron unos valores medios de radiación solar de 270 y 262 (W/m^2) en 2016 y 2017, respectivamente (SIAM, 2019). Por lo que las diferencias encontradas en los valores medios de la concentración de flavonoles, parecen ajustarse a la radiación solar recibida en cada campaña. Es decir, la mayor radiación solar recibida por la viña en 2016, provocó seguramente una mayor concentración de flavonoles que en 2017.

En lo referente a los análisis de los flavonoles totales de la campaña 2016 (Figura 5.15 A), los resultados indicaron que los tratamientos con elicitores, ya sea aplicados en

el envero o mitad-de-maduración, no provocaron cambios en la concentración de flavonoles totales de las uvas tratadas, si se comparan con las uvas control. Es necesario señalar que existe poca información sobre el análisis de flavonoles, en uvas de vinificación después de ser tratadas con elicitores. No obstante, algunos estudios realizados tras la aplicación de ácido abscísico, o una combinación de MeJ+BTH en la variedad Monastrell, también indicaron que la concentración de flavonoles no se vio alterada en las uvas tratadas (Ruiz-García et al. 2013). Así mismo, se ha mostrado que la aplicación de MeJ en la uva de vinificación Tempranillo, tampoco provocó diferencias en la concentración de flavonoles totales (Portu et al., 2015). Sin embargo, Ruiz-García et al. (2012) observaron un incremento de flavonoles totales durante dos campañas tras la aplicación de BTH sobre la variedad Monastrell, y durante una campaña con la aplicación de MeJ en la misma variedad.

Por su parte, en la campaña 2017 tampoco se observaron diferencias sustanciales en la concentración de flavonoles totales (Figura 5.15 B), salvo en las uvas tratadas con MeJ+BTH durante el envero, las cuales presentaron una menor concentración de flavonoles totales que las uvas control. Esta reducción se debió principalmente por la reducción en los principales flavonoles: miricetina-3-glucósido y quercetina-3-glucósido (Tabla 5.5). Gil-Muñoz et al. (2017) también vieron reducida la concentración de miricetina-3-glucósido, tras la aplicación de MeJ y BTH sobre la variedad Merlot, o tras aplicar BTH en las variedades Syrah y Monastrell; o la reducción de quercetina-3-glucósido en las 3 variedades tratadas con MeJ. Sin embargo, la concentración de miricetina-3-glucósido se vio incrementada cuando aplicaron MeJ sobre la variedad Monastrell. En otro estudio con las variedades Tempranillo y Graciano, la aplicación de MeJ incrementó la concentración de quercetina-3-glucósido (Portu et al., 2018). Por lo tanto, la respuesta de la biosíntesis de flavonoles a la aplicación de elicitores es muy variada.

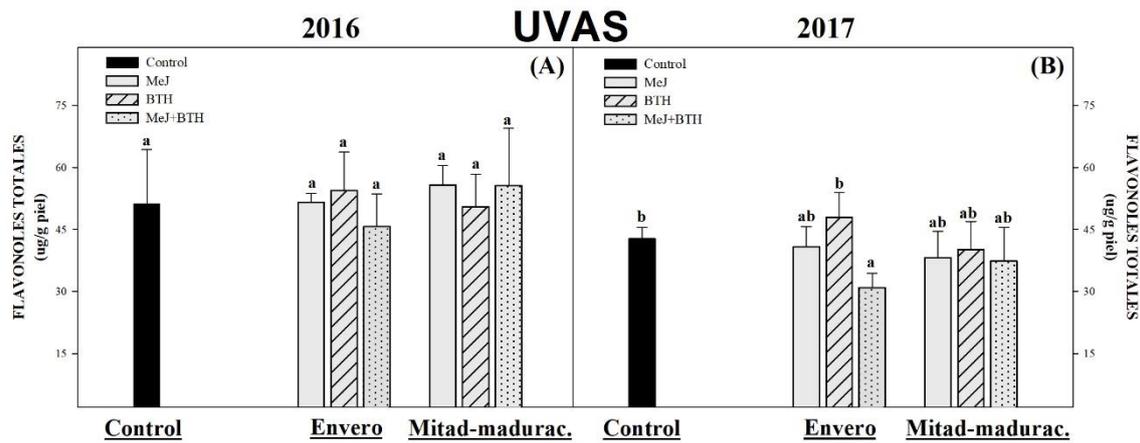


Figura 5.15 Concentración de flavonoles medidos por HPLC en la piel de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

Así mismo, los resultados de los flavonoles individuales de las dos campañas, indicaron que los derivados de quercetina destacaron sobre el resto de los flavonoles, ya que representaron en conjunto entre el 50 y el 64 % de los flavonoles totales de las pieles de uvas (Tabla 5.5). Ruiz-García et al. (2012) también encontraron que los derivados de quercetina fueron los flavonoles predominantes en uvas Monastrell. En cuanto al efecto de la aplicación de elicitores MeJ, BTH y la mezcla de ambos, se observó que dichos tratamientos apenas provocaron variaciones en la biosíntesis de los flavonoles individuales de las uvas tratadas. Al parecer, el aumento en la síntesis de antocianos por la aplicación de elicitores vista anteriormente, no implica necesariamente una inducción significativa en la síntesis de flavonoles, aunque los dos compuestos compartan gran parte de la ruta biosintética.

Tabla 5.5 Concentración de flavonoles ($\mu\text{g/g}$ piel) medidos por HPLC, en la piel de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).

Año	Flavonoles ($\mu\text{g/g}$ piel)	Control	Envero			Mitad-de-maduración		
			MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH
2016	M-3-glc	12.8 \pm 2.1 a	16.4 \pm 2.6 a	16.3 \pm 3.9 a	11.6 \pm 1.0 a	15.2 \pm 0.7 a	15.3 \pm 2.6 a	15.3 \pm 4.4 a
	Q-3-glc	26.3 \pm 8.0 a	23.0 \pm 1.0 a	25.1 \pm 3.9 a	20.8 \pm 4.5 a	27.3 \pm 3.1 a	24.1 \pm 4.8 a	28.3 \pm 7.4 a
	K-3-gal	0.5 \pm 0.1 a	0.5 \pm 0.2 a	0.4 \pm 0.0 a	0.4 \pm 0.2 a	0.3 \pm 0.1 a	0.3 \pm 0.1 a	0.4 \pm 0.1 a
	K-3-glc + S-3-glc	2.5 \pm 1.1 a	2.4 \pm 0.4 a	2.9 \pm 0.3 a	2.9 \pm 0.9 a	3.0 \pm 0.5 a	2.1 \pm 0.8 a	2.6 \pm 0.8 a
	I-3-glc	1.0 \pm 0.1 a	1.0 \pm 0.5 a	1.0 \pm 0.6 a	0.9 \pm 0.4 a	0.9 \pm 0.1 a	1.1 \pm 0.3 a	1.0 \pm 0.1 a
	Q-3-glcU	8.1 \pm 2.2 a	8.3 \pm 1.3 a	8.7 \pm 1.4 a	9.1 \pm 1.5 a	9.0 \pm 1.1 a	7.5 \pm 0.6 a	7.9 \pm 1.3 a
2017	M-3-glc	10.4 \pm 0.8 c	5.1 \pm 1.1 a	11.1 \pm 0.4 c	6.1 \pm 0.9 a	8.1 \pm 1.9 b	10.5 \pm 1.0 c	9.4 \pm 1.2 bc
	Q-3-glc	21.0 \pm 2.1 a	20.2 \pm 2.1 a	23.6 \pm 5.1 a	13.7 \pm 1.7 a	19.3 \pm 4.4 a	19.7 \pm 4.4 a	13.6 \pm 11.7 a
	K-3-gal	1.5 \pm 0.1 a	3.0 \pm 0.3 c	2.7 \pm 0.7 bc	2.0 \pm 0.4 abc	1.9 \pm 0.4 abc	1.6 \pm 0.6 ab	2.9 \pm 1.0 c
	K-3-glc + S-3-glc	0.1 \pm 0.0 a	0.5 \pm 0.4 b	0.9 \pm 0.1 b	0.7 \pm 0.1 b	0.62 \pm 0.04 b	0.56 \pm 0.17 b	0.86 \pm 0.31 b
	I-3-glc	9.7 \pm 0.7 abc	12.0 \pm 2.5 c	9.3 \pm 0.3 bc	8.1 \pm 1.7 ab	8.1 \pm 0.6 ab	7.3 \pm 0.9 a	10.4 \pm 1.9 bc
	Q-3-glcU	0.1 \pm 0.1 a	0.1 \pm 0.0 a	0.4 \pm 0.1 b	0.3 \pm 0.1 b	0.20 \pm 0.01 a	0.33 \pm 0.03 b	0.35 \pm 0.06 b

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotiadiazol; M, miricetina; Q, quercetina; K, kaempferol; I, isoramnetina; S, siringetina; glc, *O*-glucósido; gal, *O*-galactósido; glcU, *O*-glucurónido. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$).

5.4.6.2 Análisis de flavonoles por HPLC en vinos al final de la fermentación alcohólica.

Así mismo, se calculó la concentración de flavonoles en los vinos de cada campaña. Se identificaron las formas glicosiladas de: miricetina, quercetina, laricitrina, kaempferol, isoramnetina y siringetina, cuyas concentraciones individuales se presentan en la Tabla 5.6.

Así encontramos que la concentración media en los vinos de 2016 se situó en 146 mg/L, en comparación con los 116 mg/L registrados en 2017; es decir, aproximadamente un 20 % menos que la campaña anterior, algo esperado en base a las diferencias registradas en el análisis de flavonoles de las pieles de uvas, donde también se encontró un 20 % menos de flavonoles en esta campaña.

Por otra parte, los análisis de los vinos elaborados durante 2016 (Figura 5.16 A), determinaron que los vinos de uvas tratadas durante el envero, presentaron mayor concentración de flavonoles totales que los vinos de uvas tratadas durante mitad-de-maduración. Además, las uvas tratadas con MeJ y BTH durante el envero, produjeron vinos con una mayor concentración de flavonoles totales que los vinos control. En relación a esto, Gil-Muñoz et al. (2017) encontraron que vinos procedentes de uvas Syrah y Monastrell tratadas con MeJ durante el envero, o vinos de uvas Merlot tratadas con BTH, incrementaron la concentración de flavonoles totales con respecto a los vinos de uvas control. Ruiz-García et al. (2012) también observaron incrementos durante una campaña, en la concentración de flavonoles totales de vinos procedentes de uvas Monastrell tratadas con BTH. En el caso de los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración, se observó claramente que los vinos de uvas tratadas con MeJ, fueron los únicos que obtuvieron una mayor concentración de flavonoles; de hecho, el resto de los vinos elaborados con uvas tratadas con BTH y MeJ+BTH, registraron menos contenidos de flavonoles que los vinos elaborados con las uvas control.

En los vinos elaborados en la campaña 2017 (Figura 5.16 B), observamos que tanto en los vinos procedentes de uvas tratadas durante el envero, así como en mitad-de-maduración, las concentraciones de flavonoles totales fueron estadísticamente similares a la de los vinos procedentes de uvas control.

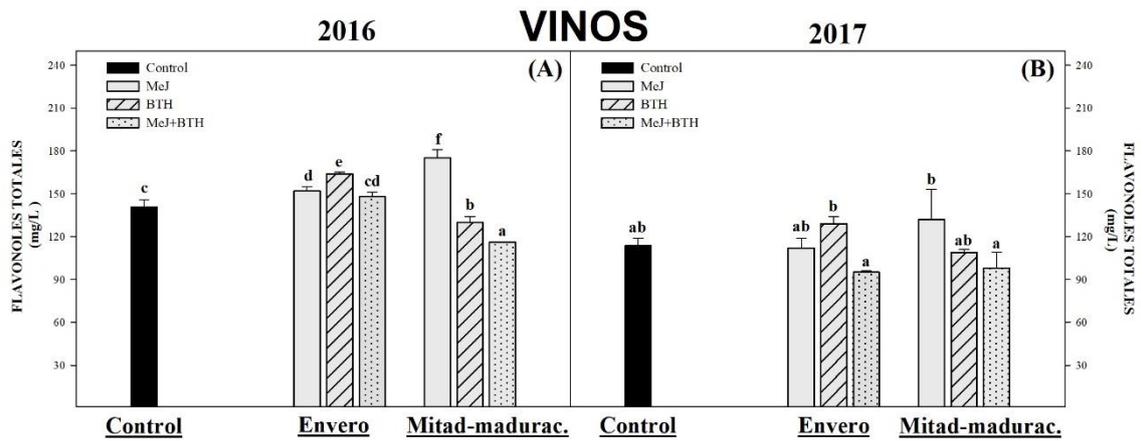


Figura 5.16 Concentración de flavonoles medidos por HPLC en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

Así mismo, en la Tabla 5.6 se presentan los análisis de los flavonoles de los vinos elaborados, donde se pudo comprobar que los compuestos derivados de quercetina fueron los flavonoles predominantes en los vinos (tal como sucedió con las uvas), y representaron entre el 50 y el 63 % de los flavonoles totales. Con respecto al efecto de los tratamientos, no se observaron diferencias en los diferentes flavonoles, si los comparamos con los vinos de uvas control. Sin embargo, otros estudios sí que vieron incrementados varios de los compuestos individuales estudiados, en vinos elaborados con uvas Syrah, Monastrell y Tempranillo tratadas con MeJ (Gil-Muñoz, Bautista-Ortín, et al., 2017; Portu et al., 2015), o Merlot tratada con BTH (Gil-Muñoz, Bautista-Ortín, et al., 2017).

Tabla 5.6 Concentración de flavonoles en vinos (mg/L) de la variedad Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).

Año	Flavonoles	Control	Envero			Mítad de maduración		
			MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH
2016	M-3-gal	4.3 ± 0.3 a	6.0 ± 1.3 a	7.0 ± 0.7 a	5.7 ± 1.0 a	6.7 ± 3.0 a	7.4 ± 0.4 a	4.7 ± 2.1 a
	M-3-glc	6.9 ± 0.8 bc	6.4 ± 0.4 abc	7.5 ± 0.2 c	6.4 ± 0.4 abc	7.1 ± 0.4 c	5.8 ± 0.5 ab	5.6 ± 0.4 a
	Q-3-gal	11.3 ± 4 a	12.2 ± 4 a	12.9 ± 4 a	14.1 ± 1 a	14.0 ± 1 a	12.9 ± 3 a	11.4 ± 2 a
	Q-3-glcU	19.9 ± 14 a	24.9 ± 20 a	25.4 ± 21 a	23.1 ± 18 a	24.6 ± 19 a	16.6 ± 11 a	16.2 ± 12 a
	Q-3-glc	40.3 ± 1 a	44.9 ± 3 a	48.6 ± 1 a	43.0 ± 4 a	53.3 ± 26 a	35.4 ± 19 a	32.0 ± 13 a
	L-3-glc	32.6 ± 5 a	32.3 ± 4 a	35.6 ± 7 a	31.4 ± 3 a	41.8 ± 44 a	29.3 ± 28 a	25.3 ± 23 a
	K-3-gal	5.7 ± 4.4 a	6.0 ± 4.5 a	6.5 ± 4.6 a	6.0 ± 3.8 a	6.2 ± 5.3 a	5.3 ± 4.6 a	5.4 ± 3.9 a
	K-3-glc	5.0 ± 2.2 a	3.8 ± 0.0 a	4.1 ± 0.0 a	4.1 ± 0.6 a	4.6 ± 0.5 a	3.2 ± 0.4 a	3.0 ± 0.5 a
	I-3-glc	9.0 ± 3.2 a	9.2 ± 3.6 a	9.9 ± 4.5 a	9.0 ± 3.8 a	10.4 ± 4.4 a	7.4 ± 1.2 a	7.0 ± 1.5 a
	S-3-glc	5.5 ± 0.7 a	6.1 ± 0.8 a	6.9 ± 0.2 a	5.7 ± 1.2 a	6.6 ± 1.5 a	6.2 ± 0.9 a	5.8 ± 0.7 a
2017	M-3-gal	24.9 ± 1 c	17.4 ± 2 a	30.2 ± 2 d	16.3 ± 1 a	23.7 ± 2 bc	26.1 ± 1 cd	19.9 ± 3 ab
	M-3-glc	7.3 ± 0.7 a	6.6 ± 0.6 a	9.8 ± 1.1 c	7.0 ± 0.6 a	7.9 ± 0.3 ab	9.1 ± 0.3 bc	7.7 ± 0.3 ab
	Q-3-gal	7.4 ± .8 a	7.7 ± 1.3 a	6.9 ± 0.2 a	6.0 ± 0.1 a	8.4 ± 1.7 a	5.8 ± 0.4 a	5.8 ± 0.8 a
	Q-3-glcU	24.9 ± 3 ab	28.3 ± 5 b	24.4 ± 3 ab	22.7 ± 1 ab	26.8 ± 3 ab	19.7 ± 1 a	19.9 ± 1 a
	Q-3-glc	38.3 ± 4 ab	42.6 ± 4 ab	45.4 ± 0 ab	33.4 ± 0 a	52.8 ± 14 b	37.6 ± 3 a	33.4 ± 5 a
	L-3-glc	4.8 ± 0.0 cd	3.9 ± 0.2 ab	5.3 ± 0.6 d	3.4 ± 0.3 a	5.1 ± 0.2 d	4.7 ± 0.1 cd	4.3 ± 0.4 bc
	K-3-gal	0.3 ± 0.0 a	0.6 ± 0.0 b	0.3 ± 0.0 a	0.6 ± 0.1 b	0.7 ± 0.0 b	0.3 ± 0.0 a	0.8 ± 0.1 c
	K-3-glc	0.1 ± 0.0 a	0.4 ± 0.1 b	0.1 ± 0.1 a	0.3 ± 0.0 b	0.4 ± 0.0 b	0.1 ± 0.0 a	0.4 ± 0.1 b
	I-3-glc	3.2 ± 0.2 ab	3.5 ± 0.3 ab	3.7 ± 0.2 ab	3.0 ± 0.1 a	4.2 ± 0.3 c	3.4 ± 0.0 ab	3.4 ± 0.3 ab
	S-3-glc	2.5 ± 0.0 bc	2.0 ± 0.2 ab	2.8 ± 0.2 c	1.8 ± 0.2 a	2.5 ± 0.1 bc	2.6 ± 0.1 c	2.4 ± 0.4 bc

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotiadiazol; M, miricetina; Q, quercetina; L, laricitrina; K, kaempferol; I, isoramnetina; S, siringetina; gal, *O*-galactósido; glc, *O*-glucósido; glcU, *O*-glucurónido. Los datos representan las medias ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$).

5.4.7 CONCENTRACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN UVAS Y VINOS

En este apartado se presentan la concentración de proantocianidinas totales, grado medio de polimerización (gmP) y el porcentaje de galoilación (%Gal) de los flavanoles presentes en las muestras de las dos campañas de estudio. Estos resultados están representados en gráficos de barras, mientras que los porcentajes de los flavanoles monoméricos de (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-galato y (-)-epigallocatequina se muestran detalladamente en las Tablas 5.7, 5.8 y 5.9. Paralelamente, se analizó por cromatografía de exclusión por tamaño, la distribución de las masas moleculares de las proantocianidinas, cuyos perfiles se muestran en gráficas en el apartado 5.4.7.3.

5.4.7.1 Análisis de proantocianidinas por HPLC en las uvas en el momento de la vendimia.

5.4.7.1.1 Análisis de proantocianidinas por HPLC en las pieles de uvas.

Los análisis de proantocianidinas en las pieles de las bayas de Monastrell, registraron concentraciones medias de 6908 $\mu\text{g/g}$ de piel de uva en la campaña 2016, y 5817 $\mu\text{g/g}$ de piel de uva durante la campaña 2017. Estas concentraciones son acordes con los resultados encontrados por otros investigadores (Busse-Valverde et al., 2012; Moreno-Pérez et al., 2013; Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al., 2013), en las que también se analizó uvas Monastrell cultivadas en la misma localidad que la de nuestros ensayos. No obstante, al igual que ocurrió con los antocianos, las diferencias observadas en la concentración de proantocianidinas de las pieles de las dos campañas, parecen depender también de los factores climáticos como la temperatura y la pluviosidad (Hernández-Jiménez et al., 2009). Además, se ha descrito que las proantocianidinas de las pieles son más sensibles a las variaciones climáticas que las proantocianidinas de las semillas, pudiendo afectar a su contenido relativo (Downey et al., 2008).

Por otra parte, el análisis de la concentración de proantocianidinas de las pieles de uvas de la campaña 2016 (Figura 5.17 A), indicaron que los tratamientos aplicados

durante el envero, afectaron en menor medida que los tratamientos aplicados en mitad-de-maduración. Así, las uvas tratadas con MeJ durante el envero, fueron las únicas que obtuvieron una mayor concentración de proantocianidinas en las pieles que las uvas control. No obstante, todos los tratamientos aplicados en mitad-de-maduración (MeJ, BTH y MeJ+BTH) lograron incrementar la concentración de proantocianidinas de las pieles, mostrando valores estadísticamente superiores que las pieles de las uvas control.

En cambio, en los resultados obtenidos en la campaña 2017 no se apreciaron diferencias entre las uvas tratadas en el envero y las uvas tratadas a mitad-de-maduración (Figura 5.17 B). Por su parte, las uvas tratadas durante el envero, mostraron concentraciones de proantocianidinas similares a las uvas control, aunque se observó una mayor concentración en las uvas tratadas con MeJ+BTH, pero no fue lo suficiente como para diferenciarse estadísticamente del control. Lo mismo ocurrió con las uvas tratadas en mitad-de-maduración, en las que se observaron también ligeros incrementos en la concentración de proantocianidinas de algunas uvas tratadas, pero fueron similares a las concentraciones obtenidas en las uvas control.

En relación a esto, se han realizado varios estudios sobre el efecto de la aplicación de elicitores como MeJ y BTH en uvas de la variedad Monastrell solo en el momento de envero, en las cuales también se vio incrementada la concentración de proantocianidinas de las pieles (Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012, 2013). Así mismo, la aplicación de MeJ provocó incrementos de las proantocianidinas de las pieles de las variedades Syrah y Monastrell (Gil-Muñoz, Bautista-Ortín, et al., 2017); o en la variedad Merlot, tras la aplicación de BTH (Iriti et al., 2005). Sin embargo, la aplicación de MeJ no provocó cambios en la concentración de proantocianidinas de las pieles de la variedad Tempranillo (Portu et al., 2015) o Merlot (Gil-Muñoz, Bautista-Ortín, et al., 2017). Algunos de estos estudios realizaron ensayos durante dos campañas, pero el efecto de los elicitores en algunos casos solo se observó durante una de ellas. Por lo que el efecto de MeJ y BTH sobre las proantocianidinas de las pieles de uva, parece tener dependencia interanual e intervarietal.

En cuanto al análisis del gmP de las proantocianidinas de las pieles (Figura 5.17 C y D), se apreciaron ligeras diferencias entre las dos campañas estudiadas, ya que se registró aproximadamente un gmP de 16 en la campaña 2016, mientras que en 2017 el

gmP fue de 19. Estas diferencias pueden ser el resultado de la mayor sensibilidad de las proantocianidinas de las pieles a las variaciones meteorológicas (Downey et al., 2008), las cuales afectan también a su gmP (Koyama et al., 2012).

Durante la campaña 2016 encontramos que las uvas tratadas en el envero (Figura 5.17 C), así como las tratadas en mitad-de-maduración, mostraron un gmP similar al de las uvas control; a excepción de las uvas tratadas con MeJ+BTH durante el envero, cuyas pieles tenían proantocianidinas con un menor gmP.

En la campaña 2017 (Figura 5.17 D), tampoco se observaron grandes diferencias entre el gmP de las proantocianidinas de las pieles de las uvas tratadas en el envero, y las tratadas en mitad-de-maduración. Sin embargo, las pieles de uvas tratadas con MeJ+BTH durante el envero, presentaron proantocianidinas con un gmP menor que el de las uvas control, al igual que ocurrió en 2016. Lo mismo sucedió en el caso de uvas tratadas con MeJ+BTH durante mitad-de-maduración, donde las proantocianidinas de las pieles también registraron un gmP menor que el de las uvas control.

La disminución en el gmP de las proantocianidinas de las pieles debida a la aplicación de MeJ+BTH durante las dos campañas, puede repercutir en una menor sensación de astringencia en los vinos elaborados, ya que como se ha descrito en la bibliografía, esta sensación aumenta con un mayor gmP (Chira et al., 2009, 2012; De Freitas & Mateus, 2001). En otro estudio en el que se aplicó MeJ sobre la variedad Monastrell y Tempranillo (Gil-Muñoz et al., 2018), también encontraron disminuciones de este parámetro durante una añada en el gmP de Monastrell, sin embargo, el gmP de las proantocianidinas de las pieles de la variedad Tempranillo se vio incrementado. Por su parte Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al. (2013), estudiaron el efecto de la aplicación de BTH+MeJ sobre la variedad Monastrell, sin registrar efectos evidentes en el gmP de las proantocianidinas de las pieles.

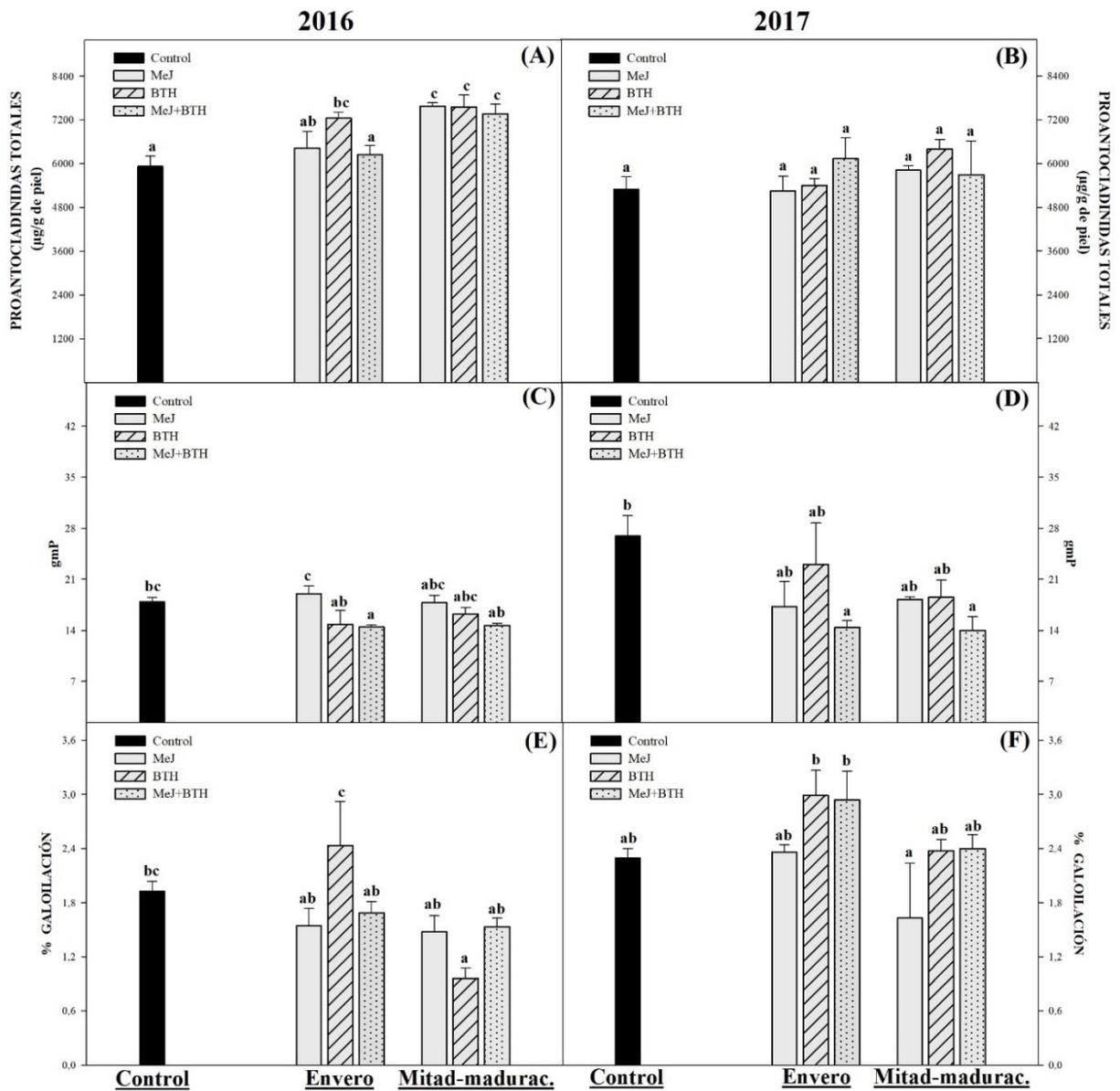


Figura 5.17 Concentración y valores de composición de proantocianidinas de la piel de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

Por otra parte, en el análisis del porcentaje de galoilación (%Gal) de las proantocianidinas de las pieles (Figuras 5.17 E y F), se apreciaron claras diferencias entre las dos campañas de estudio, ya que en 2016 las proantocianidinas presentaron un menor %Gal que las muestras de 2017, siendo sus valores promedio de 1,7 y 2,4 respectivamente.

En los análisis de la campaña 2016 (Figura 5.17 E), se observó que las pieles de uvas tratadas en el envero con BTH, mostraron proantocianidinas con un mayor %Gal que los de las uvas control. Por el contrario, las uvas tratadas con BTH durante mitad-de-maduración, registraron proantocianidinas con un %Gal más bajo que las pieles de las uvas control.

En cambio, en la campaña 2017 (Figura 5.17 F) se observó que las pieles de uvas tratadas durante el envero, mostraron proantocianidinas más galoiladas que las pieles de las uvas tratadas en mitad-de-maduración. Sin embargo, la gran variabilidad de los datos obtenidos, no permitieron diferenciar estadísticamente los distintos tratamientos frente al control.

En lo referente al efecto de los tratamientos sobre el %Gal de las proantocianidinas de las pieles, varios estudios han mostrado disminuciones en este parámetro después de la aplicación de MeJ en uvas Monastrell (Gil-Muñoz et al., 2018); así como en varios clones de Monastrell (Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2013); o en la variedad Merlot tratada con MeJ y BTH (Gil-Muñoz et al., 2017).

Por último, en la Tabla 5.7 se muestran detalladamente los porcentajes de los flavanoles monoméricos analizados en las pieles de las uvas control, y en las uvas tratadas con los distintos elicitores en los dos momentos de maduración. En esta tabla se distingue claramente que la subunidad más abundante fue la (-)-epicatequina de extensión, con una contribución aproximada del 60% durante las dos campañas, seguida por la (-)-epigallocatequina de extensión con un 29% de aportación. Cabe señalar que la subunidad monomérica (-)-epigallocatequina de extensión, solo la podemos encontrar en las pieles de las bayas (Gerós et al., 2012). El resto de las subunidades como (+)-catequina y (-)-epicatequina terminal, así como (+)-catequina y (-)-epicatequina-galato de extensión, estuvieron representadas en mucha menor proporción, con porcentajes por debajo del 4%. Por el contrario, no se detectó (-)-epicatequina-galato terminal en las pieles, ya que es un flavanol que suele estar presente en mayor proporción en las semillas (Moreno-Pérez, 2013). Además, al realizar el análisis estadístico de los porcentajes de los flavanoles monoméricos, no se observó ninguna tendencia ni variaciones significativas como consecuencia de la aplicación de elicitores, excepto en las uvas tratadas con MeJ+BTH durante el envero, que lograron incrementar el porcentaje de (-)-epicatequina terminal

durante las dos campañas, si lo comparamos con las respectivas uvas control. Gil-Muñoz et al. (2017) también encontraron incrementos en la misma subunidad monomérica, tras la aplicación por separado de MeJ y BTH en las variedades Syrah y Merlot.

Tabla 5.7 Concentración de proantocianidinas medidas por HPLC en la piel de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).

Año	Control	Envero			Mitad de maduración			
		MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH	
2016	$\mu\text{g/g piel}$	5928.0 \pm 480.4 a	6426.9 \pm 805.6 ab	7243.8 \pm 287.2 bc	6246.4 \pm 430.8 a	7584.5 \pm 147.9 c	7557.8 \pm 568.1 c	7371.8 \pm 451.7 c
	gmP	17.9 \pm 1.1 bc	19.0 \pm 1.9 c	14.8 \pm 3.3 ab	14.5 \pm 0.5 a	17.8 \pm 1.8 abc	16.3 \pm 1.6 abc	14.7 \pm 0.5 ab
	% Galoilación	1.9 \pm 0.2 bc	1.5 \pm 0.3 ab	2.4 \pm 0.8 c	1.7 \pm 0.2 ab	1.5 \pm 0.3 ab	1.0 \pm 0.2 a	1.5 \pm 0.2 ab
	%C _t	4.0 \pm 0.2 a	4.0 \pm 0.2 a	4.2 \pm 0.7 ab	4.8 \pm 0.3 b	3.9 \pm 0.0 a	3.7 \pm 0.1 a	4.1 \pm 0.3 a
	%E _t	1.5 \pm 0.1 ab	1.3 \pm 0.3 a	2.8 \pm 1.0 d	2.1 \pm 0.1 abcd	1.7 \pm 0.5 abc	2.5 \pm 0.7 bcd	2.7 \pm 0.6 cd
	%EG _t	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	%C _e	1.3 \pm 0.1 a	1.3 \pm 0.1 a	1.6 \pm 0.7 a	1.3 \pm 0.2 a	1.4 \pm 0.2 a	1.3 \pm 0.1 a	1.2 \pm 0.1 a
	%E _e	63.2 \pm 1.7 a	62.7 \pm 0.3 a	62.3 \pm 2.5 a	63.7 \pm 2.5 a	64.6 \pm 2.0 a	65.1 \pm 1.7 a	64.6 \pm 1.5 a
	%EG _e	1.9 \pm 0.2 bc	1.6 \pm 0.3 ab	2.4 \pm 0.8 c	1.7 \pm 0.2 ab	1.5 \pm 0.3 ab	1.0 \pm 0.2 a	1.5 \pm 0.2 ab
%EGC _e	28.0 \pm 1.7 ab	29.2 \pm 0.3 b	26.6 \pm 1.1 ab	26.4 \pm 2.4 ab	26.9 \pm 1.4 ab	26.5 \pm 1.8 ab	25.8 \pm 1.6 a	
2017	$\mu\text{g/g piel}$	5302.2 \pm 596.3 a	5247.3 \pm 702.8 a	5397.7 \pm 339.5 a	6130.0 \pm 995.5 a	5815.8 \pm 225.0 a	6394.0 \pm 466.4 a	5693.8 \pm 1593.3 a
	gmP	27.0 \pm 4.8 b	17.2 \pm 6.0 ab	23.0 \pm 9.9 ab	14.4 \pm 1.6 a	18.2 \pm 0.6 ab	18.5 \pm 4.1 ab	14.0 \pm 3.3 a
	% Galoilación	2.3 \pm 0.2 ab	2.4 \pm 0.1 ab	3.0 \pm 0.5 b	2.9 \pm 0.6 b	1.6 \pm 1.1 a	2.4 \pm 0.2 ab	2.4 \pm 0.3 ab
	%C _t	2.7 \pm 0.4 a	3.0 \pm 0.9 a	2.2 \pm 0.9 a	3.8 \pm 0.3 ab	3.2 \pm 0.4 a	3.3 \pm 0.8 a	5.1 \pm 1.8 b
	%E _t	1.1 \pm 0.5 a	3.2 \pm 1.1 b	2.6 \pm 1.0 b	3.2 \pm 0.8 b	2.3 \pm 0.2 ab	2.2 \pm 0.5 ab	2.4 \pm 0.4 ab
	%EG _t	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	%C _e	2.0 \pm 0.1 ab	2.0 \pm 0.2 ab	1.9 \pm 0.4 ab	1.6 \pm 0.4 a	2.2 \pm 0.3 b	2.0 \pm 0.3 ab	2.0 \pm 0.1 ab
	%E _e	59.6 \pm 0.6 a	59.3 \pm 1.8 a	61.1 \pm 1.7 ab	62.0 \pm 1.2 ab	62.1 \pm 1.4 ab	62.6 \pm 1.3 b	60.7 \pm 2.1 ab
	%EG _e	2.3 \pm 0.2 ab	2.4 \pm 0.1 ab	3.0 \pm 0.5 b	2.9 \pm 0.6 b	1.6 \pm 1.1 a	2.4 \pm 0.2 ab	2.4 \pm 0.3 ab
%EGC _e	32.4 \pm 1.2 c	30.1 \pm 1.8 bc	29.3 \pm 0.9 ab	26.5 \pm 1.6 a	28.6 \pm 0.5 ab	27.4 \pm 0.2 ab	27.4 \pm 3.2 ab	

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotriazol; gmP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina-galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina-galato de extensión; EGC_e: (-)-epigallocatequina de extensión. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$).

5.4.7.1.2 Análisis de proantocianidinas por HPLC en las semillas de uvas.

Los resultados de la concentración de proantocianidinas presentes en las semillas, revelaron claras diferencias entre las dos campañas de estudio. La concentración media de proantocianidinas durante 2016 se situó en 36243 $\mu\text{g/g}$ de semilla, y de 48451 $\mu\text{g/g}$ de semilla en 2017; es decir, en 2017 se registró alrededor de un 30% más de proantocianidinas que la campaña anterior. Estos resultados ponen de manifiesto que en esta campaña las uvas fueron vendimiadas con las semillas más inmaduras que en 2016. A este respecto, se ha comentado que la concentración de proantocianidinas puede verse afectada por las condiciones ambientales, afectando su biosíntesis (Downey et al., 2008; Hernández-Jiménez et al., 2009). Así mismo, en los análisis físico-químicos generales de la uva en el momento de la vendimia (Apartado 5.4.1), ya se manifestó que las altas temperaturas experimentadas durante los dos meses anteriores a la vendimia de 2017, pudieron provocar irregularidades en el proceso normal de maduración de las bayas de Monastrell, ya que también se observó una menor concentración de °Brix que la campaña anterior.

No obstante, las concentraciones de proantocianidinas encontradas en las semillas de Monastrell, se correspondieron nuevamente con las halladas por otros autores en la misma variedad y localidad (Busse-Valverde et al., 2012; Moreno-Pérez et al., 2013; Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al., 2013). Además, la concentración de proantocianidinas de las semillas fue mucho mayor que en las pieles, presentando además un menor grado de polimerización y un mayor porcentaje de galoilación que las proantocianidinas de las pieles, tal como se describió previamente en la bibliografía (Cheynier et al., 2000; Kennedy et al., 2000; Verries et al., 2008). El mayor porcentaje de galoilación de las proantocianidinas de las semillas, es debido a la presencia de (-)-epicatequina-galato terminal (Moreno-Pérez, 2013), la cual estaba ausente en la piel de la uva.

En la campaña 2016 (Figura 5.18 A), observamos que las concentraciones de proantocianidinas de semillas de uvas tratadas en mitad-de-maduración, fueron ligeramente superiores que las de las uvas tratadas en el envero. Así, encontramos que BTH fue el único de los tratamientos aplicados en el envero, que provocó que las semillas presentaran mayor concentración de proantocianidinas que las semillas de las uvas

control. Por su parte, todos los tratamientos aplicados en mitad-de-maduración; es decir, MeJ, BTH y MeJ+BTH provocaron que la concentración de proantocianidinas de las semillas, fuera superior al encontrado en las semillas de las uvas control.

Así mismo, cuando se analizaron las uvas de la campaña 2017 (Figura 5.18 B), se observó nuevamente que las uvas tratadas en mitad-de-maduración, registraron mayores concentraciones de proantocianidinas en las semillas que las uvas tratadas en el envero. De hecho, observamos que ninguno de los elicitores aplicados durante el envero, provocó diferencias significativas con respecto a las proantocianidinas de las semillas de las uvas control. En cambio, el tratamiento con MeJ aplicado en mitad-de-maduración, sí que provocó una mayor concentración de estos compuestos en las semillas, si las comparamos con las uvas control.

Al igual que en las pieles, varios estudios han mostrado incrementos en la concentración de proantocianidinas de las semillas, tras la aplicación de MeJ y BTH en varios clones de Monastrell (Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2013); Syrah (Gil-Muñoz et al., 2017); o la aplicación de BTH sobre Merlot y Monastrell (Gil-Muñoz et al., 2017).

En lo referente al gmP de las proantocianidinas de las semillas, encontramos que los resultados fueron similares entre las dos campañas de estudio, situando el valor medio de este parámetro en alrededor de 6 (Figura 5.18 C y D).

En el caso de los resultados de 2016 (Figura 5.18 C), observamos que el gmP de las proantocianidinas de uvas tratadas en el envero fue prácticamente igual que el de las uvas tratadas en mitad-de-maduración. En esta campaña 2016, la aplicación de elicitores no produjo cambios en el gmP de las proantocianidinas, para ninguno de los dos momentos de aplicación de los tratamientos.

En cambio, en los resultados de 2017 (Figura 5.18 D), si se apreciaron diferencias entre los distintos momentos de aplicación. Las proantocianidinas de las semillas de uvas tratadas en mitad-de-maduración, registraron un gmP más bajo que el de las tratadas en el envero. Cuando se analizaron los resultados de los tratamientos aplicados en envero,

encontramos que ninguno de los tratamientos provocó diferencias significativas en el gmp de las proantocianidinas de las semillas.

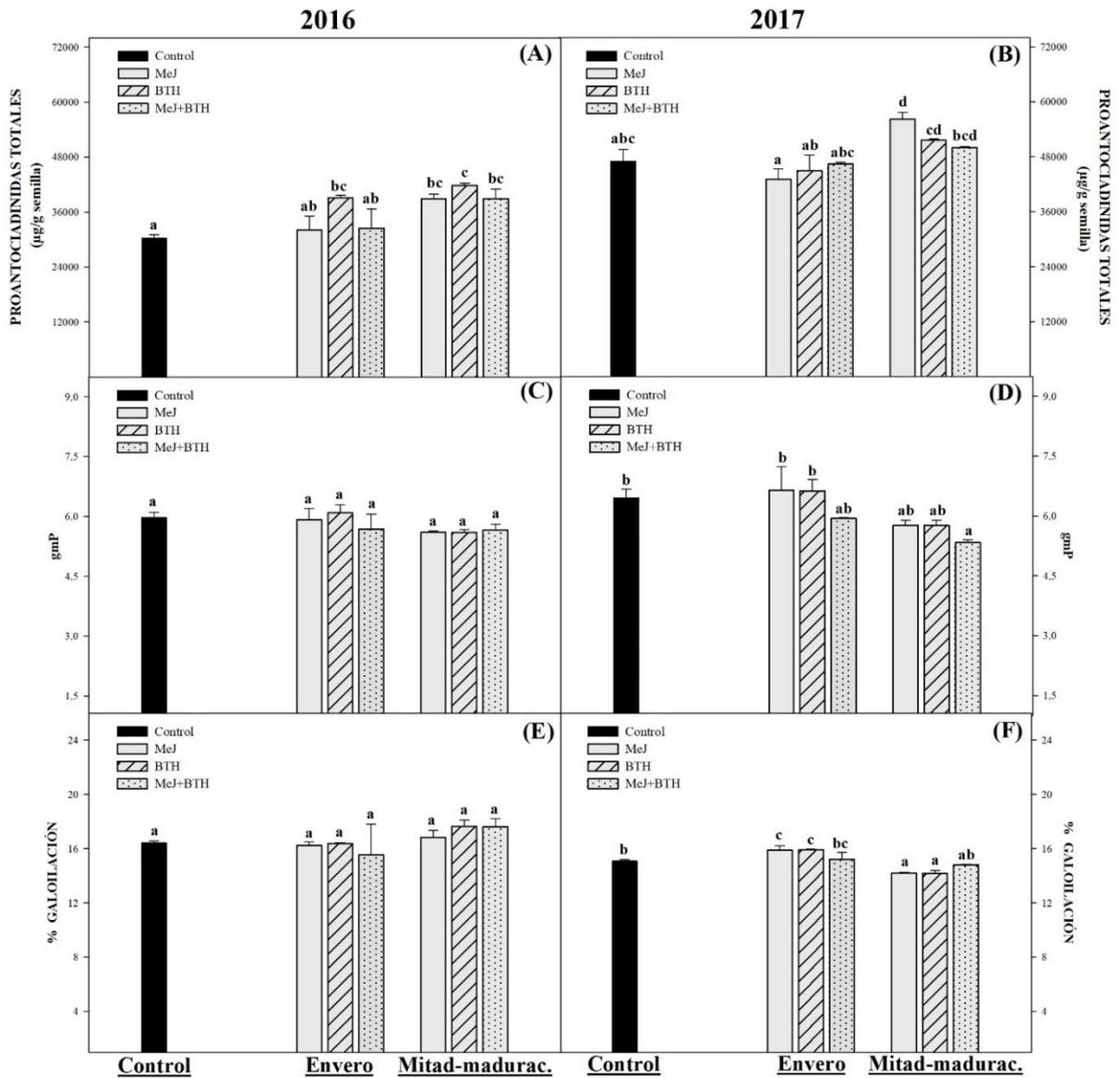


Figura 5.18 Concentración y valores de composición de proantocianidinas en semillas de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

En cambio, los resultados de los tratamientos en mitad-de-maduración, mostraron que la aplicación de MeJ+BTH provocó un menor gmP en las proantocianidinas de las uvas tratadas, si lo comparamos con el gmP de las uvas control.

Nuevamente observamos el efecto de la aplicación del tratamiento MeJ+BTH durante mitad-de-maduración, esta vez en la disminución del gmP de las proantocianidinas de las semillas. Y tal como se mencionó en el caso de las pieles, este menor gmP puede traer consigo una menor sensación de astringencia en los vinos elaborados.

Así mismo, se determinó el porcentaje de galoilación (%Gal) en las proantocianidinas de las semillas (Figura 5.18 E y F), cuyo valor promedio fue del 16,7% en 2016, mientras que en 2017 fue del 15%, un porcentaje algo menor. No obstante, estos valores están dentro de los rangos descritos en la bibliografía (Prieur et al., 1994; Souquet et al., 1996).

En los resultados de 2016 (Figura 5.18 E), los %Gal de las proantocianidinas de semillas de uvas tratadas en el envero, fueron muy parecidos a los de las uvas tratadas en mitad-de-maduración. Donde observamos que ninguno de los tratamientos generó cambios en el %Gal, indistintamente del momento de aplicación.

En cambio, en los resultados de la campaña 2017 (Figura 5.18 F) sí que se observó una ligera disminución en el %Gal de las proantocianidinas de semillas de uvas tratadas en mitad-de-maduración, comparadas con las uvas tratadas en envero. En estas últimas encontramos que los tratamientos MeJ y BTH, provocaron incrementos en el %Gal de las proantocianidinas de semillas; mientras que esos mismos tratamientos (MeJ y BTH), disminuyeron el %Gal cuando fueron aplicados en mitad-de-maduración.

En estudios recientes también se encontraron resultados variados en cuanto al efecto de la aplicación de MeJ y BTH, sobre el %Gal de las proantocianidinas de las semillas. Algunos autores observaron que la aplicación de MeJ y BTH en la misma variedad, causaban tanto incrementos como disminuciones, o incluso no se observaba ningún efecto sobre el %Gal (Gil-Muñoz et al., 2018; Ruiz-García et al., 2012; Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al., 2013; Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2013).

Por otra parte, al igual que lo observado en las pieles, encontramos que la subunidad monomérica más abundante en las semillas fue la (-)-epicatequina de extensión, con una aportación aproximada del 63% durante las dos campañas (Tabla 5.8); seguida muy por debajo por la (-)-epicatequina-galato de extensión, con un 11% de aportación. El resto de flavanoles monoméricos, tales como las subunidades terminales de (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-galato, así como la (+)-catequina de extensión, se encontraron en porcentajes aún más bajos. Así mismo, no se observaron variaciones significativas en los porcentajes de los flavanoles monoméricos como consecuencia de la aplicación de elicitores durante las dos campañas.

Tabla 5.8 Concentración de proantocianidinas en semillas de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).

Año	Control	Envero			Mitad de maduración			
		MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH	
2016	µg/g semilla	30385.6 ± 1134.9 a	32045.6 ± 5372.5 ab	39139.9 ± 829.9 bc	32498.0 ± 7160.8 ab	38907.3 ± 1675.7 bc	41800.1 ± 906.5 c	38926.6 ± 3700.5 bc
	gmP	6.0 ± 0.2 a	5.9 ± 0.5 a	6.1 ± 0.3 a	5.7 ± 0.7 a	5.6 ± 0.1 a	5.6 ± 0.1 a	5.7 ± 0.7 a
	% Galoilación	16.4 ± 0.3 a	16.2 ± 0.5 a	16.4 ± 0.1 a	15.5 ± 4.0 a	16.8 ± 0.8 a	17.6 ± 0.8 a	17.6 ± 1.1 a
	%C_t	5.8 ± 0.2 a	5.7 ± 0.4 a	5.8 ± 0.2 a	5.9 ± 0.7 a	5.8 ± 0.1 a	5.5 ± 0.4 a	5.2 ± 0.4 a
	%E_t	6.7 ± 0.5 a	7.0 ± 1.3 a	6.7 ± 0.8 a	6.3 ± 0.9 a	6.9 ± 0.5 a	6.6 ± 0.6 a	6.7 ± 0.2 a
	%EG_t	4.3 ± 0.6 a	4.3 ± 0.1 a	3.9 ± 0.2 a	5.6 ± 2.3 a	5.1 ± 0.7 a	5.7 ± 0.9 a	5.8 ± 1.3 a
	%C_e	7.5 ± 0.5 a	7.9 ± 0.4 a	8.0 ± 0.3 a	7.9 ± 1.8 a	7.7 ± 0.4 a	7.9 ± 0.4 a	6.9 ± 0.4 a
	%E_e	63.6 ± 0.9 a	63.1 ± 1.2 a	63.1 ± 0.5 a	64.4 ± 2.3 a	62.7 ± 0.5 a	62.4 ± 0.3 a	63.6 ± 0.3 a
	%EG_e	12.1 ± 0.3 b	11.9 ± 0.1 b	12.5 ± 0.3 b	9.9 ± 2.1 a	11.7 ± 0.2 b	11.9 ± 0.1 b	11.8 ± 0.3 b
2017	µg/g semilla	47007.7 ± 4561.9 abc	43056.7 ± 3930.6 a	44958.3 ± 5972.4 ab	46422.0 ± 311.5 abc	56142.5 ± 2654.9 d	51591.4 ± 527.7cd	49981.3 ± 311.5 bcd
	gmP	6.5 ± 0.4 b	6.6 ± 1.0 b	6.6 ± 0.5 b	5.9 ± 0.0 ab	5.8 ± 0.2 ab	5.8 ± 0.2 ab	5.3 ± 0.1 a
	% Galoilación	15.1 ± 0.2 b	15.9 ± 0.6 c	15.9 ± 0.1 c	15.2 ± 0.9 bc	14.2 ± 0.1 a	14.2 ± 0.4 a	14.8 ± 0.1 ab
	%C_t	5.6 ± 1.3 ab	6.0 ± 0.5 bc	5.6 ± 0.2 ab	5.7 ± 0.3 abc	5.6 ± 0.1 abc	5.5 ± 0.2 a	6.1 ± 0.2 abc
	%E_t	6.1 ± 0.6 ab	5.2 ± 2.7 a	5.9 ± 0.8 a	7.3 ± 0.1 abc	8.1 ± 0.7 bc	8.2 ± 0.3 bc	8.8 ± 0.3 c
	%EG_t	3.9 ± 0.1 a	4.0 ± 0.1 a	3.7 ± 0.4 a	3.8 ± 0.3 a	3.6 ± 0.2 a	3.8 ± 0.3 a	3.9 ± 0.1 a
	%C_e	8.7 ± 0.4 bc	9.3 ± 1.2 c	8.4 ± 0.1 bc	9.3 ± 0.2 c	7.8 ± 0.2 ab	7.3 ± 0.3 a	8.3 ± 0.4 b
	%E_e	64.6 ± 1.2 c	63.6 ± 1.4 bc	64.3 ± 0.9 c	62.5 ± 0.4 ab	64.2 ± 0.4 c	64.9 ± 0.5 c	62.0 ± 0.7 a
	%EG_e	11.2 ± 0.3 bcd	11.9 ± 0.5 de	12.2 ± 0.5 e	11.4 ± 0.6 cd	10.6 ± 0.2 ab	10.4 ± 0.3 a	10.9 ± 0.2 abc

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotiadiazol; gmP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina-galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina-galato de extensión. Los datos representan las medias ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$).

5.4.7.2 Análisis de proantocianidinas por HPLC en vinos al final de la fermentación alcohólica

Los análisis de proantocianidinas de los vinos tras finalizar la fermentación alcohólica, revelaron diferencias significativas entre las elaboraciones de las dos campañas de estudio (Figura 5.19). Los vinos elaborados en 2016, registraron una concentración media de proantocianidinas de 380 mg/L; mientras que la concentración de los vinos de 2017 fue de 568 mg/L; es decir, un 50% superior que los vinos de la campaña anterior. Esta mayor concentración de proantocianidinas en los vinos de 2017, podría deberse a la mayor concentración de proantocianidinas observada en las semillas de las bayas, cuyo hecho se atribuyó a un proceso de maduración irregular por las altas temperaturas soportadas en ese año, dando como resultado uvas con semillas más inmaduras que en 2016. Con respecto a esto, varios estudios han demostrado la correlación entre el estado de maduración de las uvas en el momento de la vendimia, y la concentración de proantocianidinas liberadas en el vino. Busse-Valverde et al. (2010) indicaron que cuando las semillas no se encuentran suficientemente maduras y las estructuras celulares de sus tejidos muestran rigidez, la maceración prefermentativa en frío (en ausencia de alcohol) es capaz de favorecer la extracción de proantocianidinas de las semillas. En un estudio relacionado, Harbertson et al. (2008) analizaron más de 360 vinos comerciales, y encontraron que la concentración de proantocianidinas oscilaba entre 58 y 1895 mg/L, atribuyendo esta gran variabilidad al diferente grado de maduración de la uva empleada. Así mismo, se ha encontrado que la difusión de proantocianidinas desde la uva al vino, parece depender en gran medida de la interacción con los antocianos, debido a la competencia por los sitios de adsorción con las paredes celulares de las pieles (Bautista-Ortín et al., 2016). No obstante, las concentraciones de proantocianidinas encontradas en los vinos elaborados, están dentro de los rangos mostrados en otros estudios, en los que también se analizó vinos elaborados con uvas Monastrell de la misma zona de estudio (Busse-Valverde et al., 2012; Moreno-Pérez et al., 2013; Ruiz-García, Gil-Muñoz, et al., 2013).

En lo referente a los análisis de la campaña 2016 (Figura 5.19 A), observamos que los vinos de uvas tratadas durante mitad-de-maduración, mostraron concentraciones de

proantocianidinas ligeramente superiores que los vinos procedentes de uvas tratadas en el envero. No obstante, las uvas tratadas durante el envero con MeJ, BTH y MeJ+BTH, dieron lugar a vinos con más cantidad de proantocianidinas que los vinos elaborados con uvas control. Lo mismo sucedió con las uvas tratadas con MeJ, BTH y MeJ+BTH durante mitad-de-maduración, ya que al igual que sucedió con las uvas tratadas en el envero, éstas también dieron lugar a vinos con mayor concentración de proantocianidinas que los vinos de uvas control.

Cuando se analizaron los vinos de la campaña 2017 (Figura 5.19 B), se observó nuevamente que las concentraciones de proantocianidinas de los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración, fueron ligeramente superiores que las concentraciones de los vinos de uvas tratadas durante el envero. Sin embargo, la alta variabilidad en los resultados obtenidos, no permitió diferenciar estadísticamente los vinos de uvas control con los vinos de uvas tratadas, ya sea en envero o mitad-de-maduración. A pesar de ello, se puede apreciar que los vinos de uvas tratadas durante el envero, mostraron concentraciones inferiores de proantocianidinas que los vinos de uvas control. En referencia a esto, varios estudios han mostrado que las cantidades de proantocianidinas de las uvas, no se correlacionan directamente con las cantidades detectadas en los vinos, y que las cantidades encontradas con frecuencia son mucho más bajas de lo esperado (Bautista-Ortín et al., 2016).

En cuanto al gmP, los análisis mostraron una marcada diferencia entre los vinos de las dos campañas (Figura 5.19 C y D). En 2016 el gmP se situó en 12,6, mientras que en 2017 fue de apenas 5,6; es decir, menos de la mitad que el gmP de la campaña anterior. Este mayor gmP de los vinos de la campaña 2016, puede atribuirse a una mayor concentración de proantocianidinas provenientes de las pieles (Cheynier et al., 2000; Labarbe et al., 1999). Sin embargo, con un elevado grado de polimerización, las moléculas se vuelven insolubles y pueden llegar a precipitar (Zamora, 2003). Por el contrario, el gmP más bajo detectado en los vinos de 2017, puede atribuirse a una mayor proporción de proantocianidinas liberadas de las semillas. Lo cual afianza lo descrito anteriormente, en el que unas semillas más inmaduras y por tanto con mayor carga de tánica, podrían ser la causa de una mayor concentración de proantocianidinas encontradas en los vinos de 2017.

En el caso de los análisis del gmP de los vinos elaborados en 2016 (Figura 5.19 C), se observaron claras diferencias entre los momentos de aplicación, ya que los vinos elaborados con uvas tratadas en el envero, registraron un mayor gmP que los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración. Además, observamos que todos los vinos provenientes de uvas tratadas con MeJ, BTH y MeJ+BTH durante el envero, presentaron un gmP más alto que los vinos de uvas control, siendo los vinos de uvas tratadas con BTH los que obtuvieron el gmP más alto. Así mismo, las uvas tratadas con MeJ y BTH durante mitad-de-maduración produjeron vinos con un gmP mayor que los vinos de uvas control.

Por el contrario, cuando se analizó el gmP de los vinos elaborados en 2017 (Figura 5.19 D), no se observaron diferencias entre los vinos de uvas tratadas en el envero y mitad-de-maduración. Así mismo, en los vinos de uvas tratadas durante el envero, no se mostraron diferencias entre el gmP de los vinos de uvas tratadas con elicitores y los vinos de uvas control. Lo mismo ocurrió con los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración, ya que el gmP de todos ellos fue similar al gmP de los vinos de uvas control.

Así mismo, se analizó el porcentaje de galoilación (%Gal) de los vinos elaborados (Figuras 5.19 E y F), cuyos resultados indicaron que el %Gal durante 2016 alcanzó un valor promedio de 6,5; mientras que en 2017 el %Gal fue de 7,1, un porcentaje ligeramente superior que el de 2016. Esto refuerza la hipótesis de que los vinos elaborados en 2017, tuvieron una mayor contribución de taninos procedentes de las semillas (Prieur et al., 1994).

En el análisis del %Gal los vinos de la campaña 2016 (Figura 5.19 E), observamos que los vinos elaborados con uvas tratadas durante el envero, mostraron un %Gal más bajo que aquellos vinos elaborados con uvas tratadas en mitad-de-maduración. Sin embargo, los vinos de uvas tratadas en el envero no mostraron diferencias entre tratamientos y, además, el %Gal fue más bajo que el de los vinos de uvas control. Del mismo modo, las uvas tratadas con MeJ en mitad-de-maduración también produjeron vinos con un %Gal más bajo que los vinos de uvas control; sin embargo, los vinos de uvas tratadas con BTH y MeJ+BTH presentaron un %Gal similar que los vinos de uvas control.

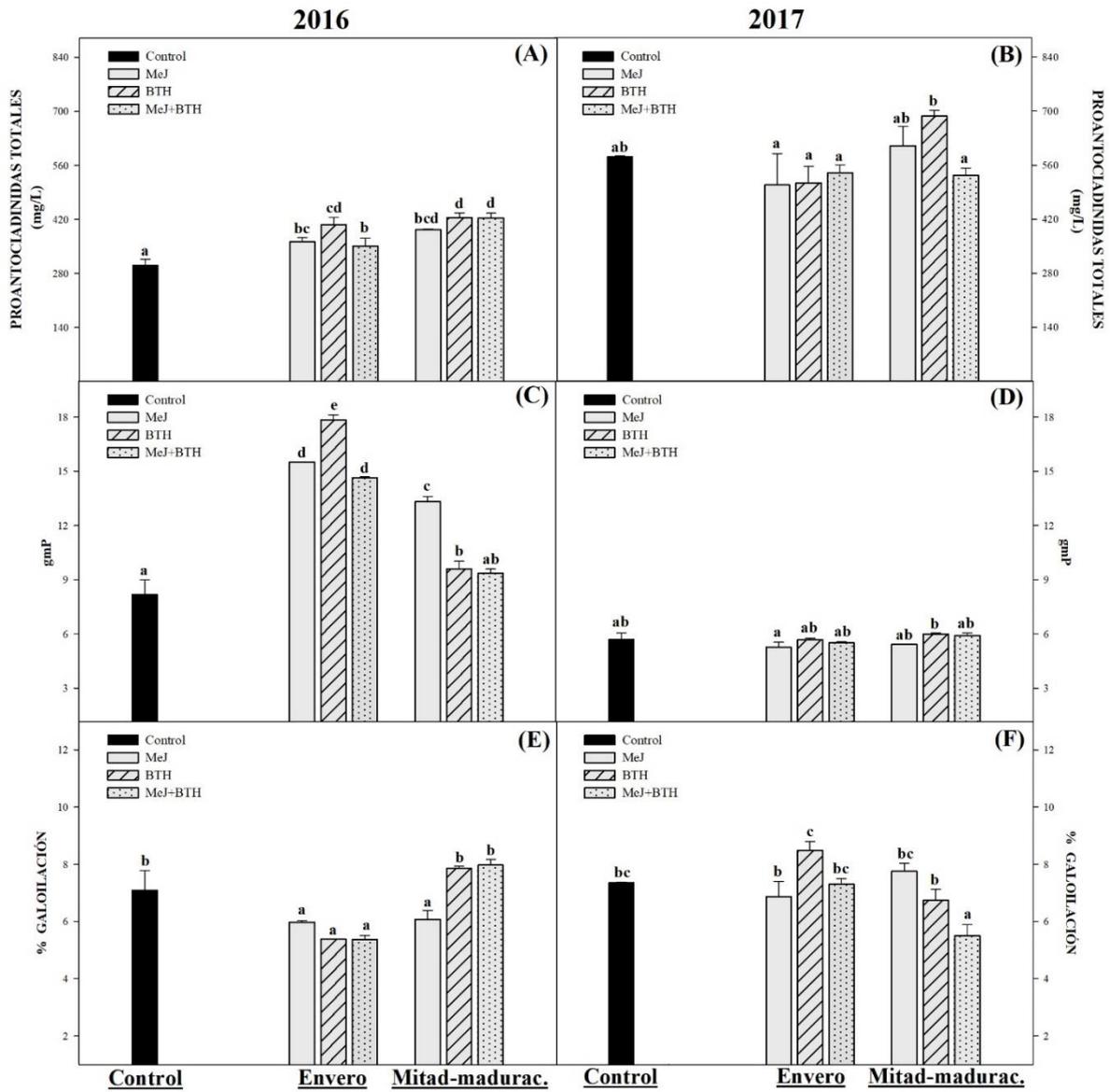


Figura 5.19 Concentración y valores de composición de proantocianidinas en vinos de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017). Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

En cuanto a la campaña 2017 (Figura 5.19 F), observamos que los vinos de uvas tratadas tanto en envero como en mitad-de-maduración, presentaron un %Gal muy parecido entre ellos. Así mismo, el %Gal de vinos de uvas tratadas durante el envero fue similar a los vinos de uvas control. Siguiendo esta tendencia, los vinos de uvas tratadas con MeJ y BTH durante mitad-de-maduración, también presentaron un %Gal similar a los vinos de uvas control; sin embargo, el %Gal de los vinos de uvas tratadas con

MeJ+BTH en mitad-de-maduración, presentaron un menor %Gal que los vinos de uvas control.

Por último, los porcentajes de los flavanoles monoméricos presentes en los vinos elaborados, se muestran al detalle en la Tabla 5.9. Donde nuevamente encontramos que la subunidad más abundante fue la (-)-epicatequina de extensión, la cual representó el 59% del total de flavanoles de los vinos de las dos campañas estudiadas. Así mismo, la segunda subunidad en importancia fue la (-)-epigallocatequina de extensión, la cual contribuyó con un 17%. Cabe recordar que esta última subunidad solo puede proceder de las pieles (Gerós et al., 2012), y su presencia puede aportar suavidad a los vinos, ya que se ha demostrado que estos flavanoles monoméricos reducen la percepción de astringencia (Vidal et al., 2003), siendo por tanto de suma importancia para la calidad final de los vinos. El resto de flavanoles monoméricos se presentaron en porcentajes más bajos, como es el caso de la (+)-catequina, (-)-epicatequina y (-)-epicatequina-galato terminal, así como (+)-catequina y (-)-epicatequina-galato de extensión. Un aspecto relevante fue el observado en la (+)-catequina terminal, ya que en los vinos de 2016 representó alrededor del 4%, mientras en los vinos de 2017 este valor fue del 11%; es decir, casi 3 veces superior que en 2016. Con respecto a este comportamiento, no se ha encontrado información suficiente para dar explicación a lo que pudo haber ocurrido en estos vinos, ya que las concentraciones de (+)-catequina terminal en las pieles de la campaña 2016 fueron mayores a las registradas en 2017, y en el caso de las semillas, la concentración fue similar en las dos campañas.

Cuando se analizaron los porcentajes de las distintas subunidades de flavanoles monoméricos, observamos que todos los vinos de 2016 procedentes de uvas tratadas con MeJ, BTH y MeJ+BTH, ya sea cuando fueron aplicados en el envero o mitad-de-maduración, registraron porcentajes de (+)-catequina terminal más bajos que los vinos de uvas control. Lo mismo ocurrió con la (-)-epicatequina-galato terminal, pero en este caso solo los vinos elaborados a partir de uvas tratadas durante el envero con MeJ, BTH y MeJ+BTH mostraron porcentajes más bajos que los vinos de uvas control. Este menor porcentaje de (-)-epicatequina-galato terminal, pudo ser el responsable del menor %Gal observado en estos vinos (Figura 5.19 E). Otro aspecto relevante se observó en la (-)-epicatequina de extensión, ya que todos los vinos elaborados a partir de uvas tratadas con

los elicitores MeJ, BTH y MeJ+BTH (aplicados en los dos momentos de maduración), mostraron un mayor porcentaje de (-)-epicatequina de extensión que los vinos elaborados a partir de uvas control.

No obstante, en los vinos elaborados en 2017 no se observaron variaciones significativas en los porcentajes de los flavanoles monoméricos como consecuencia de la aplicación de elicitores.

Tabla 5.9 Concentración de proantocianidinas (mg/L) en vinos de la variedad Monastrell, durante dos campañas (2016 y 2017).

Año	Control	Envero			Mitad de maduración			
		MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH	
2016	Proantocianidinas Totales	301.9 ± 21.1 a	361.8 ± 16.7 bc	406.3 ± 27.5 cd	350.8 ± 29.2 b	393.1 ± 3.8 bcd	425.2 ± 16.2 d	424.0 ± 16.9 d
	gmP	8.2 ± 1.1 a	15.5 ± 0.0 d	17.8 ± 0.4 e	14.6 ± 0.1 d	13.3 ± 0.4 c	9.6 ± 0.6 b	9.3 ± 0.4 ab
	% Galoilación	7.1 ± 1.0 b	6.0 ± 0.1 a	5.4 ± 0.0 a	5.4 ± 0.2 a	6.1 ± 0.4 a	7.9 ± 0.1 b	8.0 ± 0.3 b
	%C _t	6.8 ± 0.2 f	2.9 ± 0.1 b	2.2 ± 0.0 a	3.4 ± 0.2 c	3.3 ± 0.1 c	4.1 ± 0.2 d	5.5 ± 0.2 e
	%E _t	2.3 ± 0.5 b	1.4 ± 0.0 ab	1.8 ± 0.2 ab	1.9 ± 0.0 ab	1.7 ± 0.1 ab	2.2 ± 1.1 ab	1.1 ± 0.2 ab
	%EG _t	3.2 ± 1.0 bc	2.1 ± 0.1 a	1.7 ± 0.0 a	1.5 ± 0.2 a	2.5 ± 0.4 ab	4.1 ± 0.3 c	4.1 ± 0.0 c
	%C _e	9.7 ± 1.9 a	10.4 ± 0.2 a	10.9 ± 0.0 a	10.7 ± 0.2 a	10.2 ± 0.0 a	9.6 ± 0.2 a	10.0 ± 0.0 a
	%E _e	57.6 ± 0.4 a	61.9 ± 0.3 de	62.2 ± 0.3 e	61.7 ± 0.1 cde	60.8 ± 0.4 bc	60.6 ± 0.5 b	61.0 ± 0.4 bcd
	%EG _e	4.0 ± 0.0 b	3.9 ± 0.0 b	3.7 ± 0.0 ab	3.8 ± 0.0 ab	3.6 ± 0.0 a	3.8 ± 0.2 ab	3.9 ± 0.3 b
%EGC _e	16.4 ± 0.6 c	17.4 ± 0.1 e	17.7 ± 0.2 de	17.0 ± 0.3 cd	17.9 ± 0.1 e	15.6 ± 0.2 b	14.3 ± 0.2 a	
2017	Proantocianidinas Totales	581.8 ± 3.6 ab	508.2 ± 114.7 a	514.3 ± 61.0 a	540.1 ± 29.1 a	610.4 ± 70.5 ab	687.2 ± 20.1 b	633.8 ± 25.5 a
	gmP	5.7 ± 0.5 ab	5.3 ± 0.4 a	5.7 ± 0.1 ab	5.5 ± 0.1 ab	5.4 ± 0.0 ab	6.0 ± 0.1 b	5.9 ± 0.2 ab
	% Galoilación	7.4 ± 0.0 bc	6.9 ± 0.7 b	8.5 ± 0.4 c	7.3 ± 0.3 bc	7.8 ± 0.4 bc	6.7 ± 0.5 b	5.5 ± 0.6 a
	%C _t	11.7 ± 0.8 b	12.2 ± 1.1 b	10.8 ± 0.3 ab	11.5 ± 0.2 b	11.1 ± 0.3 ab	9.7 ± 0.1 a	10.9 ± 0.1 ab
	%E _t	3.7 ± 0.7 abc	4.3 ± 0.3 cd	3.2 ± 0.1 a	3.7 ± 0.1 abc	4.1 ± 0.0 bcd	4.6 ± 0.2 d	3.5 ± 0.1 ab
	%EG _t	2.1 ± 0.0 a	2.6 ± 0.6 abc	3.6 ± 0.7 c	3.0 ± 0.2 abc	3.3 ± 0.3 bc	2.4 ± 0.1 ab	2.6 ± 0.1 abc
	%C _e	3.4 ± 0.2 a	3.2 ± 0.0 a	2.5 ± 0.8 a	2.8 ± 0.0 a	3.1 ± 1.4 a	3.8 ± 0.1 a	2.9 ± 0.1 a
	%E _e	56.3 ± 2.1 a	57.0 ± 1.7 a	57.3 ± 0.9 a	57.5 ± 0.2 a	56.6 ± 2.3 a	58.7 ± 1.2 a	54.8 ± 1.2 a
	%EG _e	5.2 ± 0.0 d	4.3 ± 0.2 b	4.9 ± 0.2 cd	4.3 ± 0.0 b	4.5 ± 0.1 bc	4.4 ± 0.4 b	2.9 ± 0.0 a
%EGC _e	17.6 ± 0.4 a	16.5 ± 0.1 a	17.7 ± 0.0 a	17.1 ± 0.6 a	17.4 ± 1.1 a	16.5 ± 1.6 a	22.4 ± 1.9 b	

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotriazol; gmP: grado medio de polimerización; C_t: (+)-catequina terminal; E_t: (-)-epicatequina terminal; EG_t: (-)-epicatequina-galato terminal; C_e: (+)-catequina de extensión; E_e: (-)-epicatequina de extensión; EG_e: (-)-epicatequina-galato de extensión; EGC_e: (-)-epigallocatequina de extensión. Los datos representan las medias ± desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0.05$).

5.4.7.3 Distribución de las masas moleculares de las proantocianidinas de las pieles, semillas y vinos.

Además del análisis de proantocianidinas por el método de la floroglucinólisis, se estudió la distribución de las masas moleculares de las proantocianidinas por cromatografía de exclusión por tamaño; ya que esta técnica nos proporciona información sobre la distribución de las masas moleculares de los taninos (Kennedy & Taylor, 2003).

Así, en los perfiles de proantocianidinas de la piel se observaron claras diferencias entre las dos campañas (Figuras 5.20 A y B). Ya que en 2016 los perfiles se mostraron mejor definidos, por lo que resultó más fácil distinguir entre las proantocianidinas poliméricas (eluídas entre 10,3 y 12,3 min), oligoméricas (eluídas entre 12,3 y 13,4 min) y monoméricas (eluídas entre 13,4 y 16,4 min). Además, en 2016 las áreas totales de las proantocianidinas obtenidas fueron mayores que en 2017, lo que coincidió en gran medida con los resultados obtenidos por floroglucinólisis. Además, durante las dos campañas observamos que la fracción más alta obtenida fue la de proantocianidinas monoméricas.

En referencia a los resultados obtenidos en 2016 (Figura 5.20 A), pudo observarse diferencias entre los perfiles de uvas tratadas en envero y mitad-de-maduración, siendo estas últimas las que presentaron las áreas más grandes. En el caso de las uvas tratadas en envero, todas presentaron áreas mayores que el control, excepto las tratadas con MeJ. En cambio, todas las áreas de las uvas tratadas en mitad-de-maduración presentaron áreas superiores al control.

Cuando analizamos la distribución de las masas moleculares de las proantocianidinas de pieles en 2017 (Figura 5.20 B), nuevamente observamos que las uvas tratadas en mitad-de-maduración presentaron mayores áreas que las tratadas en el envero, en especial en los compuestos de menor masa molecular (eluídos al final). Todas las áreas de las uvas tratadas en envero, fueron superiores que las mostradas por las uvas control, salvo en los compuestos de menor masa molecular de las uvas tratadas con MeJ. En el caso de las uvas tratadas en mitad-de-maduración, todas ellas fueron superiores a las uvas control. Sin embargo, no todos los resultados se correspondieron completamente

con las concentraciones de proantocianidinas totales obtenidas por floroglucinólisis. Con respecto a esto, se ha descrito que el método de análisis por floroglucinólisis solo proporciona información relacionada con los taninos que se pueden despolimerizar (Herderich & Smith, 2005), subrayando que esta técnica es limitada para la caracterización de los taninos resistentes a la despolimerización ácida, pudiéndose solo caracterizar una pequeña porción de taninos presentes en las muestras (Jiménez-Martínez, 2018).

En el caso de los perfiles de proantocianidinas de las semillas estudiadas en las dos campañas (Figuras 5.20 C y D), se observaron grandes diferencias con los perfiles obtenidos en las pieles de uva; ya que en los perfiles de semillas predominaron las proantocianidinas de mayor masa molecular (las que eluyen primero), mientras que las de menor masa molecular (oligoméricas) estuvieron presentes en mucho menor proporción. Así mismo, se observaron diferencias interanuales, sobre todo en las áreas de los perfiles de las uvas tratadas en 2016, ya que dichas áreas fueron superiores que los de las uvas tratadas en 2017.

En referencia a los perfiles de proantocianidinas generados por las semillas en 2016 (Figura 5.20 C), también observamos que los perfiles de las uvas tratadas en mitad-de-maduración, fueron superiores a los perfiles de las uvas tratadas en el envero. En el caso del envero, se encontró que los perfiles de semillas de uvas tratadas con BTH y MeJ+BTH mostraron superficies totales mayores que las semillas de uvas control, mientras que MeJ se situó una vez más por debajo del perfil de las uvas control. En cuanto a las uvas tratadas en mitad-de-maduración, observamos que prácticamente todos los perfiles de semillas de uvas tratadas con elicitores, registraron áreas superiores a los de las uvas control.

Así mismo, cuando se analizaron los resultados obtenidos en 2017 (Figura 5.20 D), se observó que los perfiles de proantocianidinas de semillas siguieron la misma tendencia que en el año 2016. Es decir, se pudo diferenciar los perfiles de las uvas tratadas en el envero y mitad-de-maduración, presentando estos últimos las áreas más grandes; y en el caso de los tratamientos realizados en el envero, nuevamente observamos que las uvas tratadas con MeJ presentaron áreas menores a las uvas control. Sin embargo,

nuevamente estos efectos no se correspondieron plenamente con los resultados obtenidos por floroglucinólisis.

Finalmente, en los perfiles de proantocianidinas de los vinos elaborados durante las dos campañas (Figuras 5.20 E y F), se apreciaron grandes diferencias interanuales, ya que en 2016 las áreas de los perfiles de proantocianidinas fueron mayores y mejor definidas que los perfiles de 2017, por lo que se pudo diferenciar claramente el área de las proantocianidinas poliméricas, oligoméricas y monoméricas, lo cual no ocurrió con los perfiles de los vinos elaborados en 2017. Además, los perfiles observados en los vinos, recuerdan más a los perfiles de las pieles de uvas, en los que la fracción más alta se obtuvo para las proantocianidinas monoméricas (eluidas al final). Lo que parece evidenciar que la aportación de taninos desde las pieles a los vinos fue significativamente mayor.

En cuanto a los resultados obtenidos en la campaña 2016 (Figura 5.20 E), se observó que los perfiles de todos los vinos de uvas tratadas con MeJ, BTH y MeJ+BTH (aplicados en enero o mitad-de-maduración), mostraron mayores áreas de proantocianidinas que los vinos de las uvas control. En el caso de las proantocianidinas poliméricas (las primeras en eluir), se vieron incrementadas sobre todo por los tratamientos realizados en mitad-de-maduración. Sin embargo, las proantocianidinas oligoméricas y monoméricas fueron mayores en los vinos de uvas tratadas durante el enero.

Sin embargo, cuando se analizó los perfiles de proantocianidinas de los vinos elaborados en 2017 (Figura 5.20 F), también se notó que los perfiles de los vinos elaborados a partir de uvas tratadas con elicitores, mostraron mayores áreas que los perfiles de vinos de uvas control, pero estas diferencias no fueron tan evidentes como las observadas en 2016. No obstante, nuevamente los perfiles de los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración, destacan sobre los vinos de uvas control y enero.

Otro aspecto a tener en cuenta es que, en los análisis de las pieles y semillas, los perfiles de las uvas tratadas con MeJ aparecieron siempre por debajo de los perfiles de las uvas control. Sin embargo, en los análisis de los vinos elaborados en 2016, su perfil apareció muy por encima del control, y en 2017 se observó algo parecido, excepto en las proantocianidinas de menor masa molecular.

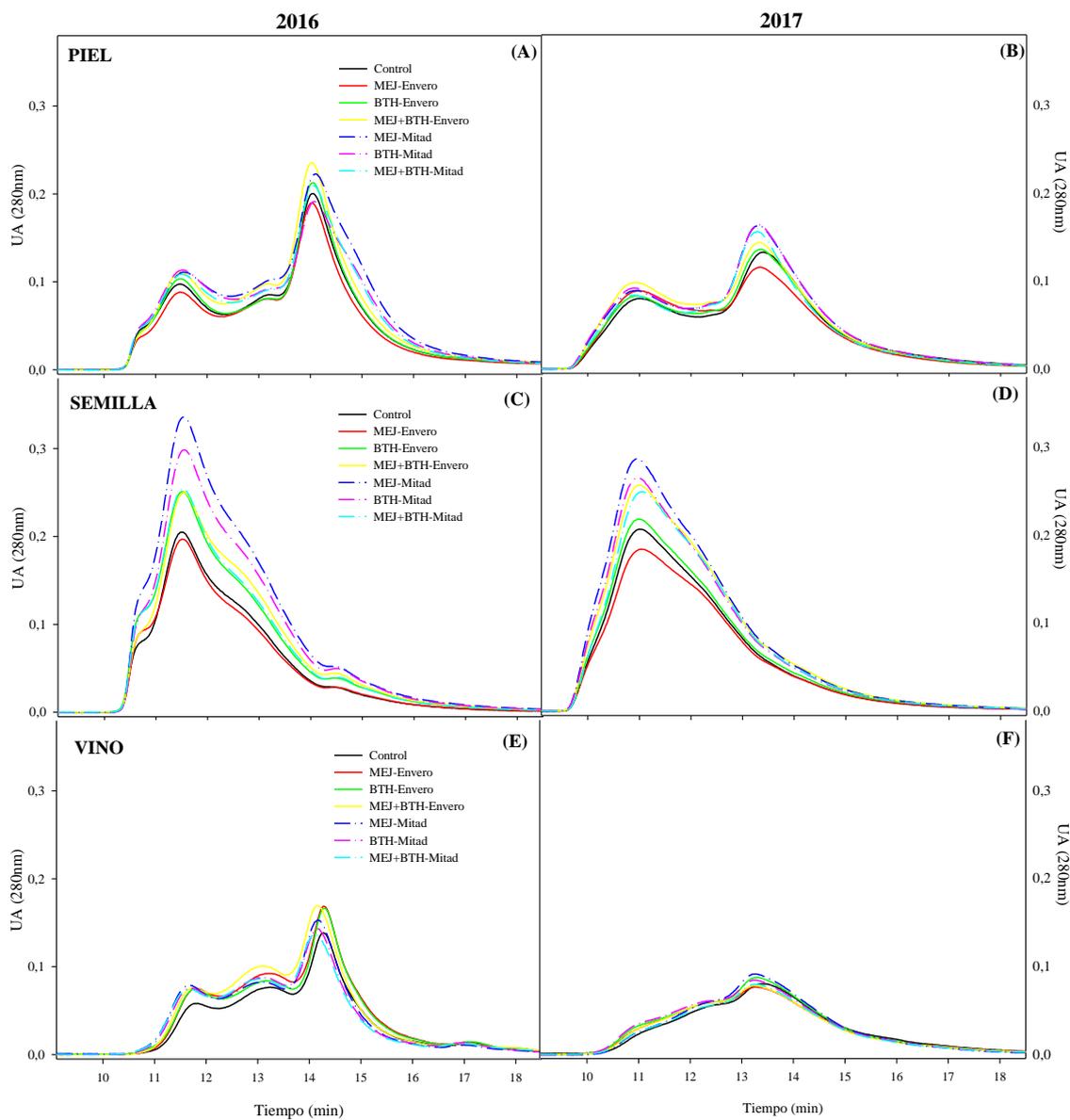


Figura 5.20 Distribución de las masas moleculares de las proantocianidinas presentes en las pieles, semillas y vinos Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).

5.4.8 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.

Para el ACP de uvas se utilizaron los siguientes datos: los antocianos individuales 3-*o*-glucósidos de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina, las formas glicosiladas de los flavonoles de miricetina, quercetina, kampferol, siringetina e isoramnetina y los flavanoles monoméricos de (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-galato y (-)-epigallocatequina analizados en las uvas.

Se obtuvieron 7 componentes principales de los cuales el primero explicó el 49% de la varianza, y el segundo el 13%; sumando entre los dos primeros el 62% (Figura 5.21). Por lo que la separación entre los resultados con respecto al componente 1, fue mucho más significativa que la separación en la componente 2. Las proyecciones generadas mostraron una clara diferencia entre la campaña 2016 y la 2017, situando prácticamente a la campaña 2016 en la parte positiva del componente 1, y a la campaña 2017 en la parte negativa del mismo componente, confirmando nuevamente la gran influencia de las condiciones ambientales sobre los compuestos fenólicos de las uvas.

En 2016 se apreció una marcada separación entre las uvas control y las uvas tratadas con elicitores, indicando la gran influencia que tuvieron los tratamientos en los compuestos fenólicos de las uvas. Sin embargo, el solapamiento observado entre los dos momentos de aplicación (envero y mitad-de-maduración), indicó que los efectos provocados por los tratamientos fueron parecidos en los dos casos. No obstante, los tratamientos más influyentes, es decir, los más alejados del control fueron los realizados en mitad-de-maduración, donde destacó sobre todo el tratamiento MeJ+BTH.

En 2017, se observó una tendencia semejante sobre el efecto de los tratamientos en los compuestos fenólicos de las uvas, aunque esta vez los tratamientos aplicados en el envero se proyectaron a menor distancia de las uvas control, sobre todo los tratamientos con BTH. En cambio, la separación entre el control y las uvas tratadas en mitad-de-maduración fue más evidente, tanto en el componente 1 como en el componente 2, lo que indicó que estos fueron los tratamientos que más influyeron en la biosíntesis de los compuestos fenólicos de las uvas, destacando sobre todo MeJ y MeJ+BTH.

El ACP puso de manifiesto que el efecto de la aplicación de los tratamientos sobre los compuestos fenólicos de las uvas, fue más acusado cuando los tratamientos fueron aplicados en mitad-de-maduración que los aplicados en el envero, ya que las proyecciones de los resultados generados durante las dos campañas, se distribuyeron mucho más alejados de los respectivos controles.

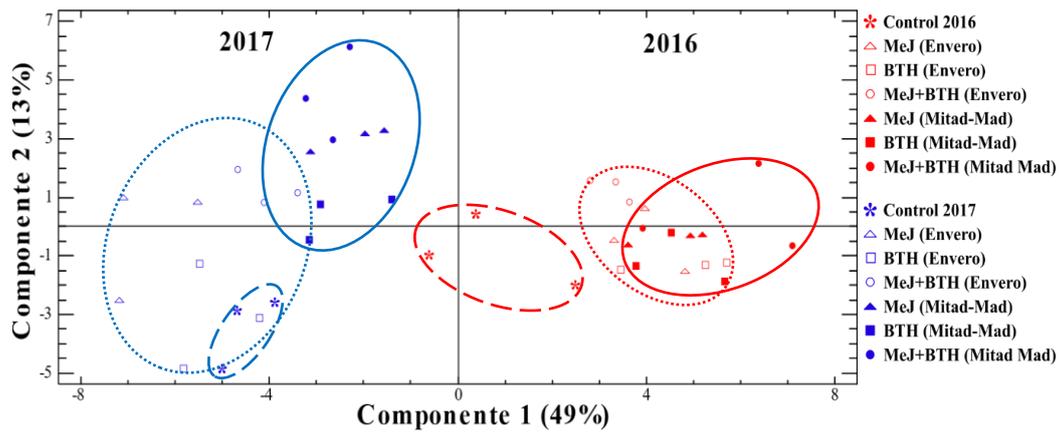


Figura 5.21 Gráfico de dispersión de componentes principales de uvas Monastrell durante las campañas 2016 y 2017.

Así mismo, se analizó la aportación de cada variable en la proyección de los componentes principales (Figura 5.22). Tal como se mencionó anteriormente, la parte positiva del componente 1 se corresponde con la campaña 2016, y la parte negativa con la campaña 2017.

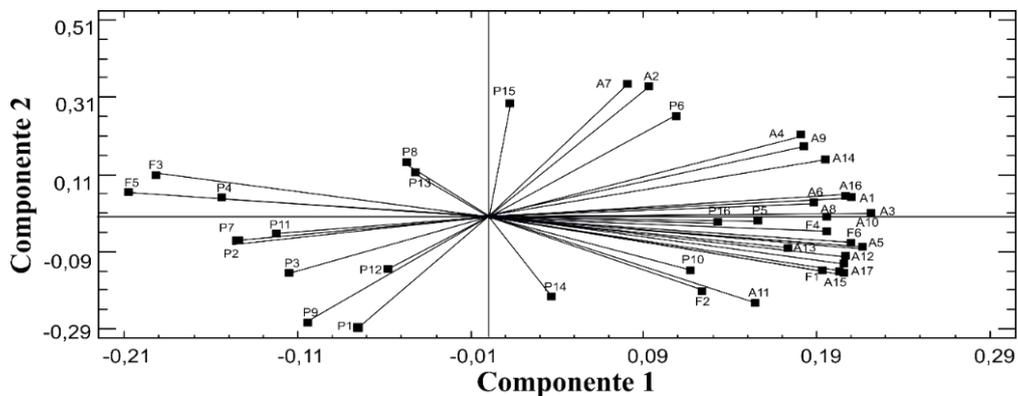


Figura 5.22 Contribución de las variables en el sistema de coordenadas definido por los dos primeros componentes principales. A: antocianos; F: flavonoles y P: proantocianidinas.

Así encontramos que prácticamente todos los antocianos (A) tuvieron una gran aportación en las proyecciones generadas en la campaña 2016, mientras que en 2017 las variables que más contribuyeron a dicha separación fueron las proantocianidinas (P) y algunos de los flavonoles (F).

Por último, el ACP de los compuestos fenólicos de los vinos elaborados durante las dos campañas se presenta en la Figura 5.23. Para este análisis se usaron los datos de los antocianos, flavonoles y proantocianidinas de los vinos elaborados, tal como hicimos en el caso de las uvas.

El ACP generó 6 componentes principales de entre los cuales, los dos primeros explicaron el 68 % de la variabilidad de los resultados, con una aportación del 55 % por parte del componente 1 y del 13 % del componente 2. Por lo que hay que destacar nuevamente, que la separación de las proyecciones en el componente 1 fue mucho más influyente.

En los resultados obtenidos observamos nuevamente una clara separación entre las dos campañas de estudio, ubicando totalmente las proyecciones de 2016 en la parte positiva del componente 1, y las de 2017 en la parte negativa. No obstante, pudo apreciarse que la separación entre los respectivos controles y los momentos de aplicación había disminuido. Al parecer, el proceso de vinificación mermó las diferencias observadas en las uvas.

En los resultados de 2016 no se pudo distinguir una clara separación entre los vinos de uvas control y los procedentes de uvas tratadas con elicitores; solamente los vinos de uvas tratadas con MeJ+BTH en mitad-de-maduración se mostraron algo más alejados de los vinos control.

En cuanto a los resultados de 2017, las proyecciones entre los controles y los distintos tratamientos se mostraron aún más cercanas que en 2016. Sin embargo, se pudo apreciar que los vinos de uvas tratadas con MeJ y BTH en mitad-de-maduración, se ubicaron ligeramente más separados de los vinos de uvas control.

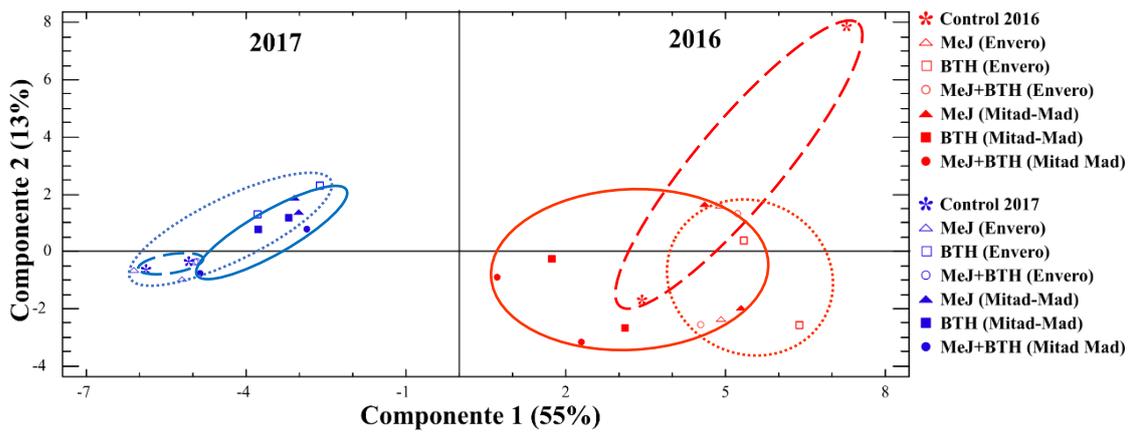


Figura 5.23 Gráfico de dispersión de componentes principales en vinos de uvas Monastrell durante las campañas 2016 y 2017.

Así mismo, se analizó la aportación de cada variable en la proyección de los componentes principales de los vinos (Figura 5.24), donde encontramos de nuevo que todos los antocianos (A) tuvieron una gran aportación en las proyecciones generadas en la campaña 2016 (parte positiva de la componente 1), mientras que en 2017 los compuestos que más influyeron fueron las proantocianidinas (P).

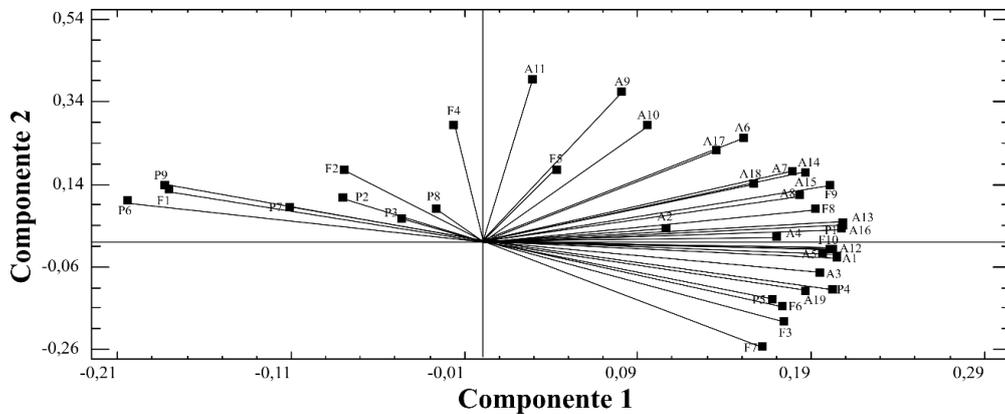


Figura 5.24 Contribución de las variables en el sistema de coordenadas definido por los dos primeros componentes principales. A: antocianos; F: flavonoles y P: proantocianidinas

**CAPÍTULO 6. EFECTO DEL MOMENTO
DE APLICACIÓN DE ELICITORES, SOBRE
LA CONCENTRACIÓN DE POLISACARIDOS
Y OLIGOSACÁRIDOS DEL VINO**

6.1 POLISACÁRIDOS EN EL VINO

Los polisacáridos encontrados en los vinos, son carbohidratos complejos liberados mayoritariamente de las bayas de la uva, y de las levaduras durante el proceso de vinificación (Pellerin & Cabanis, 2000). Este conjunto de polisacáridos, junto con los compuestos fenólicos representan las principales fracciones macromoleculares de los vinos (Apolinar-Valiente, 2011).

Debido a que los polisacáridos procedentes de la uva se solubilizan rápidamente, y pueden sufrir degradaciones enzimáticas y equilibrios de precipitación debidos al aumento de etanol en el medio; y que las levaduras usadas en la fermentación alcohólica, además de polisacáridos también liberan glicoproteínas al medio, se puede afirmar que la concentración de polisacáridos va aumentando gradualmente durante el proceso de maceración (Gil-Cortiella, 2013). No obstante, el enriquecimiento del vino en polisacáridos es un proceso mucho más complejo de lo que parece, ya que va a depender de otros factores como el tipo de uva, tipo de levadura, así como de las técnicas de vinificación empleadas (prensado, desfangado, clarificación, etc.) (Riu-Aumatell et al., 2002), por lo que se hace necesario un análisis más detallado.

En términos generales encontramos que aproximadamente un 65% de los polisacáridos presentes en los vinos proceden de la uva (Figura 6.1): un 4% son ramnogalacturonanos de tipo I (RG-I), 20% de ramnogalacturonanos de tipo II (RG-II), y un 40% de polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs). El otro 35% son polisacáridos de origen microbiológico (Vidal, Williams, et al., 2003).

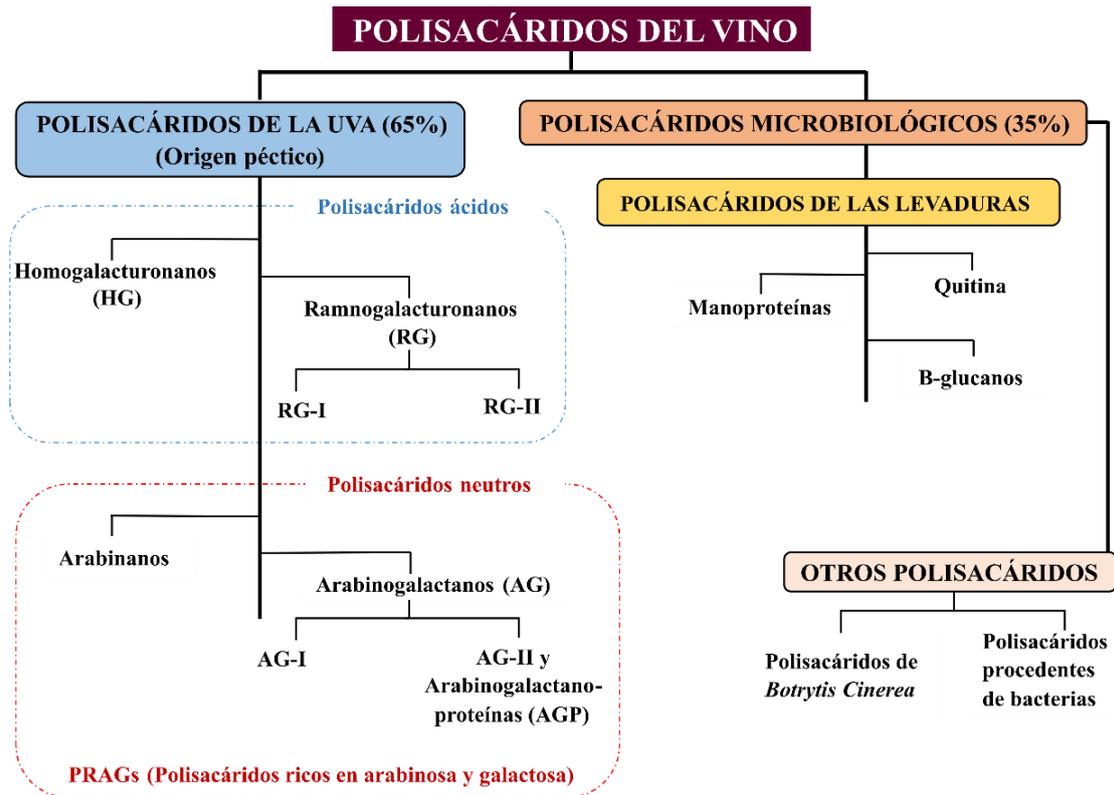


Figura 6.1 Distintas fuentes de polisacáridos presentes en el vino. Adaptado de Del Barrio-Galán (2012).

6.2 POLISACÁRIDOS DE LA UVA

Los polisacáridos de uva liberados a los vinos durante el proceso de vinificación proceden específicamente de sus paredes celulares, estos compuestos mediante la actividad enzimática y los tratamientos mecánicos se fragmentan y se disuelven en el mosto/vino. De los tres tipos de polisacáridos principales que encontramos en la pared celular vegetal, las celulosas y las hemicelulosas son insolubles, y únicamente se solubilizan significativamente fragmentos de los llamados polisacáridos pécticos (Vidal et al., 2001), por lo que son las fracciones de estos últimos las que nos encontraremos en los vinos terminados (Figura 6.1).

El contenido en polisacáridos de un vino está determinado en gran medida por la variedad de uva, el rendimiento de producción del viñedo, las condiciones edafoclimáticas, el nivel de madurez de la uva (Riu-Aumatell et al., 2002), la solubilidad

de los polisacáridos de la uva, y la resistencia de tales polisacáridos a la fragmentación por las glucanasas de las uvas y levaduras (Vidal et al., 2001).

Dentro de los polisacáridos procedentes de la uva, los homogalacturonanos (HG) y los ramnogalacturonanos (RG) pertenecen al grupo de polisacáridos ácidos (Figura 6.1), y los PRAGs se engloban dentro del grupo de polisacáridos neutros (Del Barrio-Galán, 2012). A continuación, analizaremos solo algunos aspectos de su presencia en el vino, ya que las características estructurales y conformación química de los principales polisacáridos procedentes de la uva, se han detallado en el apartado 4.3 (Componentes de la pared celular)

6.2.1 HOMOGALACTURONANOS (HG)

A pesar de que los HG son los polisacáridos pécticos más abundantes en los mostos (Vidal et al., 2000), en el vino se encuentran en cantidades prácticamente inapreciables (Guadalupe et al., 2007). Parte de estos HG se hidrolizan fácilmente por acción de las enzimas pectinolíticas, que en primer lugar rompen los enlaces éster liberando metanol al medio, y posteriormente hidrolizan las propias cadenas de polisacárido, degradándolo de tal modo, que al final de la fermentación alcohólica la cantidad que se encuentra en el vino es prácticamente despreciable (Guadalupe & Ayestarán, 2007; Vidal et al., 2001).

6.2.2 RAMNOGALACTURONANOS: DE TIPO I (RG-I) Y DE TIPO II (RG-II)

Ramnogalacturonanos de tipo I (RG-I): Son los polisacáridos más abundantes en las uvas después de los HG, pero se encuentra en los vinos de forma minoritaria, debido a que son poco solubles y muy sensibles a la acción de las enzimas pectinolíticas (Vidal, Williams, et al., 2003). Sus concentraciones en los vinos tintos son inferiores a 20 mg/L (Doco & Brillouet, 1993), representando tan solo entre un 2% y un 4% de los polisacáridos totales del vino (Vidal et al., 2001).

Ramnogalacturonanos de tipo II (RG-II): La gran cantidad de RG-II en las paredes de la baya de uva, y su compleja estructura y composición que lo hacen resistente a las

degradaciones enzimáticas, le convierten en uno de los polisacáridos más abundantes en el vino (Pellerin et al., 1996). Después de su solubilización, el contenido de RG-II se mantiene más o menos constante en el vino, en donde puede llegar a representar entre el 15% y el 20% de los polisacáridos totales del vino tinto (Doco et al., 1996; Guadalupe & Ayestarán, 2007; Hanlin et al., 2010). Este tipo de polisacárido lo podemos encontrar en forma monomérica y dimerica, siendo esta última forma la que favorece la agregación de proantocianidinas cuando se encuentran a concentraciones similares a las del vino. Se ha postulado que la capacidad que tienen los dímeros de RG-II para intervenir en la agregación de proantocianidinas, se debe a que presentan dos zonas hidrofóbicas que se unirían a los agregados de proantocianidinas, dando lugar a un rápido incremento del tamaño de partícula, lo que podría provocar una disminución de la astringencia (Riou et al., 2002).

6.2.3 POLISACÁRIDOS RICOS EN ARABINOSA Y GALACTOSA (PRAGS)

Su concentración en vinos blancos se encuentra entre 50 y 150 mg/L, mientras que en tintos es algo superior, entre 100 y 200 mg/L (Vidal, Williams, et al., 2003). Sin embargo, su contenido depende mucho de las técnicas enológicas empleadas, llegándose a obtener concentraciones cercanas a los 500 mg/L en vinos en los que se han empleado tratamientos enzimáticos (Ayestarán et al., 2004). Los PRAGs engloban a su vez a los arabinanos y arabinogalactanos (AG).

Arabinanos: Estos derivados pécticos son poco abundantes en los mostos y en los vinos, aunque parecen tener importancia en la aparición de turbidez en los mismos, ya que son bastante insolubles y son poco hidrolizados por las enzimas correspondientes. Este hecho parece ser debido a la pérdida de los residuos de arabinosa terminales por acción de las enzimas arabinofuranosidasas (Pellerin & Cabanis, 2000).

Arabinogalactanos (AG): Son el grupo de polisacáridos más abundante en mostos y en vinos, bajo la forma de galactosa y arabinosa principalmente (Hidalgo, 2018). Estos compuestos son cedidos al vino a partir de las paredes celulares primarias de las células de las uvas, durante las primeras etapas del proceso de vinificación (Doco et al., 1999;

Guadalupe & Ayestarán, 2007). Dentro de este grupo encontramos a los AG-I, AG-II y arabinogalactano-proteínas (AGP).

Arabinogalactanos tipo I (AG-I): Son abundantes en frutos como la manzana, encontrándose en menores cantidades en la uva, pero debido a su baja solubilización, no se encuentran en mostos y en vinos (Hidalgo, 2018).

Arabinogalactanos de tipo II (AG-II) y los arabinogalactano-proteína (AGPs): Los AG-II pueden unirse a una proteína, formando los AGPs, los cuales son fácilmente extraíbles desde las uvas hacia el vino, en cambio los AG-II son cedidos con mayor dificultad desde las pectinas, por lo que son necesarios elevados tiempos de maceración para que sean liberados en cantidades significativas. Esto hace que su concentración sea habitualmente mayor en vinos tintos que en blancos (Pellerin & Cabanis, 2000). Los AGPs tienden a inhibir la agregación de los taninos, por lo que se cree que pueden influir en la percepción de astringencia de los vinos (Riou et al., 2002).

Por lo tanto, más de la mitad de los polisacáridos del vino tienen su origen en la uva, y se solubilizan en el vino durante la maceración fermentativa, siendo los AGPs y los RG-II los compuestos de origen vegetal más abundantes en el vino tinto acabado (Gil-Cortiella, 2013).

6.2.3.1 Polisacáridos de origen microbiológico

Los polisacáridos de origen microbiológico presentes en el vino, pueden proceder de hongos, levaduras y bacterias (Figura 6.1). A pesar de que el aporte de polisacáridos por parte de hongos (uvas en mal estado sanitario) y bacterias (lácticas y/o acéticas) puede ser importante en algunos casos (Gil-Cortiella, 2013), nos centraremos en las levaduras usadas en la fermentación alcohólica, ya que representan la segunda fuente de polisacáridos más importante en el vino, donde las manoproteínas (MPs) son los polisacáridos principales (Vidal, et al., 2003).

6.2.3.2 Manoproteínas (MPs)

Estos polisacáridos se encuentran localizados en la capa exterior de las paredes celulares de las levaduras, cuya composición dependerá de la cepa utilizada, pero en general está formada por dos capas bien diferenciadas: una pared externa de carácter elástico compuesta de MPs y β -(1 \rightarrow 6)-glucanos y una pared interna de carácter rígido formada por una red tridimensional de quitina y β -(1 \rightarrow 3)-glucanos (Aguilar-Uscanga & François, 2003; Klis et al., 2006). Por tanto, esta composición hace que químicamente se denominen proteoglicanos ya que contienen entre un 5-20% de porción peptídica y un 80-95% de cadenas de manosa (Klis et al., 2002).

Las MPs de las levaduras se pueden liberar al vino durante el inicio de la fermentación alcohólica, aunque no es hasta la fase de crecimiento exponencial de las levaduras, cuando se observa un incremento notable en su concentración en el mosto en fermentación (Pellerin & Cabanis, 2000). A partir de ese momento, el enriquecimiento del mosto/vino en MPs es continuo, aunque mucho más lento, y se prolonga hasta el momento del descube, cuando se separan la mayor parte de las lías del vino acabado (Guadalupe & Ayestarán, 2007). La concentración de polisacáridos en el vino procedentes de las levaduras, dependerá de la cepa o cepas de levadura que lleven a cabo la fermentación alcohólica, de la temperatura de fermentación, de los carbohidratos disponibles, de la aireación, agitación y del grado de clarificación del mosto (Guilloux-Benatier et al., 1995), y sobre todo del tiempo de contacto de las lías con el vino una vez finalizada la fermentación alcohólica (Caridi, 2006).

Son numerosos los estudios que han comprobado sus efectos positivos en los vinos elaborados; así, se ha visto que estimulan la fermentación maloláctica (Guilloux-Benatier & Chassagne, 2003), contribuyen a la estabilización química del vino, previniendo la cristalización de las sales de tartrato (Brown et al., 2007); además, han sido relacionados con la retención de compuestos aromáticos (Chalier et al., 2007), la estabilización del color (Escot et al., 2001), la disminución de la astringencia (Williams, et al., 2003) y el incremento del cuerpo y redondez de los vinos tintos (Quijada, 2014), entre otros.

6.3 IMPORTANCIA DE LOS POLISACÁRIDOS EN EL VINO.

Hoy en día, el conocimiento más profundo de las interacciones que tienen los polisacáridos con los diferentes componentes presentes en el vino, juega un papel determinante desde el punto de vista enológico, ya que han permitido clasificar su función en el vino. Gil-Cortiella (2013) describió 3 aspectos fundamentales de clasificación: importancia tecnológica, sensorial y de seguridad alimentaria.

Importancia tecnológica: Como es el caso de la filtración y la clarificación de los vinos, ya que los polisacáridos de tipo globular colmatan drásticamente las membranas de filtración dificultando seriamente este proceso (Vernhet et al., 1999). No obstante, pueden aportar otros beneficios al vino como por ejemplo, actuando como coloides protectores que mejoran la estabilidad tartárica (Gonçalves et al., 2001) y proteica (Waters et al., 1994), o inhibiendo la agregación de taninos, disminuyendo significativamente las dimensiones de partícula e impidiendo su pérdida por precipitación (Poncet-Legrand et al., 2007; Riou et al., 2002).

Importancia sensorial: A diferencia de lo que sucede con los polifenoles, los polisacáridos no poseen ningún atributo sensorial inmediato, aunque durante las últimas décadas se les ha atribuido una infinidad de efectos relacionados con las propiedades del vino (Gil-Cortiella, 2013). Al parecer, la misma capacidad que les permite a los polisacáridos disminuir la agregación de los taninos, con la consiguiente estabilización del color polimérico del vino (Poncet-Legrand et al., 2007), también les permite modular la astringencia mediante la formación de complejos ternarios proteína-polifenol-polisacárido que se mantienen solubles y pueden contribuir a la disminución de la astringencia (De Freitas et al., 2003; Soares et al., 2009). Así mismo, se han realizado estudios en los que se muestra la habilidad de arabinogalactano proteínas, RG-II y MPs, para modificar la volatilidad de ciertos aromas, aumentando su retención en el vino y, por extensión, su persistencia (Chalier et al., 2007; Dufour & Bayonove, 1999).

Importancia en la seguridad alimentaria y la salubridad del vino: En este aspecto, los polisacáridos parecen mostrar actividad antioxidante (Aguirre et al., 2009), y otras ventajas para la salud como la habilidad de los dímeros de RG-II para acomplejar metales

pesados como el plomo (Pellerin & O'Neill, 1998; Tahiri et al., 2000), o la habilidad de las MPs para adsorber cantidades significativas de ocratoxina A (Caridi, 2006).

6.4 LOS OLIGOSACÁRIDOS EN EL VINO

Los oligosacáridos en el vino se identificaron durante mucho tiempo como sacarosa y diversos diholósidos (Doco et al., 1997), y también se encontraron como ácido galacturónico de cadena corta (2-6 DP). Estos compuestos se originan como consecuencia de la degradación de la región lisa de la pectina (Pellerin & Cabanis, 2000), y tienen un papel significativo en la respuesta de defensa de las plantas (Darvill & Albersheim, 1984), ya que pueden actuar como moléculas de señalización durante la diferenciación celular y el reconocimiento de patógenos y organismos simbioses (Cosgrove, 2006).

La fracción de oligosacáridos en vino tinto fue aislada y caracterizada por primera vez por Ducasse et al. (2010), donde se encontraron concentraciones de 250 y 330 mg/L en vinos de las variedades Merlot y Carignan, respectivamente. Así mismo, se han descrito concentraciones que oscilan entre 102 y 127 mg/L para vinos de las variedades Chardonnay y Grignolino, respectivamente, cuya diferencia ha sido correlacionada con los diferentes estados de maduración entre los cultivares en el momento de la cosecha, y a las diferentes técnicas de vinificación usadas para vinos blancos y tintos. La mayor cantidad de oligosacáridos detectada en Grignolino, podría estar parcialmente relacionada con el mayor tiempo de contacto entre las pieles y el mosto durante la maceración de vinos tintos, comparado con el sistema de elaboración de vinos blancos (Chardonnay) (Bordiga et al., 2012). Así mismo, otros estudios determinaron también que la concentración de oligosacáridos en los vinos estaba muy influenciada por las técnicas de vinificación empleadas (Ducasse et al., 2011).

Su posible influencia sobre las características organolépticas o en la calidad de los vinos tintos son aún desconocidas; aunque su estructura y las concentraciones encontradas en los vinos sugieren que podrían contribuir sobre estas características, especialmente sobre la percepción de astringencia (Quijada, 2014), ya que pueden unirse a los taninos, disminuyendo su reactividad y promoviendo una mayor estabilidad coloidal.

Es conocido que la integridad de las paredes celulares y su posible debilitamiento modula la extracción de varios componentes, y en particular polisacáridos y oligosacáridos durante la vinificación (Bordiga et al., 2012). Por lo que un mejor conocimiento de sus propiedades, puede ayudar a tomar mejores decisiones en el momento de la elaboración para favorecer su extracción (Apolinar-Valiente, 2011).

6.5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se detallan los resultados obtenidos durante las dos campañas, del análisis de la composición de polisacáridos y oligosacáridos presentes en los vinos, que fueron elaborados a partir de uvas de la variedad Monastrell tratadas en dos etapas distintas de maduración con MeJ, BTH y una mezcla de ambos. Para el caso de los polisacáridos, primero se analizaron los residuos individuales de glicosil de los vinos elaborados, cuyos valores fueron determinados por GC-MS después del aislamiento, hidrólisis, reducción, acetilación y extracción de las muestras. A partir de los residuos individuales de glicosil, se determinó la composición y concentración de las familias de polisacáridos: MPs, RG-II y PRAGs. Los oligosacáridos por su parte, fueron aislados y derivatizados, y las funciones hidroxilos de los azúcares fueron trimetilsililadas, para hacerlas volátiles y analizarlas por GC-MS. Los resultados obtenidos de la composición de polisacáridos y oligosacáridos, concuerdan con algunos estudios descritos previamente, en los que se analizó también vinos procedentes de uvas de la variedad Monastrell (Apolinar-Valiente et al., 2013, 2014, 2015, 2018).

6.5.1 CONCENTRACIÓN DE POLISACÁRIDOS EN EL VINO

6.5.1.1 Concentración de residuos individuales de glicosil

La concentración de residuos individuales de glicosil liberados tras la hidrólisis de los polisacáridos de los vinos, se muestran en la Tabla 6.1. El análisis estadístico indicó que solamente en la campaña 2016 se registraron diferencias significativas, en algunos de los residuos individuales de glicosil de los vinos elaborados con uvas control y los elaborados con uvas tratadas con elicitores.

La predominancia de arabinosa, galactosa y manosa hacen intuir que los PRAGs de las paredes celulares de las uvas, y las MPs de las paredes celulares de las levaduras fueron las macromoléculas mayoritarias en nuestros vinos; ya que toda la arabinosa y galactosa fue atribuida a los PRAGs, que incluyen arabinanos y AG (Apolinar-Valiente et al., 2013); y en cambio la manosa fue atribuida a las MPs (Waters et al., 1994).

De entre los 3 residuos de glicosil mencionados, solo se detectaron diferencias significativas en la arabinosa, la cual se encontró en menores concentraciones en los vinos de uvas tratadas durante el envero con MeJ y BTH. Lo mismo sucedió con las uvas tratadas con MeJ en mitad-de-maduración, las cuales también produjeron vinos con menor concentración de arabinosa que los vinos de uvas sin tratar. Un estudio reciente, también mostró que vinos elaborados a partir de uvas Monastrell tratadas con MeJ, o quitosano de origen fúngico y marino, presentaban una concentración de arabinosa significativamente menor que los vinos elaborados a partir de uvas control (Apolinar-Valiente et al., 2018).

Así mismo, se identificaron varios *azúcares raros* como la apiosa, la 2-O-metil-fucosa y la 2-O-metil-xilosa, conocidos por ser los marcadores de la presencia de RG-II (Pellerin et al., 1996; Pérez et al., 2003; Vidal et al., 2003). De los 3 azúcares raros mencionados, encontramos que la concentración de apiosa fue similar en todos los vinos analizados, y en cambio, la concentración de 2-O-metil-fucosa y 2-O-metil-xilosa fue menor en todos los vinos elaborados con uvas tratadas con elicitores. Además, esta disminución se presentó en igual proporción, tanto en los vinos de uvas tratadas en envero como en mitad-de-maduración. Hay que mencionar además que los vinos de uvas tratadas con MeJ (indistintamente del momento de aplicación), registraron las menores concentraciones de 2-O-metil-fucosa y la 2-O-metil-xilosa.

Se detectó también la presencia de ramnosa y fucosa, las cuales pueden proceder de los polisacáridos pécticos RG-I o RG-II en el caso de la ramnosa (Martínez-Lapuente et al., 2018); o solo de los RG-II en el caso de la fucosa (Pellerin et al., 1996). Al igual que ocurrió con la 2-O-metil-fucosa y la 2-O-metil-xilosa, la ramnosa y fucosa también se encontraron en menor concentración en todos los vinos procedentes de uvas tratadas con elicitores; y esta reducción también se reflejó en igual proporción, ya sea en los vinos de uvas tratadas en envero como en mitad-de-maduración, en las cuales MeJ fue el tratamiento que más contribuyó en la reducción de ramnosa y fucosa.

Tabla 6.1 Concentración en mg/L de residuos individuales de glicosil de polisacáridos de vinos procedentes de uvas Monastrell, durante dos campañas (2016 y 2017).

Año	Residuos individuales de glicosil	Envero			Mitad de maduración			
		Control	MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH
2016	2-O-metil-fucosa	4.8 ± 0.1 c	1.9 ± 0.6 a	2.7 ± 0.9 ab	2.6 ± 0.6 ab	1.9 ± 0.2 a	3.3 ± 0.1 b	2.6 ± 0.4 ab
	Ramnosa	55.5 ± 4.8 c	24.7 ± 5.7 a	32.8 ± 7.5 ab	31.4 ± 6.2 ab	26.9 ± 0.9 ab	39.8 ± 1.9 b	30.3 ± 5.4 ab
	Fucosa	2.5 ± 0.3 b	1.4 ± 0.1 a	1.6 ± 0.1 a	1.7 ± 0.2 a	1.4 ± 0.1 a	1.8 ± 0.4 a	1.8 ± 0.1 a
	2-O-metil-xilosa	2.4 ± 0.2 b	1.3 ± 0.2 a	1.4 ± 0.5 a	1.4 ± 0.2 a	1.2 ± 0.2 a	1.8 ± 0.1 ab	1.6 ± 0.5 a
	Arabinosa	161.6 ± 26.2 b	117.7 ± 7.2 a	125.4 ± 8.1 a	129.2 ± 10.8 ab	111.9 ± 4.1 a	139.7 ± 3.8 ab	134.3 ± 19.5 ab
	Apiosa	1.1 ± 0.4 a	1 ± 0.2 a	1.1 ± 0.02 a	0.7 ± 0 a	1 ± 0.1 a	0.9 ± 0.3 a	1.2 ± 0.3 a
	Xilosa	3.4 ± 0.1 b	2.1 ± 0.1 a	2.4 ± 0.5 ab	2.4 ± 0.1 ab	2.3 ± 0.4 ab	2.9 ± 0.5 ab	3 ± 1 ab
	Manosa	93.5 ± 11.4 a	89.6 ± 9.8 a	84.1 ± 4.4 a	86.4 ± 6.2 a	78.5 ± 2.7 a	83.3 ± 0.2 a	84.4 ± 9.4 a
	Galactosa	125.9 ± 18.7 a	125.3 ± 10.5 a	130.2 ± 16.1 a	138.6 ± 0.2 a	123.5 ± 4.5 a	118.6 ± 6.3 a	132.9 ± 11.2 a
	Glucosa	5 ± 0.1 a	6.9 ± 2.5 a	6.2 ± 2 a	5.8 ± 1.1 a	5 ± 0.1 a	4.6 ± 0.6 a	5.3 ± 1 a
2017	2-O-metil-fucosa	4.3 ± 2 a	3.3 ± 0.1 a	2.6 ± 1.4 a	2.5 ± 1.4 a	2.2 ± 0.8 a	3.9 ± 1.2 a	3.5 ± 1.4 a
	Ramnosa	45.4 ± 13.2 a	30.9 ± 2.8 a	29.7 ± 11.2 a	31.7 ± 12.9 a	31.5 ± 14.1 a	45.5 ± 6.9 a	42.8 ± 18.1 a
	Fucosa	2.1 ± 0.7 a	1.5 ± 0 a	1.6 ± 0.5 a	1.7 ± 0.8 a	1.5 ± 0.2 a	2.0 ± 0.2 a	2.3 ± 0.7 a
	2-O-metil-xilosa	2.2 ± 0.7 a	1.3 ± 0.1 a	1.5 ± 1 a	1.4 ± 0.6 a	1.4 ± 0.4 a	2.1 ± 0.5 a	1.9 ± 0.3 a
	Arabinosa	157.2 ± 36.5 a	107.5 ± 4.1 a	132.2 ± 44.4 a	127.4 ± 23.9 a	139.8 ± 44.4 a	170.7 ± 39.1 a	157.6 ± 21.6 a
	Apiosa	1.1 ± 0.2 ab	0.8 ± 0 a	1.1 ± 0.3 ab	0.8 ± 0.1 a	1.0 ± 0.3 a	0.9 ± 0 a	1.7 ± 0.4 b
	Xilosa	3.5 ± 1.3 a	1.9 ± 0.2 a	2.6 ± 1.5 a	2.5 ± 0.6 a	2.5 ± 0.7 a	3.1 ± 0.9 a	2.6 ± 0.3 a
	Manosa	69.8 ± 2.8 a	62.9 ± 7.9 a	64.5 ± 7.6 a	65.6 ± 13.8 a	73.9 ± 6.0 a	68.4 ± 9.3 a	78.9 ± 6.6 a
	Galactosa	116.9 ± 0.4 a	95.9 ± 2.7 a	124.7 ± 13.3 a	117.5 ± 5.2 a	123.6 ± 23.8 a	94.1 ± 20.4 a	100.6 ± 31.5 a
	Glucosa	5.7 ± 0.6 a	9.1 ± 4.5 a	5.5 ± 0 a	5.4 ± 0.4 a	5.3 ± 0.5 a	4.6 ± 1.1 a	4.6 ± 0.5 a

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotiadiazol. Los valores corresponden a la media ± DS. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

Se obtuvo igualmente residuos de xilosa, los cuales indican que trazas de hemicelulosa podrían haberse solubilizado de las paredes celulares de la uva (Doco et al., 1999). En este caso, solo se encontraron variaciones en los vinos de uvas tratadas con MeJ durante el envero, cuyas concentraciones de xilosa fueron menores que los vinos de uvas control. Los análisis también detectaron la presencia de glucosa, que a pesar de no ser un componente de los polisacáridos pécticos, ésta puede originarse de los polisacáridos de las levaduras y/o bacterias (Apolinar-Valiente et al., 2014; Martínez-Lapiente et al., 2013). No obstante, su concentración en los vinos elaborados no se vio afectada por los tratamientos aplicados a las uvas.

6.5.1.2 Composición y concentración de las familias de polisacáridos: MPs, RG-II y PRAGs.

Los polisacáridos encontrados en los vinos corresponden a las tres familias de polisacáridos identificadas: MPs, PRAGs y RG-II (Apolinar-Valiente, 2011), cuya concentración fue estimada a partir de la concentración de residuos individuales de glicosil característicos de cada familia, y para el cálculo se tuvo en cuenta el rendimiento de la hidrólisis, según lo descrito por Doco et al., (1999a).

Los resultados obtenidos durante las dos campañas (Figura 6.2), nos permitieron calcular los porcentajes medios aportados por cada una de las familias. Así encontramos, que las MPs representaron alrededor del 14%, mientras que los PRAGs se situaron en el 45%, frente al 41% de los RG-II. Esto puso de manifiesto, que los polisacáridos originados de Monastrell (PRAGs y RG-II) constituyeron el 86% del total de polisacáridos del vino, un valor muy superior a los valores medios (65%) descritos en la bibliografía (Vidal et al., 2003).

La predominancia de arabinosa, galactosa y manosa comentada anteriormente, donde se intuía que los PRAGs y las MPs serían las mayores macromoléculas en nuestros vinos, sólo se pudo confirmar para el caso de los PRAGs, que se situaron como los polisacáridos predominantes, seguidos por los RG-II y finalmente por las MPs.

6.5.1.2.1 Manoproteínas (MPs)

La concentración media de MPs analizadas durante la campaña 2016 se situó en 107 mg/L, un valor bastante superior a los 87 mg/L encontrados en la campaña 2017 (Figura 6.2 A y B). Tomando en consideración que durante las dos campañas de estudio, los vinos se elaboraron con la misma cepa de levadura (Uvaferm VRB, Lallemand), y que se siguió el mismo protocolo de vinificación (tiempos y temperaturas de ejecución de las distintas etapas); esta menor concentración de MPs encontrada en los vinos de la campaña 2017, pudo deberse a una menor concentración de carbohidratos disponibles para la fermentación alcohólica por parte de las levaduras (Rosi & Giovani, 2003); dado que las uvas vendimiadas en 2017 registraron un valor medio de 22,7 °Brix, en comparación con los 25,7 °Brix registrados en 2016 (Tabla 5.1. Apartado 5.6.1). Esta menor disposición de carbohidratos pudo haber provocado una reducción en la cinética de crecimiento de las levaduras, reduciendo por tanto la concentración de manoproteínas disponibles para ser liberadas al medio. En este sentido, se ha correlacionado el contenido de coloides iniciales en el mosto, con la liberación de las MPs de las levaduras (Rosi & Giovani, 2003). Doco et al. (2007) también encontraron diferencias significativas entre vinos de uvas Carignan y Garnacha, donde la menor concentración de MPs encontradas en vinos de Garnacha, se atribuyó a su menor grado de maduración en el momento de la vendimia.

Así mismo, las menores concentraciones de MPs encontradas en algunos vinos, se han correlacionado con el menor grado alcohólico alcanzado durante el proceso de maceración, argumentando cambios en las condiciones de las levaduras (Apolinar-Valiente et al., 2013), y por ende alterando su cinética de crecimiento (Ribéreau-Gayon et al., 2006). A este respecto, nuestros vinos también alcanzaron una menor graduación alcohólica durante 2017 (12,9 °), en comparación con la alcanzada en 2016 (15,2 °) (Tabla 5.2. Apartado 5.6.2), lo que podría explicar también las menores concentraciones de MPs registradas en 2017.

En cuanto a los resultados de MPs de los vinos elaborados en 2016, se encontró que la aplicación de elicitores en campo, no parece haber influido en el crecimiento de levaduras durante el proceso de fermentación, ya que las concentraciones de MPs registradas en los vinos de uvas sin tratar, no mostraron diferencias significativas con los

vinos de uvas tratadas con elicitores, ya sea en los tratamientos aplicados durante el envero o en mitad-de-maduración. En este sentido, se ha estudiado ampliamente la repercusión que pueden tener los residuos de tratamientos aplicados en la viña, sobre las comunidades de levaduras necesarias para la elaboración del vino (Milanović et al., 2013; Oliva et al., 2010).

Resultados similares se encontraron en los vinos elaborados en 2017, en el que ninguno de los tratamientos aplicados en campo (indistintamente del momento de aplicación), alteró la actividad de las levaduras durante la fermentación, ya que nuevamente encontramos que la concentración de MPs fue similar en todos los vinos elaborados.

Por tanto, se puede considerar que la aplicación de tratamientos con MeJ, BTH y MeJ+BTH sobre uvas de la variedad Monastrell, en principio no deberían afectar la cinética de crecimiento de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Esta característica probablemente pueda explicarse con los resultados de un estudio reciente, en el que se encontró que tras la aplicación de MeJ sobre vides de la variedad Tempranillo, la concentración de aminoácidos fue similar que las uvas control, manteniendo el nitrógeno disponible para las levaduras sin que se viera afectada su cinética de crecimiento; sin embargo, cuando las uvas fueron tratadas con quitosano o extracto de levaduras, la concentración de aminoácidos se vio reducida (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017).

6.5.1.2.2 Polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs)

La cantidad de PRAGs liberados desde las paredes celulares de las uvas hasta el vino durante el proceso de maceración, fue similar durante los dos años de estudio. Los valores medios registrados en las campañas 2016 y 2017 fueron de 327 y 316 mg/L, respectivamente (Figura 6.2 C y D). Estas concentraciones fueron muy parecidas a las encontradas por otros autores, en vinos elaborados con la variedad Monastrell (Apolinar-Valiente et al., 2013, 2018).

Los resultados de los análisis de la concentración de PRAGs de los vinos elaborados en 2016 (Figura 6.2 C), no mostraron diferencias significativas entre los vinos

de uvas sin tratar, y los procedentes de uvas tratadas con elicitores, ya sea aplicados en envero o mitad-de-maduración. La menor concentración de arabinosa encontrada en los vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ y BTH durante el envero, o MeJ en mitad-de-maduración (Tabla 6.1), no parece haber influido en gran medida en la concentración estimada de PRAGs, de modo que las concentraciones de los vinos de uvas control, fueron estadísticamente similares a los vinos de uvas tratadas con los distintos elicitores.

La misma tendencia fue observada en los vinos de la campaña 2017. No obstante, se percibió una alta variabilidad en los resultados de este año, lo que provocó que tampoco se observen diferencias significativas entre los vinos elaborados con uvas sin tratar y los vinos de uvas tratadas. Aunque se pudo observar una ligera disminución en la concentración de PRAGs en los vinos de uvas tratadas con MeJ durante el envero (Figura 6.2 D).

A pesar de que nuestros resultados no hayan mostrado diferencias significativas, se pudieron apreciar ligeras disminuciones en los vinos de uvas tratadas, frente a los vinos de uvas control en ambas campañas. En relación a estos resultados, una reciente investigación con uvas Monastrell a las que se aplicaron distintos elicitores, entre ellos MeJ y BTH, mostró que la concentración de PRAGs de los vinos elaborados, fue significativamente menor que los valores encontrados en vinos de uvas control (Apolinar-Valiente et al., 2018); estos autores atribuyeron la menor concentración de PRAGs de los vinos, a una mayor dificultad de extracción desde la pared celular de la piel durante la vinificación, por un aumento en la rigidez de la piel de la uva en respuesta a la aplicación de elicitores.

6.5.1.2.3 Ramnogalacturonanos tipo II (RG-II)

Los RG-II encontrados en los vinos, es la otra familia de polisacáridos procedentes de las paredes celulares de las uvas. Los valores medios de las concentraciones de RG-II registradas en 2016 y 2017 fueron 281 mg/L y 312 mg/L, respectivamente.

Con respecto a los RG-II analizados en los vinos de la campaña 2016 (Figura 6.2 E), observamos que tanto los vinos procedentes de uvas tratadas en envero como en mitad-de-maduración, mostraron menores concentraciones de este compuesto que los

elaborados con uvas control. En el caso de los vinos de uvas tratadas con MeJ, BTH y MeJ+BTH durante el envero, observamos que esta menor concentración de RG-II, se presentó en igual proporción en todos ellos, si los comparamos con los vinos de uvas control. Por su parte, los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración, también registraron menores concentraciones de RG-II, aunque en este grupo, los vinos que presentaron la menor concentración fueron los procedentes de uvas tratadas con MeJ, seguidos de las uvas tratadas con MeJ+BTH, y finalmente las tratadas con BTH.

Esta disminución generalizada en la concentración de RG-II de los vinos procedentes de uvas tratadas con elicitores, se intuía por las menores concentraciones encontradas en los residuos individuales de glicosil 2-O-metil-fucosa, 2-O-metil-xilosa, ramnosa y fucosa. En el estudio de Apolinar-Valiente et al. (2018) mencionado anteriormente, encontraron que los vinos elaborados con uvas Monastrell tratadas con quitosano de origen marino, fueron los únicos que presentaron una menor concentración de RG-II en comparación con los vinos de uvas control; y al igual que en el caso de los PRAGs, propusieron que el aumento en la rigidez de la piel de la uva, conllevaría también una mayor dificultad en la extracción de RG-II.

A pesar de que en 2017 no se registraron diferencias significativas entre los vinos elaborados con uvas control y los elaborados con uvas tratadas (indistintamente del momento de aplicación) (Figura 6.2 F), se observó una tendencia generalizada de concentraciones más bajas de RG-II en los vinos de uvas tratadas con elicitores. Otro rasgo destacable, fue que tal como sucedió con los PRAGs de los vinos de 2017, los RG-II también mostraron una alta variabilidad en los resultados.

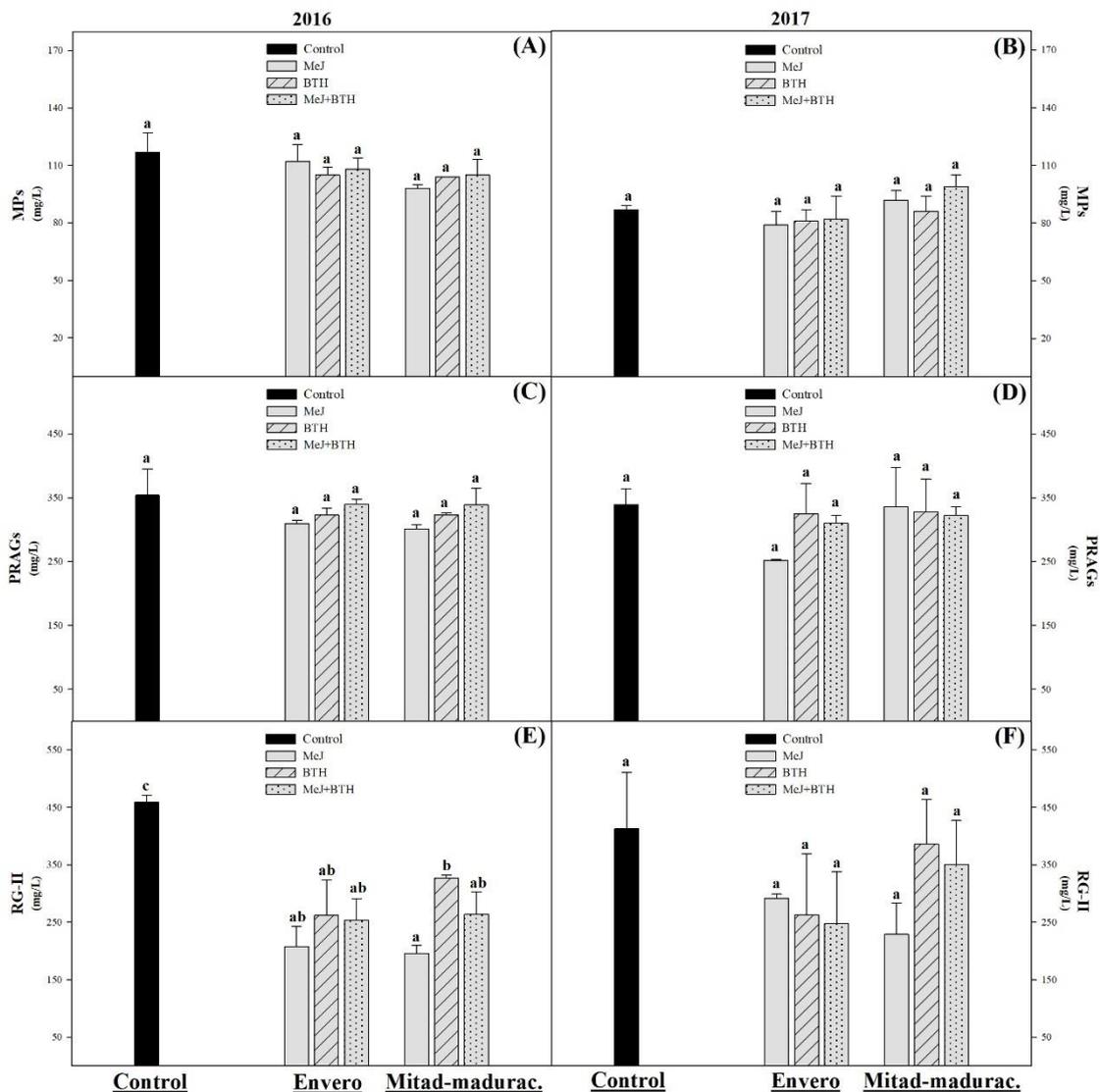


Figura 6.2 Concentración en mg/L de Manoproteínas (MPs) (A y B), Polisacáridos ricos en arabinosa y galactosa (PRAGs) (C y D) y Rannogalacturonanos tipo II (RG-II) (E y F) en vinos procedentes de uvas Monastrell durante las campañas 2016 y 2017. Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

Por tanto, el efecto de la aplicación de elicitores en uvas sobre las familias de polisacáridos presentes en el vino, mostró que las MPs no se vieron afectadas por los tratamientos. Sin embargo, los PRAGs y los RG-II (ambos procedentes de la uva) sí que se vieron afectados por la aplicación de elicitores; y tomando en consideración que juntos representaron el 86% del total de polisacáridos de las muestras, además de su significativa participación en la agregación de proantocianidinas (Riou et al., 2002); se hace necesario realizar un análisis retrospectivo de los resultados obtenidos en la composición de paredes

celulares (Apartados 4.4.2 y 4.4.3); donde encontramos que se produjo una reducción de los derivados pécticos, junto con un incremento generalizado en la concentración de lignina, proteínas y fenoles totales en las uvas tratadas. Esto pudo ser el motivo de la menor concentración de polisacáridos de origen vegetal (PRAGs y RG-II) observados en los vinos de uvas tratadas; ya que, durante la maceración, los hollejos podrían haber presentado una pared celular más reforzada, dificultando la liberación y extracción de esa reducida concentración de derivados pécticos.

6.5.1.3 Polisacáridos totales

La concentración de polisacáridos totales presentes en los vinos (Figura 6.3), se calculó mediante el sumatorio de MPs, RG-II y PRAGs analizados anteriormente (Apartado 6.5.1.2). Seguidamente obtuvimos los valores medios alcanzados en los vinos, y encontramos que en 2016 fueron de 716 mg/L, y 714 mg/L para los vinos de la campaña 2017.

Cuando analizamos la concentración de polisacáridos totales de los vinos de 2016 (Figura 6.3 A), observamos diferencias significativas entre los vinos elaborados con uvas control, y los elaborados con uvas tratadas. Así, encontramos que los vinos de uvas tratadas durante el envero, ya sea con MeJ, BTH y MeJ+BTH, mostraron menos polisacáridos totales que los vinos de uvas control, y esta menor concentración se presentó en igual proporción en todos ellos. Lo mismo sucedió cuando analizamos los vinos de uvas tratadas en mitad-de-maduración, ya que todos ellos también presentaron una menor concentración de polisacáridos totales que los vinos de uvas control. Las diferencias encontradas en los vinos de 2016, se generaron principalmente por la diferencia entre la concentración de RG-II de los vinos de uvas control, y los vinos de uvas tratadas con elicitores, como se describió anteriormente.

En los vinos de la campaña 2017 (Figura 6.3 B), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de polisacáridos totales. Sin embargo, los vinos elaborados con uvas tratadas con elicitores, presentaron concentraciones por debajo de los vinos de uvas sin tratar, pero la alta variabilidad registrada en los resultados no permitió separarlos en grupos estadísticamente diferentes.

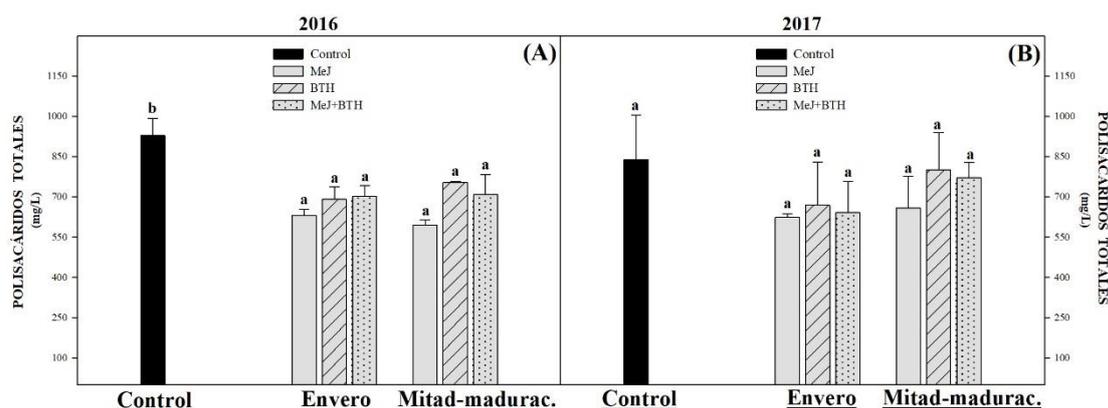


Figura 6.3 Concentración en mg/L de polisacáridos totales en vinos procedentes de uvas Monastrell durante las campañas 2016 y 2017. Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

6.5.2 CONCENTRACIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS EN EL VINO

6.5.2.1 Composición de residuos de glicosil

La fracción de oligosacáridos eluida entre 61 y 96 min en la columna Superdex-30 HR, contenía una mezcla compleja de azúcares pequeños, que fue obtenida para representar la fracción de oligosacáridos de los vinos elaborados durante las dos campañas. Los porcentajes molares de los residuos de glicosil de los oligosacáridos de vinos se muestran en la Tabla 6.2. Las muestras contenían la mayoría de los azúcares conocidos y que forman parte de la composición de carbohidratos del vino. Estos incluyeron azúcares tales como arabinosa, galactosa, ramnosa, fucosa, xilosa y ácidos galacturónico y glucurónico, que provienen de la fracción pecto-celulósica de las paredes celulares de las uvas (Apolinar-Valiente et al., 2014; Ducasse et al., 2010; Pellerin et al., 1995; Vidal et al., 2003), así como manosa y glucosa, liberadas de los polisacáridos de las levaduras y/o bacterias (Apolinar-Valiente et al., 2014; Martínez-Lapuente et al., 2013).

La presencia de residuos de xilosa, ácido glucurónico y ácido 4-O-metil-glucurónico, indicaron que trazas de hemicelulosa se podrían haber solubilizado de las paredes celulares de las bayas, y recuperado como estructuras de oligosacáridos en los vinos (Apolinar-Valiente et al., 2018; Doco et al., 2003; Ducasse et al., 2011).

El residuo de ácido galacturónico fue el constituyente predominante de los oligosacáridos de todos los vinos analizados, representando el 51% del total de oligosacáridos durante las dos campañas, seguido de arabinosa (10,3%), manosa (10,1%), glucosa (9,9%), xilosa (7,7%) y galactosa (5%), el resto de residuos de glicosil se encontraron con valores por debajo del 2%. Los porcentajes medios encontrados de los distintos residuos de glicosil, son acordes con los porcentajes encontrados en investigaciones anteriores, en las que se analizó también los oligosacáridos de vinos Monastrell (Apolinar-Valiente et al., 2014, 2018; Apolinar-Valiente, Romero-Cascales, Williams, et al., 2015).

No obstante, cuando se realizó el análisis estadístico de los residuos de glicosil de los oligosacáridos de los vinos, no se encontraron diferencias significativas entre la concentración de los vinos procedentes de uvas control, y los procedentes de uvas tratadas con elicitores, ya fueran aplicados en la época de enero o en mitad-de-maduración. Este mismo efecto fue observado durante las dos campañas de estudio, lo que coincide con los resultados obtenidos en una reciente investigación, donde se trataron uvas de la variedad Monastrell con los elicitores MeJ, BTH y quitosano de origen fúngico y marino (Apolinar-Valiente et al., 2018). En este estudio solo se encontraron diferencias en los residuos del ácido 4-O-metil-glucurónico de vinos de uvas tratadas con quitosano de origen marino.

Estas moléculas y otros oligosacáridos identificados en el vino, representan las estructuras degradadas de los polisacáridos originados en la pared celular de la baya de uva, debido a la actividad enzimática endógena presente en las uvas, o exógena, añadida durante las diferentes etapas de vinificación (Ducasse et al., 2010); y debido a que la cepa de levadura, así como los protocolos de vinificación fueron los mismos durante las dos campañas, los resultados indican que los tratamientos con elicitores no tuvieron repercusión en la región lisa de la pectina, que es de donde se originan estas moléculas (Pellerin & Cabanis, 2000), dando como resultado un proceso de extracción de oligosacáridos similar en todas las uvas.

Tabla 6.2 Composición de residuos de glicosil de oligosacáridos (%) de vinos procedentes de uvas Monastrell durante dos campañas (2016 y 2017).

Año	Residuos de glicosil	Envero				Mitad de maduración		
		Control	MeJ	BTH	MeJ+BTH	MeJ	BTH	MeJ+BTH
2016	Arabinosa	10.6 ± 1.1 a	10.8 ± 1.9 a	11.5 ± 1.0 a	9.3 ± 0.7 a	10 ± 0 a	10 ± 2 a	11 ± 2 a
	Ramnosa	1.1 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 a	0.8 ± 0.2 a	0.9 ± 0.1 a	1.1 ± 0.6 a	0.9 ± 0.2 a	1.9 ± 1.6 a
	Fucosa	1.2 ± 0.2 a	1.2 ± 0 a	1.2 ± 0 a	1.1 ± 0.1 a	1.1 ± 0 a	1.2 ± 0.2 a	1.5 ± 1 a
	Galactosa	4.9 ± 0.4 a	5.1 ± 0.5 a	5.1 ± 0.1 a	4.8 ± 0.7 a	4.4 ± 0.7 a	5.1 ± 0.7 a	5.6 ± 0.4 a
	Glucosa	8.9 ± 0.7 a	11.2 ± 0.3 a	10.0 ± 1.1 a	9.9 ± 0.5 a	8.7 ± 1.7 a	9.8 ± 0.7 a	8.9 ± 3.9 a
	Manosa	9.6 ± 1.0 abc	10.9 ± 0.0 bc	10.1 ± 0.9 bc	11.2 ± 0.0 c	9.3 ± 0.7 ab	10.2 ± 0.2 bc	8.1 ± 0.8 a
	Xilosa	7.7 ± 1.1 a	9.3 ± 0.9 a	8.9 ± 0.9 a	8.8 ± 1.8 a	8.2 ± 0.8 a	8.2 ± 0.9 a	6.7 ± 0.7 a
	Xilitol	0.7 ± 0.1 a	0.8 ± 0.2 a	0.8 ± 0 a	0.7 ± 0.3 a	0.6 ± 0.1 a	0.7 ± 0.1 a	1 ± 0.4 a
	Ácido galacturónico	52.6 ± 2.1 a	46.6 ± 4.2 a	48.0 ± 2.1 a	49.4 ± 4.9 a	53.9 ± 0.1 a	51.1 ± 4.8 a	52.6 ± 7.0 a
	Ácido glucurónico	1.0 ± 0.1 a	1.1 ± 0.2 a	1.2 ± 0 a	1.2 ± 0.5 a	0.9 ± 0.2 a	1.1 ± 0.3 a	1.1 ± 0.1 a
Ácido 4-O-metil-glucurónico	1.8 ± 0.2 ab	2.3 ± 0.2 abc	2.3 ± 0.1 bc	2.6 ± 0.3 c	2.2 ± 0.4 abc	1.9 ± 0.2 ab	1.7 ± 0.1 a	
2017	Arabinosa	9.7 ± 1.0 a	10.4 ± 0.7 a	9.9 ± 4 a	11.2 ± 0.6 a	10.9 ± 2.2 a	10.4 ± 0.6 a	10.6 ± 0.6 a
	Ramnosa	1.1 ± 0.2 a	1.3 ± 1.1 a	0.9 ± 0.1 a	0.8 ± 0 a	2.4 ± 1.2 a	3.5 ± 3 a	2.9 ± 1.6 a
	Fucosa	1.2 ± 0.2 a	1.2 ± 0.2 a	1.1 ± 0.3 a	1.3 ± 0.1 a	1.1 ± 0.2 a	1.2 ± 0 a	1.0 ± 0.2 a
	Galactosa	4.5 ± 0.6 ab	7.1 ± 3 b	3.9 ± 1.2 a	5.4 ± 0 ab	4.5 ± 0.6 ab	5.3 ± 1 ab	5.1 ± 0.2 ab
	Glucosa	10.9 ± 2.1 a	11.3 ± 4.5 a	10.3 ± 3.1 a	12.8 ± 1.6 a	8.4 ± 0.0 a	8.5 ± 1.1 a	7.8 ± 0.8 a
	Manosa	10.6 ± 1.7 a	12.5 ± 6.8 a	9.5 ± 3.2 a	11.6 ± 1.1 a	8.7 ± 0 a	9.2 ± 1.1 a	8.6 ± 0.5 a
	Xilosa	6.9 ± 1.2 a	8.3 ± 2 a	7.8 ± 1.2 a	7.7 ± 0.1 a	6.8 ± 0.7 a	6.1 ± 0.7 a	6.9 ± 0.4 a
	Xilitol	0.6 ± 0.1 a	1.1 ± 0.8 a	0.8 ± 0.2 a	0.8 ± 0 a	0.7 ± 0.1 a	0.5 ± 0.2 a	0.5 ± 0.2 a
	Ácido galacturónico	51.8 ± 5.9 a	43.4 ± 18.3 a	52.8 ± 13.7 a	45.5 ± 2.5 a	53.8 ± 0.8 a	53.0 ± 1.6 a	53.7 ± 0.6 a
	Ácido glucurónico	1.1 ± 0.2 a	1.3 ± 0.4 a	0.9 ± 0.1 a	1.2 ± 0 a	1.0 ± 0.5 a	1.1 ± 0.1 a	1.1 ± 0 a
Ácido 4-O-metil-glucurónico	1.5 ± 0.4 a	2.3 ± 1.1 a	1.9 ± 0.4 a	1.8 ± 0.3 a	1.7 ± 0.5 a	1.2 ± 0.1 a	1.6 ± 0.3 a	

Abreviaciones: MeJ, Metil Jasmonato; BTH, Benzotiadiazol. Los valores corresponden a la media ± DS. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

6.5.2.2 Oligosacáridos totales

La concentración de oligosacáridos totales de los vinos elaborados durante las dos campañas se muestra en la Figura 6.4, donde encontramos que la concentración media de oligosacáridos totales de los vinos de 2016 fue 343 mg/L, una concentración mucho menor que los 413 mg/L encontrados en 2017. Aunque parece evidente que la liberación de los oligosacáridos al vino fue mayor durante la campaña 2017, la alta variabilidad encontrada en las concentraciones de este año, dificulta una explicación razonada de nuestros resultados, atribuyéndolos únicamente a las diferencias interanuales experimentadas en 2016 y 2017. A pesar de ello, los valores medios encontrados en nuestras muestras son comparables a los encontrados en otras investigaciones, donde también se analizaron vinos de la variedad Monastrell (Apolinar-Valiente et al., 2014, 2018).

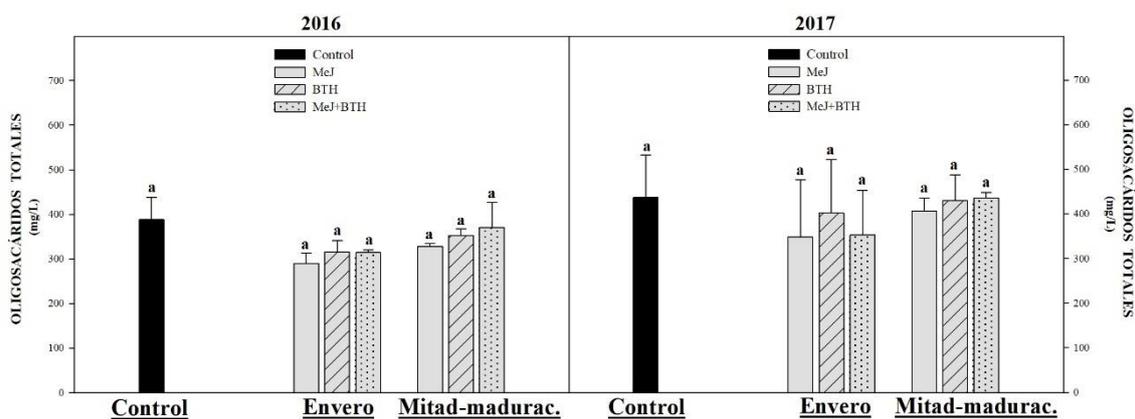


Figura 6.4 Concentración en mg/L de oligosacáridos totales en vinos procedentes de uvas Monastrell durante las campañas 2016 y 2017. Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0.05$).

Con respecto a los oligosacáridos totales analizados en los vinos elaborados, los resultados indicaron que, durante las dos campañas de estudio, no se registraron diferencias significativas en las concentraciones de vinos elaborados con uvas control y los elaborados con uvas tratadas con elicitores, ya sea aplicados en enero o mitad-de-maduración. Estos resultados se intuían, tras no encontrar diferencias en los residuos individuales de glicosil (Tabla 6.2). Similares resultados fueron observados por Apolinar-Valiente et al. (2018), tras analizar las concentraciones de oligosacáridos totales de vinos

de uvas tratadas con MeJ y BTH, los cuales tampoco encontraron diferencias significativas con los vinos de uvas control; no obstante, estos autores sí que observaron menores concentraciones en los vinos de uvas tratadas con quitosano de origen fúngico y marino.

6.5.3 ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

Se realizó un ACP con los datos de concentración de las tres familias de polisacáridos (MPs, PRAGs, RG-II) y con la concentración de oligosacáridos totales, para reconocer patrones que no hayan sido supervisados, y que puedan revelar posibles relaciones entre las variables estudiadas (Figura 6.5). Se generaron dos componentes principales, donde el primer componente explicó el 53 % de la varianza y el segundo componente el 25 %; sumando entre los dos el 78 % de la variabilidad de los datos, un porcentaje suficiente para tratar de explicar los aspectos más relevantes del conjunto de datos.

Las proyecciones generadas por las variables mostraron una moderada separación entre las campañas estudiadas, ubicando los resultados de la campaña 2016 en la parte negativa de la componente 2, y a la campaña 2017 en el cuadrante positivo de la misma componente.

En la campaña 2016, observamos que las proyecciones de los resultados de los dos momentos de aplicación aparecieron cercanas entre ellas. De los cuales, los vinos de uvas tratadas en enero fueron las proyecciones más alejadas de los vinos control. Se pudo distinguir también, que los vinos de uvas tratadas con MeJ en enero y mitad-de-maduración, fueron los más alejados de los vinos de uvas control, indicando que este tratamiento fue el que más negativamente influyó en la liberación de azúcares complejos de los vinos elaborados durante 2016.

La dispersión de las proyecciones de los resultados en 2017, pusieron de manifiesto que ninguno de los tratamientos de uvas durante el enero y mitad-de-maduración, causaron efectos en la liberación de polisacáridos y oligosacáridos a sus vinos, con respecto a los vinos de uvas control.

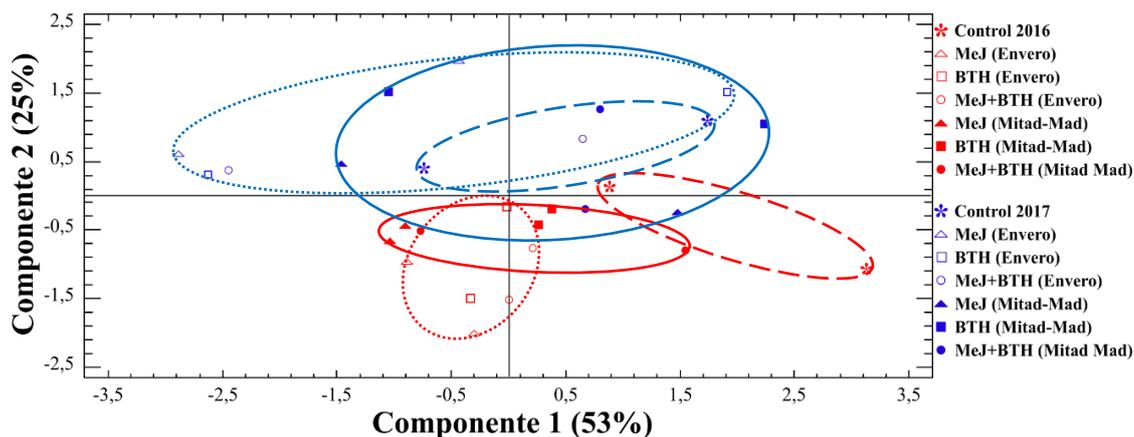


Figura 6.5 Gráfico de dispersión de componentes principales de las 3 familias de polisacáridos (MPs, PRAGs, RG-II) y oligosacáridos totales, en vinos de uvas Monastrell durante las campañas 2016 y 2017.

Se elaboró además una figura que muestra la contribución de cada variable (Figura 6.6), la cual nos indicó que los PRAGs y los RG-II (puntos más alejados del origen) fueron las variables que más contribuyeron a explicar la variabilidad de los datos, seguidos muy de cerca por los oligosacáridos totales y las MPs.

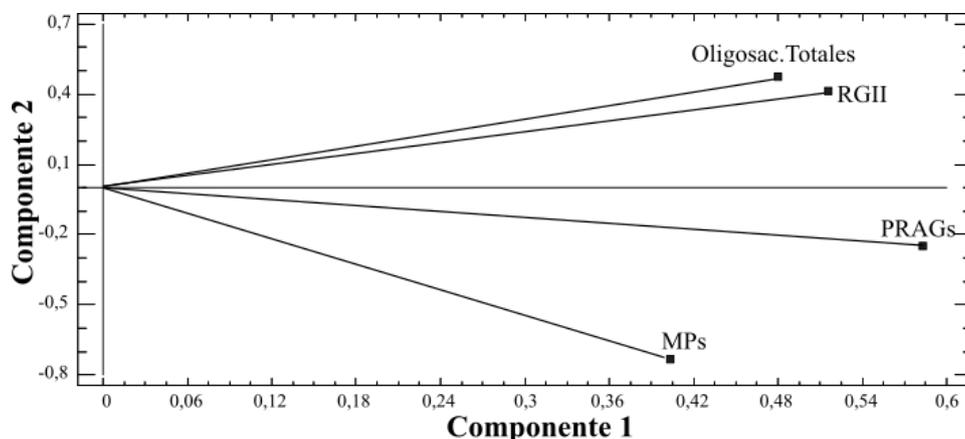


Figura 6.6 Contribución de las variables MPs, PRAGs, RG-II y oligosacáridos totales, en el sistema de coordenadas definido por los dos primeros componentes principales.

6.5.4 ANÁLISIS SENSORIAL

En vista de las diferencias observadas en los análisis de los vinos procedentes de uvas control y de uvas tratadas con elicitores, se decidió realizar un análisis sensorial utilizando catas triangulares que nos permitieran determinar si existían diferencias organolépticas entre los vinos, y en caso de haberlas, comprobar si estas diferencias disminuían o mejoraban la calidad sensorial de los mismos (Tabla 6.3). Así mismo, para aquellos vinos que fueron diferenciados correctamente, se realizó un análisis estadístico del nivel de diferencia percibida entre las muestras a nivel visual, olfativo y gustativo, con una escala del 1 al 5 (1=nula; 2=débil; 3=media; 4= fuerte y 5=muy fuerte) (Figura 6.7) así como el nivel de preferencia.

En la campaña 2016 contamos con la colaboración de 8 catadores entrenados. Tras el análisis de los resultados, se constató que los catadores no fueron capaces de distinguir entre los vinos de uvas control y los procedentes de uvas tratadas con MeJ, BTH y MeJ+BTH, indistintamente de si fueron tratadas en envero o mitad-de-maduración (Tabla 6.3); ya que con un total de 8 catadores, el número mínimo de aciertos debe ser de 6, para obtener al menos un 95% de nivel de significancia (Roessler et al., 1978). Sin embargo y, aunque no hubo diferencias estadísticas, los catadores que lograron acertar mostraron preferencia por los vinos de uvas tratadas con BTH, ya fueran tratadas en envero o mitad-de-maduración. Con el resto de los vinos, las preferencias fueron iguales para los vinos elaborados con uvas tratadas que para los vinos de uvas control, salvo para los vinos de uvas tratadas con MeJ en envero, donde 3 de los 5 catadores que acertaron, prefirieron los vinos de uvas control. En relación a estos resultados, en un estudio similar con vinos elaborados a partir de uvas Monastrell tratadas en el envero con MeJ y BTH, los investigadores observaron que los catadores fueron capaces de diferenciar todos los vinos, y mostrar además preferencia por los vinos de uvas tratadas con MeJ y BTH, cuando fueron comparados con los vinos de uvas control (Ruiz-García, Romero-Cascales, et al., 2012).

En la campaña 2017 contamos con la colaboración de 12 catadores entrenados (Tabla 6.3), los cuales fueron capaces de distinguir únicamente los vinos de uvas control, de los vinos de uvas tratadas con BTH durante el envero. Además, 5 de los 8 catadores

que acertaron, prefirieron los vinos de uvas tratadas con BTH. Cuando se enfrentaron el resto de los vinos de uvas tratadas con los vinos de uvas control, los catadores no fueron capaces de distinguirlos entre ellos; sin embargo, aunque no exista relevancia estadística, los catadores que lograron acertar prefirieron los vinos de uvas tratadas con MeJ+BTH durante el envero, y los de uvas tratadas con BTH durante mitad-de-maduración. No obstante, cuando se enfrentaron los vinos control con los de uvas tratadas con MeJ, o MeJ+BTH en mitad-de-maduración, los catadores prefirieron los vinos de uvas control.

Tabla 6.3 Catas triangulares de los vinos de uvas Monastrell.

Año	Momento de aplicación	Muestras	Nº Catadores	Nº Aciertos	Muestra preferida	
					Control	Tratamiento
2016	Envero	Control vs MeJ	8	5	3	2
		Control vs BTH	8	4	1	3
		Control vs MeJ+BTH	8	4	2	2
	Mitad de maduración	Control vs MeJ	8	4	2	2
		Control vs BTH	8	5	2	3
		Control vs MeJ+BTH	8	4	2	2
2017	Envero	Control vs MeJ	12	6	3	3
		Control vs BTH	12	8*	3	5
		Control vs MeJ+BTH	12	7	2	5
	Mitad de maduración	Control vs MeJ	12	6	4	2
		Control vs BTH	12	5	2	3
		Control vs MeJ+BTH	12	5	3	2

*Número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,05$); **número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,01$); ***número de aciertos estadísticamente significativo ($p < 0,001$).

Por otra parte, cuando los vinos fueron correctamente diferenciados por los catadores, los resultados indicaron que el nivel de diferenciación percibida entre las muestras fue similar durante las dos campañas (Figura 6.7).

Así observamos, que el nivel de diferenciación a nivel visual entre las muestras enfrentadas, obtuvo un valor medio de 1,8 en las dos campañas. A nivel olfativo, el valor medio de diferenciación fue de 2,0; y a nivel gustativo el nivel de diferenciación obtuvo un valor medio de 1,8. Es decir, ninguna de las características sobresalió sobre la otra, y las diferencias percibidas fueron más bien débiles. En relación a esto, Gómez-Plaza et al. (2012) observaron que en el análisis sensorial de vinos de uvas Monastrell tratados con MeJ y BTH, los catadores mostraron que las diferencias encontradas fueron

principalmente a nivel olfativo y gustativo, y que a nivel visual fueron más bien nulas o débiles.

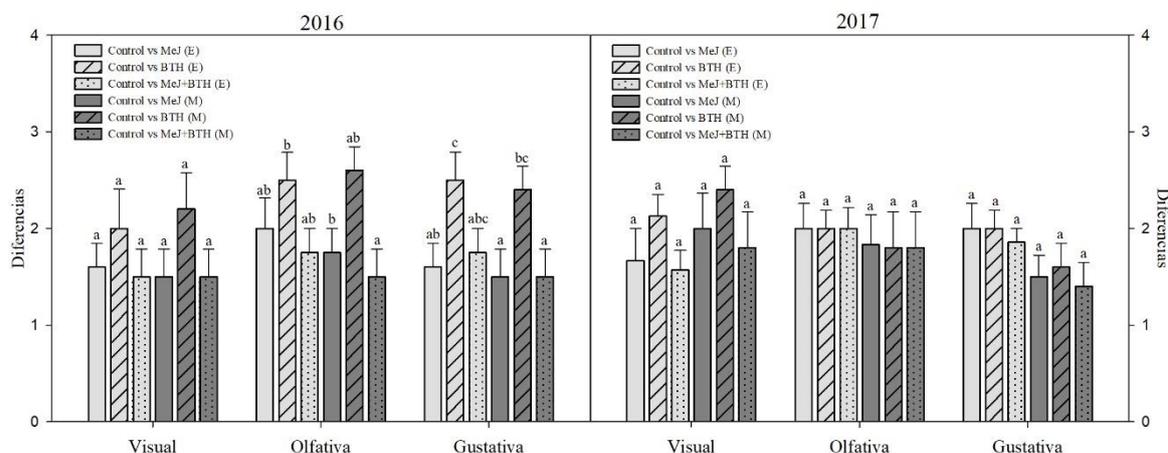


Figura 6.7 Grado de diferencia percibida entre los vinos a nivel visual, olfativo y gustativo. Abreviaturas: MeJ, metil jasmonato; BTH, Benzotiadiazol; E, envero; M, mitad-de-maduración

En las catas de 2016 se apreció claramente a nivel visual, olfativo y gustativo (Figura 6.7), que cuando se enfrentaron los vinos control con los de uvas tratadas con BTH (envero o mitad-de-maduración), las diferencias percibidas por los catadores fueron mayores que para el resto de los vinos, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas, salvo a nivel gustativo en el caso de Control vs BTH (Envero).

En las catas de 2017 los niveles de diferenciación tampoco tuvieron relevancia estadística; sin embargo, ligeras diferencias se encontraron a nivel visual cuando se enfrentaron los vinos de uvas control con los de uvas tratadas con BTH. Por su parte, las diferencias a nivel olfativo y gustativo fueron similares.

En vista de los resultados obtenidos en el análisis sensorial, las características organolépticas de los vinos elaborados, no parecen haber sido alterados en mayor medida por los tratamientos realizados en el viñedo. No obstante, los catadores manifestaron ligeras preferencias por los vinos de uvas tratadas con BTH.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El objetivo de esta Tesis Doctoral fue evaluar el efecto de la aplicación foliar de dos elicitores diferentes (MeJ, BTH, y una combinación de ambos), en dos momentos distintos durante el proceso de maduración de Monastrell (envero y mitad-de-maduración), con el fin de determinar cuál sería el o los tratamientos más adecuados así como su momento de aplicación óptimo, para obtener la uva y los vinos de la mejor calidad organoléptica y funcional. En base a los resultados obtenidos se puede concluir que:

En cuanto al efecto de la añada:

1. Las diferentes condiciones climáticas experimentadas durante los dos años de estudio influyeron en los resultados obtenidos en las uvas y en los vinos para los diferentes parámetros medidos.
2. Las condiciones adversas de 2017 (año más caluroso y fuertes precipitaciones antes de la vendimia) influyeron negativamente en el desarrollo y metabolismo de las uvas Monastrell, ya que las bayas registraron un mayor peso medio y alcanzaron un menor °Brix, así como una menor proporción de pared celular en las pieles y una menor concentración de compuestos fenólicos, excepto en el caso de las semillas cuya concentración de proantocianidinas fue superior.
3. Los vinos obtenidos de esta añada mostraron a su vez, un menor grado alcohólico, menor concentración de manoproteínas, antocianos y flavonoles totales, y una mayor concentración de proantocianidinas; que se tradujo en vinos con menor intensidad de color y mayor luminosidad que los elaborados en 2016.

En cuanto al efecto de los elicitores y su momento de aplicación:

1. En el estudio de la composición de la pared celular de las uvas de Monastrell se concluyó que los tratamientos MeJ y MeJ+BTH aplicados en envero fueron los que más influyeron en su composición. Disminuyeron la concentración de hemicelulosa y derivados pécticos, e incrementaron la concentración de lignina, proteínas y fenoles totales. En cambio, las uvas tratadas con BTH (en envero o en mitad-de-maduración), fueron las únicas que presentaron una mayor concentración de celulosa en las paredes celulares de sus pieles.
2. En el estudio de la composición fenólica de las uvas se constató que el tratamiento MeJ+BTH aplicado en envero, y todos los tratamientos aplicados en mitad-de-maduración (MeJ, BTH y MeJ+BTH), incrementaron la concentración de antocianos totales medidos en las uvas, en especial los antocianos no-acilados. Sin embargo, no se observaron efectos en la concentración de flavonoles de las pieles por la aplicación de ninguno de los tratamientos.
3. En las proantocianidinas de las pieles como de las semillas, también se observaron incrementos por la aplicación de los elicitores MeJ, BTH y MeJ+BTH, principalmente por los aplicados en mitad-de-maduración; en cambio las uvas tratadas con MeJ durante el envero registraron una menor concentración de proantocianidinas que las uvas control.
4. Los efectos de la aplicación de elicitores en las uvas, afectaron de forma distinta a la extracción de los distintos componentes liberados al vino, de modo que los resultados obtenidos no fueron tan evidentes como los obtenidos en las uvas tratadas.
5. Los vinos procedentes de uvas tratadas con BTH durante el envero, fueron los únicos que registraron mayor concentración de antocianos que los vinos de uvas control, principalmente en el caso de los antocianos no-

acilados. La concentración de flavonoles totales fue similar en todos los vinos elaborados.

6. La concentración de proantocianidinas de los vinos de uvas tratadas, también fue superior que la de los vinos de uvas control, sobre todo en los procedentes de uvas tratadas en mitad-de-maduración.
7. En cuanto a los principales polisacáridos presentes en los vinos, (PRAGs y los RG-II), los vinos de uvas tratadas con MeJ en envero o mitad-de-maduración, fueron los que presentaron las concentraciones más bajas de estos azúcares complejos, comparados con los vinos de uvas control. Sin embargo, la liberación de MPs y oligosacáridos al vino no se vio afectada por la aplicación de ninguno de los tratamientos.
8. El análisis sensorial reflejó que las características organolépticas de los vinos, no fueron alteradas en mayor medida por los tratamientos realizados en el viñedo. No obstante, los catadores manifestaron ligeras preferencias por los vinos de uvas tratadas con BTH.

Por lo anteriormente expuesto, se considera que los tratamientos MeJ y BTH aplicados en mitad-de-maduración serían la mejor opción para mejorar la calidad polifenólica de las uvas Monastrell aunque por los resultados obtenidos, también el tratamiento MeJ+BTH podría ser aplicado en los dos momentos de maduración, ampliando el periodo de aplicación en caso de necesitarlo.

Como conclusión general podríamos decir que el uso de MeJ y BTH podría representar una alternativa prometedora para desarrollar una viticultura más respetuosa con el medio ambiente, protegiendo a las uvas y mejorando al mismo tiempo su valor funcional. No obstante, se recomienda un estudio más exhaustivo a nivel enológico para poder incrementar la eficiencia de extracción de los compuestos de interés.

CONCLUSIONS

The objective of this Doctoral Thesis was to evaluate the effect of the foliar application of two different elicitors (MeJ, BTH, and a combination of both), at two different times during the ripening process of Monastrell (veraison and mid-ripening), in order to determine which would be the most appropriate treatment or treatments and their optimal application time, to obtain grapes and wines of the best organoleptic and functional quality. Based on the results obtained, it can be concluded that:

Regarding the effect of vintage:

1. The different climatic conditions experienced during the two years of study influenced the results obtained in grapes and wines for the different parameters measured.
2. The adverse conditions of 2017 (warmer year and heavy rainfall before harvest) had a negative influence on the development and metabolism of Monastrell grapes, as the berries recorded a higher average weight and reached a lower °Brix, as well as a lower proportion of cell wall in the skins and a lower concentration of phenolic compounds, except in the case of the seeds whose concentration of proanthocyanidins was higher.
3. The wines obtained from this vintage showed, in turn, a lower alcohol content, lower concentration of mannoproteins, anthocyanins and total flavonols, and a higher concentration of proanthocyanidins; which resulted in wines with lower color intensity and higher luminosity than those made in 2016.

Regarding the effect of elicitors and their timing of application:

1. In the study of the composition of the cell wall of Monastrell grapes, it was concluded that the MeJ and MeJ+BTH treatments applied at veraison had the greatest influence on its composition. They decreased the concentration of hemicellulose and pectic derivatives, and increased the concentration of lignin, proteins and total phenols. On the other hand, grapes treated with BTH (at veraison or mid-ripening) were the only ones that presented a higher concentration of cellulose in the cell walls of their skins.
2. In the study of the phenolic composition of the grapes, it was found that the MeJ+BTH treatment applied at veraison, and all the treatments applied at mid-ripening (MeJ, BTH and MeJ+BTH), increased the concentration of total anthocyanins measured in the grapes, especially the non-acylated anthocyanins. However, no effects on the concentration of flavonols in the skins were observed by the application of any of the treatments.
3. Proanthocyanidins in the skins and seeds were also increased by the application of MeJ, BTH and MeJ+BTH elicitors, mainly by those applied at mid-ripening; on the other hand, grapes treated with MeJ during veraison showed a lower concentration of proanthocyanidins than the control grapes.
4. The effects of the application of elicitors on the grapes affected the extraction of the different components released into the wine in different ways, so the results obtained were not as evident as those obtained in the treated grapes.
5. Wines from grapes treated with BTH during veraison were the only ones that recorded higher anthocyanin concentrations than wines from control grapes, mainly in the case of non-acylated anthocyanins. The concentration of total flavonols was similar in all the wines produced.

6. The concentration of proanthocyanidins in the wines from treated grapes was also higher compared to the wines from control grapes, especially in those from grapes treated at mid-ripening.
7. Regarding the main polysaccharides present in the wines (PRAGs and RG-II), wines from grapes treated with MeJ at veraison or mid-ripening, showed the lowest concentrations of these complex sugars compared to wines from control grapes. However, the release of MPs and oligosaccharides into the wine was not affected by the application of any of the treatments.
8. The sensory analysis showed that the organoleptic characteristics of the wines were not altered to a greater extent by the treatments carried out in the vineyard. However, the tasters showed slight preferences for the wines from grapes treated with BTH.

Based on the above, it is considered that the MeJ and BTH treatments applied at mid-ripening would be the best option to improve the polyphenolic quality of Monastrell grapes, although based on the results obtained, the MeJ+BTH treatment could also be applied at both ripening stages, extending the application period if necessary.

As a general conclusion we could say that the use of MeJ and BTH could represent a promising alternative to develop a more environmentally friendly viticulture, protecting grapes and improving their functional value at the same time. However, a more exhaustive study at the enological level is recommended in order to increase the extraction efficiency of the compounds of interest.

CAPÍTULO 8. REFERENCIAS

- Adams, D. O. (2006). Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 249–256.
- Aguilar-Uscanga, B., & François, J. M. (2003). A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Letters in Applied Microbiology*, 37(3), 268–274. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x>
- Aguirre, M. J., Isaacs, M., Matsuhiro, B., Mendoza, L., & Zúñiga, E. A. (2009). Characterization of a neutral polysaccharide with antioxidant capacity from red wine. *Carbohydrate Research*, 344(9), 1095–1101. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.03.024>
- Albersheim, P., An, J., Freshour, G., Fuller, M. S., Guillen, R., Ham, K. S., Hahn, M. G., Huang, J., O'Neill, M., Whitcombe, A., Williams, M. V., York, W. S., & Darvill, A. (1994). Structure and function studies of plant cell wall polysaccharides. *Biochemical Society Transactions*, 22(2), 374–378. <https://doi.org/10.1042/bst0220374>
- Albersheim, P., Ayers, A. R., Valent, B. S., Ebel, J., Hahn, M., Wolpert, J., & Carlson, R. (1977). Plants interact with microbial polysaccharides. *Journal of Supramolecular and Cellular Biochemistry*, 6(4), 599–616. <https://doi.org/10.1002/jss.400060413>
- Aleixandre-Tudo, J. L., & du Toit, W. (2018). Cold maceration application in red wine production and its effects on phenolic compounds: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 95, 200–208. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.04.096>
- Álvarez, I., Aleixandre, J. L., García, M. J., & Lizama, V. (2006). Impact of prefermentative maceration on the phenolic and volatile compounds in Monastrell red wines. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2 SPEC. ISS.), 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.10.068>
- Anttonen, M., Hukkanen, A., Tiilikkala, K., & Karjalainen, R. (2003). Benzothiadiazole induces defence responses in berry crops. *Acta Horticulturae*, 626 177–182.

<https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.626.23>

- Apolinar-Valiente, R. (2011). *Pared celular de uva y polisacáridos de vinos de distinta procedencia, elaborados mediante tecnologías enzimáticas y de frío*. (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia. Murcia-España.
- Apolinar-Valiente, R., Gómez-Plaza, E., Terrier, N., Doco, T., & Ros-García, J. M. (2017). The composition of cell walls from grape skin in *Vitis vinifera* intraspecific hybrids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(12), 4029–4035. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8270>
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., & Ros-García, J. M. (2015). The composition of cell walls from grape marcs is affected by grape origin and enological technique. *Food Chemistry*, 167, 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.030>
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., López-Roca, J. M., Gómez-Plaza, E., & Ros-García, J. M. (2010). Application and comparison of four selected procedures for the isolation of cell-wall material from the skin of grapes cv. Monastrell. *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2), 206–210. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.020>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.139>
- Apolinar-Valiente, R., Ruiz-García, Y., Williams, P., Gil-Muñoz, R., Gómez-Plaza, E., & Doco, T. (2018). Preharvest application of elicitors to Monastrell grapes: Impact on wine polysaccharide and oligosaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(42), 11151–11157. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05231>
- Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Mazerolles, G., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., & Doco, T. (2014). Effect of enzyme additions on the oligosaccharide composition of Monastrell red wines from four

- different wine-growing origins in Spain. *Food Chemistry*, 156, 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.01.093>
- Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., & Doco, T. (2013). Polysaccharide composition of monastrell red wines from four different Spanish terroirs: Effect of wine-making techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(10), 2538–2547. <https://doi.org/10.1021/jf304987m>
- Arnous, A., & Meyer, A. S. (2009). Quantitative prediction of cell wall polysaccharide composition in grape (*Vitis vinifera* L.) and apple (*Malus domestica*) skins from acid hydrolysis monosaccharide profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3611–3619. <https://doi.org/10.1021/jf900780r>
- Aron, P. M., & Kennedy, J. A. (2007). Compositional investigation of phenolic polymers isolated from *Vitis vinifera* L. cv. Pinot Noir during fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5670–5680. <https://doi.org/10.1021/jf0704817>
- Arozarena, I., Casp, A., Marín, R., & Navarro, M. (2000). Differentiation of some Spanish wines according to variety and region based on their anthocyanin composition. *European Food Research and Technology*, 212(1), 108–112. <https://doi.org/10.1007/s002170000212>
- Athar, M., Back, J. H., Tang, X., Kim, K. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., & Kim, A. L. (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224(3), 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.025>
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. E. (2013). La vida en la tierra. In *Biología. La vida en la Tierra* (Vol. 9). <https://doi.org/10.1007/s00417-006-0324-4>
- Ayestarán, B., Guadalupe, Z., & León, D. (2004). Quantification of major grape polysaccharides (Tempranillo v.) released by maceration enzymes during the fermentation process. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 29–39.

<https://doi.org/10.1016/j.aca.2003.12.012>

- Bautista-Ortín, A. B. (2005). *Técnicas enológicas para la obtención de vinos de Monastrell de alto contenido polifenólico*. (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia. Murcia-España.
- Bautista-Ortín, A. B., Cano-Lechuga, M., Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2014). Interactions between grape skin cell wall material and commercial enological tannins. Practical implications. *Food Chemistry*, *152*, 558–565. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.009>
- Bautista-Ortín, A. B., Jiménez-Martínez, M. D., Jurado, R., Iniesta, J. A., Terrades, S., Andrés, A., & Gómez-Plaza, E. (2017). Application of high-power ultrasounds during red wine vinification. *International Journal of Food Science and Technology*, *52*(6), 1314–1323. <https://doi.org/10.1111/ijfs.13411>
- Bautista-Ortín, A. B., Jiménez-Pascual, E., Busse-Valverde, N., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2013). Effect of wine maceration enzymes on the extraction of grape seed proanthocyanidins. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(8), 2207–2212. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0768-3>
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Cutillas, A., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2005). Improving colour extraction and stability in red wines: The use of maceration enzymes and enological tannins. *International Journal of Food Science and Technology*, *40*(8), 867–878. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01014.x>
- Bautista-Ortín, A. B., Martínez-Hernández, A., Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2016). Anthocyanins influence tannin-cell wall interactions. *Food Chemistry*, *206*, 239–248. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.045>
- Bautista-Ortín, A. B., Ruiz-García, Y., Marín, F., Molero, N., Apolinar-Valiente, R., & Gómez-Plaza, E. (2015). Remarkable proanthocyanidin adsorption properties of monastrell pomace cell wall material highlight its potential use as an alternative fining agent in red wine production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,

- 63(2), 620–633. <https://doi.org/10.1021/jf503659y>
- Bavaresco, L., Fregoni, C., Van Zeller De Macedo Basto Gonçalves, M. I., & Vezzulli, S. (2009). Physiology & molecular biology of grapevine stilbenes: An update. In *Grapevine Molecular Physiology and Biotechnology: Second Edition* (pp. 341–364). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2305-6_12
- Becatti, E., Chkaiban, L., Tonutti, P., Forcato, C., Bonghi, C., & Ranier, A. M. (2010). Short-term postharvest carbon dioxide treatments induce selective molecular and metabolic changes in grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(13), 8012–8020. <https://doi.org/10.1021/jf100936x>
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., & Mérillon, J. M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.001>
- Bergqvist, J., Dokoozlian, N., & Ebisuda, N. (2001). Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the Central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 1–7.
- Berké, B., & De Freitas, V. (2005). Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chemistry*, 90(3), 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.05.009>
- BOE 97. Disposición 593. (2012). *Orden AAA/828/2012, de 9 de abril, por la que se modifica el Reglamento de la Denominación de Origen “Jumilla” y de su Consejo Regulador.*
- Boerjan, W., Ralph, J., & Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1), 519–546. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938>

- Boller, T., & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379–407. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Bordiga, M., Travaglia, F., Meyrand, M., German, J. B., Lebrilla, C. B., Coisson, J. D., Arlorio, M., & Barile, D. (2012). Identification and characterization of complex bioactive oligosaccharides in white and red wine by a combination of mass spectrometry and gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(14), 3700–3707. <https://doi.org/10.1021/jf204885s>
- Boss, P. K., Davies, C., & Robinson, S. P. (1996). Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation. *Plant Physiology*, 111(4), 1059–1066. <https://doi.org/10.1104/pp.111.4.1059>
- Boudet, A. M. (2000). Lignins and lignification: Selected issues. *Plant Physiology and Biochemistry*, 38(1–2), 81–96. [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)00166-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)00166-2)
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67–87. <https://doi.org/10.1063/1.337514>
- Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., Kunkee, R. E., Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1999). Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. In *Principles and Practices of Winemaking* (pp. 102–192). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6255-6_4
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
- Brisson, L. F., Tenhaken, R., & Lamb, C. (1994). Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. *Plant Cell*, 6(12), 1703–1712. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.12.1703>

- Brown, S. L., Stockdale, V. J., Pettolino, F., Poccock, K. F., De Barros Lopes, M., Williams, P. J., Bacic, A., Fincher, G. B., Høj, P. B., & Waters, E. J. (2007). Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(6), 1363–1376. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0606-0>
- Busse-Valverde, N. (2013). *Proantocianidinas de uvas y vinos de las variedades Monastrell, Cabernet Sauvignon y Syrah*. (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia. Murcia-España.
- Busse-Valverde, N., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., Fernández-Fernández, J. I., & Gil-Muñoz, R. (2012). Influence of skin maceration time on the proanthocyanidin content of red wines. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1842-4>
- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., & Bautista-Ortín, A. B. (2011). The extraction of anthocyanins and proanthocyanidins from grapes to wine during fermentative maceration is affected by the enological technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5450–5455. <https://doi.org/10.1021/jf2002188>
- Busse-Valverde, N., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., & Bautista-Ortín, A. B. (2010). Effect of different enological practices on skin and seed proanthocyanidins in three varietal wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11333–11339. <https://doi.org/10.1021/jf102265c>
- Buttrose, M. S., Hale, C. R., & Kliwer, W. M. (1972). Effect of temperature on the composition of “Cabernet Sauvignon” berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 22, 71–75.
- Cacho, J., Fernandez, 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*, 432, 244–248.

- Caffall, K. H., & Mohnen, D. (2009). The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides. *Carbohydrate Research*, 344(14), 1879–1900. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.05.021>
- Calderón, A. A., Zapata, J. M., Pedreño, M. A., & Ros, A. (1994). Constitutive expression of extracellular peroxidase isoenzymes capable of oxidizing 4-hydroxystilbenes during the growth cycle of grapevine suspension cell cultures. *Biologia Plantarum*, 36(2), 161–166. <https://doi.org/10.1007/BF02921080>
- Calderón, A. A., Zapata, J. M., & Ros, A. (1994). Differential expression of a cell wall-localized peroxidase isoenzyme capable of oxidizing 4-hydroxystilbenes during the cell culture of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Airen and Monastrell). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37(2), 121–127. <https://doi.org/10.1007/BF00043605>
- Camps, J. O., & Ramos, M. C. (2012). Grape harvest and yield responses to inter-annual changes in temperature and precipitation in an area of north-east Spain with a Mediterranean climate. *International Journal of Biometeorology*, 56(5), 853–864. <https://doi.org/10.1007/s00484-011-0489-3>
- Cantos, E., Espín, J. C., Fernández, M. J., Oliva, J., & Tomás-Barberán, F. A. (2003). Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1208–1214. <https://doi.org/10.1021/jf020939z>
- Cantos, E., Tomás-Barberán, F. A., Martínez, A., & Espín, J. C. (2003). Differential stilbene induction susceptibility of seven red wine grape varieties upon post-harvest UV-C irradiation. *European Food Research and Technology*, 217(3), 253–258. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0736-x>
- Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y., & Lu, B. (2010). Effect of BTH on anthocyanin content and activities of related enzymes in strawberry after harvest. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5801–5805. <https://doi.org/10.1021/jf100742v>
- Cao, S., Hu, Z., Zheng, Y., Yang, Z., & Lu, B. (2011). Effect of BTH on antioxidant enzymes, radical-scavenging activity and decay in strawberry fruit. *Food Chemistry*,

- 125(1), 145–149. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.051>
- Carbonell-Bejerano, P., Diago, M. P., Martínez-Abaigar, J., Martínez-Zapater, J. M., Tardaguila, J., & Núñez-Olivera, E. (2014). Solar ultraviolet radiation is necessary to enhance grapevine fruit ripening transcriptional and phenolic responses. *BMC Plant Biology*, 14(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-183>
- Carew, A. L., Sparrow, A. M., Curtin, C. D., Close, D. C., & Damberg, R. G. (2014). Microwave maceration of Pinot Noir grape must: Sanitation and extraction effects and wine phenolics outcomes. *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), 954–963. <https://doi.org/10.1007/s11947-013-1112-x>
- Caridi, A. (2006). Enological functions of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 89(3–4), 417–422. <https://doi.org/10.1007/s10482-005-9050-x>
- Carpita, N., & Gibeaut, D. (1993). Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant Journal*, 3(1), 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- Carpita, N., Ralph, J., & McCann, C. (2015). The cell wall. In B. Buchanan, W. Gruissem, & R. Jones (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants* (2nd ed., pp. 45–110). John Wiley & Sons, Ltd.
- Casassa, 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(1), 83–109. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030713-092438>
- Cassab, G. I., & Varner, J. E. (1988). Cell wall proteins. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39(1), 321–353. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.39.060188.001541>
- Castelan-Estrada, M., Vivin, P., & Gaudillière, J. P. (2002). Allometric relationships to estimate seasonal above-ground vegetative and reproductive biomass of *Vitis*

- vinifera* L. *Annals of Botany*, 89(4), 401–408. <https://doi.org/10.1093/aob/mcf059>
- Castellarin, S. D., Bavaresco, L., Falginella, L., Gonçalves, M. I. V. Z., & Di Gaspero, G. (2012). Phenolics in grape berry and key antioxidants. In H. Gerós, M. M. Chaves, & S. Delrot (Eds.), *The Biochemistry of the Grape Berry* (pp. 89–110). Bentham Science Publishers. <https://doi.org/10.2174/978160805360511201010089>
- Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-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. <https://doi.org/10.1021/jf9002736>
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Gómez, M. V., Velders, A. H., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2009). Flavonol 3-O-glycosides series of *Vitis vinifera* Cv. Petit Verdot red wine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(1), 209–219. <https://doi.org/10.1021/jf802863g>
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 699–705. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.03.017>
- Cayla, R., & Cotterreau R., P. & R. (2002). Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard. *Revue Française d’oenologie*, 193(1), 10–16.
- Chalier, P., Angot, B., Delteil, D., Doco, T., & Gunata, Z. (2007). Interactions between aroma compounds and whole mannoprotein isolated from *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Food Chemistry*, 100(1), 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.004>
- Chang, T. K. H., Chen, J., & Lee, W. B. K. (2001). Differential inhibition and inactivation of human CYP1 enzymes by trans-resveratrol: Evidence for mechanism-based inactivation of CYP1A2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(3), 874–882.

- Cheyrier, V., Moutounet, M., & Sarni-Machado, P. (2000). Los compuestos fenólicos. In C. Flanzy (Ed.), *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos* (pp. 114–136). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa.
- Chira, K., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2012). Cabernet Sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *European Food Research and Technology*, 234(2), 253–261. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1627-1>
- Chira, K., Schmauch, G., Saucier, C., Fabre, S., & Teissedre, P. L. (2009). Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 545–553. <https://doi.org/10.1021/jf802301g>
- Considine, M., Croft, K., Gordon, C., & Ching, S. (2009). Salicylic acid overrides the effect of methyl jasmonate on the total antioxidant capacity of table grapes. *Acta Horticulturae*, 841, 495–498. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2009.841.67>
- Coombe, B. G. (1987). Influence of temperature on composition and quality of grapes. *Acta Horticulturae*, 206, 23–36. <https://doi.org/10.17660/actahortic.1987.206.1>
- Coombe, B. G., & Bishop, G. R. (1980). Development of the grape berry. II. Changes in diameter and deformability during veraison. *Australian Journal of Agricultural Research*, 31(3), 499–509. <https://doi.org/10.1071/AR9800499>
- Cortell, J. M., Halbleib, M., Gallagher, A. V., Righetti, T. L., & Kennedy, J. A. (2005). Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot noir) and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5798–5808. <https://doi.org/10.1021/jf0504770>
- Cosgrove, D. (2006). Paredes celulares: Estructura, biogénesis y expansión. In L. Taiz & E. Zeiger (Eds.), *Fisiología Vegetal (Vol II)* (3ª, pp. 587–631). Publicaciones de la Universitat Jaume I.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants.

- Annual Review of Plant Biology*, 48, 355–381.
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.355>
- Crippen, D. D., & Morrison, J. C. (1986). The effects of sun exposure on the compositional development of Cabernet Sauvignon berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(4), 235–242.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26(8), 1001.
<https://doi.org/10.1039/b802662a>
- Cueva, C., Mingo, S., Muñoz-González, I., Bustos, I., Requena, T., del Campo, R., Martín-Álvarez, P. J., Bartolomé, B., & Moreno-Arribas, M. V. (2012). Antibacterial activity of wine phenolic compounds and oenological extracts against potential respiratory pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 54(6), 557–563.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2012.03248.x>
- D.O.P. Jumilla. (2017). *Denominación de Origen Protegida Vinos de Jumilla*. Consejo Regulador D.O.P. Jumilla. <https://vinosdejumilla.org/wp-content/uploads/2017/03/Informacion-general-D-O-Jumilla-2017.pdf>
- D’Onofrio, C., Cox, A., Davies, C., & Boss, P. K. (2009). Induction of secondary metabolism in grape cell cultures by jasmonates. *Functional Plant Biology*, 36(4), 323–338. <https://doi.org/10.1071/FP08280>
- D’Onofrio, C., Matarese, F., & Cuzzola, A. (2018). Effect of methyl jasmonate on the aroma of Sangiovese grapes and wines. *Food Chemistry*, 242, 352–361.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.084>
- Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1984). Phytoalexins and their elicitors. A defense against microbial infection in plants. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 243–275. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.35.060184.001331>
- De Freitas, V., Carvalho, E., & Mateus, N. (2003). Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, 81(4), 503–509.
[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00479-X](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00479-X)

- De Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940–945. <https://doi.org/10.1021/jf000981z>
- De La Hera Orts, M. L., Martínez-Cutillas, A., López Roca, J. M., Pérez-Prieto, L. J., & Gómez-Plaza, E. (2005). Effect of deficit irrigation on anthocyanin content of monastrell grapes and wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et Du Vin*, 39(2), 47–55. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2005.39.2.899>
- de Vries, J. A., Rombouts, F. M., Voragen, A. G. J., & Pilnik, W. (1984). Comparison of the structural features of apple and citrus pectic substances. *Carbohydrate Polymers*, 4(2), 89–101. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(84\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0144-8617(84)90016-X)
- Del Barrio-Galán, R. (2012). *Crianza sobre lías y uso de preparados comerciales derivados de levadura en la calidad de vinos blancos y tintos*. (Tesis Doctoral). Universidad de Salamanca. Salamanca-España.
- Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, J. P. E., Tognolini, M., Borges, G., & Crozier, A. (2013). Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(14), 1818–1892. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4581>
- Delaunois, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., & Cordelier, S. (2014). Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7), 4837–4846. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1841-4>
- Demole, E., Lederer, E., & Mercier, D. (1962). Isolement et détermination de la structure du jasmonate de méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin. *Helvetica Chimica Acta*, 45(2), 675–685. <https://doi.org/10.1002/hlca.19620450233>
- Doco, T., & Brillouet, J. M. (1993). Isolation and characterisation of a rhamnogalacturonan II from red wine. *Carbohydrate Research*, 243(2), 333–343.

[https://doi.org/10.1016/0008-6215\(93\)87037-S](https://doi.org/10.1016/0008-6215(93)87037-S)

- Doco, T., Brillouet, J. M., & Moutounet, M. (1996). Evolution of grape (Carignan noir cv.) and yeast polysaccharides during fermentation and post-maceration. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47(1), 108–110.
- Doco, T., Quellec, N., Moutounet, M., & Pellerin, P. (1999). Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 25–32.
- Doco, T., Williams, P., Pauly, M., O'Neill, M., & Pellerin, P. (2003). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 53(3), 253–261. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00072-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00072-9)
- Doco, T., Williams, P., Vidal, S., & Pellerin, P. (1997). Rhamnogalacturonan II, a dominant polysaccharide in juices produced by enzymic liquefaction of fruits and vegetables. *Carbohydrate Research*, 297(2), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(96\)00260-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(96)00260-1)
- Doco, Thierry, Quellec, N., Moutounet, M., & Pellerin, P. (1999). Polysaccharide patterns during the aging of Carignan noir red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 25–32.
- Doco, Thierry, Vuchot, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2003). Structural modification of wine arabinogalactans during aging on lees. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(3), 150–157.
- Doco, Thierry, Williams, P., & Cheynier, V. (2007). Effect of flash release and pectinolytic enzyme treatments on wine polysaccharide composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6643–6649. <https://doi.org/10.1021/jf071427t>
- Dokoozlian, N. K., & Kliewer, W. M. (1996). Influence of light on grape berry growth and composition varies during fruit development. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121(5), 869–874.

<https://doi.org/10.21273/jashs.121.5.869>

- Dörnenburg, H., & Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(8), 674–684. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00108-4](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00108-4)
- Downey, M. O., Harvey, J. S., & Robinson, S. P. (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(1), 15–27. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2003.tb00228.x>
- Downey, M. O., Harvey, J. S., & Robinson, S. P. (2008). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 55–73. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2004.tb00008.x>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Ducasse, M. A., Williams, P., Canal-Llauberes, R. M., Mazerolles, G., Cheynier, V., & Doco, T. (2011). Effect of macerating enzymes on the oligosaccharide profiles of Merlot red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6558–6567. <https://doi.org/10.1021/jf2003877>
- Ducasse, M. A., Williams, P., Meudec, E., Cheynier, V., & Doco, T. (2010). Isolation of Carignan and Merlot red wine oligosaccharides and their characterization by ESI-MS. *Carbohydrate Polymers*, 79(3), 747–754. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.10.001>
- Dufour, C., & Bayonove, C. L. (1999). Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(2), 671–677. <https://doi.org/10.1021/jf9801062>
- Esatbeyoglu, T., Ewald, P., Yasui, Y., Yokokawa, H., Wagner, A. E., Matsugo, S.,

- Winterhalter, P., & Rimbach, G. (2016). Chemical characterization, free radical scavenging, and cellular antioxidant and anti-inflammatory properties of a stilbenoid-rich root extract of *Vitis vinifera*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/8591286>
- Escot, S., Feuillat, M., Dulau, L., & Charpentier, C. (2001). Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(3), 153–159. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00204.x>
- Escribano-Bailón, T., Dangles, O., & Brouillard, R. (1996). Coupling reactions between flavylum ions and catechin. *Phytochemistry*, 41(6), 1583–1592. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00811-X](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00811-X)
- Fernandes, A., Oliveira, J., Teixeira, N., Mateus, N., & De Freitas, V. (2017). A review of the current knowledge of red wine colour. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 51(1), 1–21. <https://doi.org/10.20870/oenone.2017.51.1.1604>
- Fernández-Fernández, J. I., Gil-Muñoz, R., Bleda-Sánchez, J. A., Corredor-Cano, J., Moreno-Olivares, J. D., Cebrián-Pérez, A., Martínez-Balsas, D., Gómez-Martínez, J. C., Palencia-Sigüenza, M. S., Carcelén-Cutillas, J. C., Giménez-Bañón, M. J., García-Pérez, M. G., Paladines-Quezada, D. F., Fernández-García, S., Martínez-Mora, C., Fuentes-Denia, A. M., Hita-Gambín, I., Salmerón-Gómez, E., Padilla-Martínez, C. V., ... Ruiz-García, L. (2020). Nuevas variedades procedentes de Monastrell adaptadas a clima cálido. Cosechas 2016 - 2019. *Enólogos*, 126, 78–88.
- Fernandez-Marin, M. I., Guerrero, R. F., Puertas, B., Garcia-Parrilla, M. C., Collado, I. G., & Cantos-Villar, E. (2013). Impact of preharvest and postharvest treatment combinations on increase of stilbene content in grape. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 47(3), 203–212.
- Fernández-Marín, M. I., Puertas, B., Guerrero, R. F., García-Parrilla, M. C., & Cantos-Villar, E. (2014). Preharvest methyl jasmonate and postharvest UVC treatments: Increasing stilbenes in wine. *Journal of Food Science*, 79(3), C310-C317. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12368>

- Fernández, M. J., Oliva, J., Barba, A., & Cámara, M. A. (2005). 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. <https://doi.org/10.1021/jf0580162>
- Ferrandino, A., Carra, A., Rolle, L., Schneider, A., & Schubert, A. (2012). Profiling of hydroxycinnamoyl tartrates and acylated anthocyanins in the skin of 34 *Vitis vinifera* genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(19), 4931–4945. <https://doi.org/10.1021/jf2045608>
- Ferraretto, P., Cacciola, V., Ferran Batlló, I., & Celotti, E. (2013). Ultrasounds application in winemaking: Grape maceration and yeast lysis. *Italian Journal of Food Science*, *25*(2), 160–168.
- Flamini, R., De Rosso, M., De Marchi, F., Dalla Vedova, A., Panighel, A., Gardiman, M., Maoz, I., & Bavaresco, L. (2013). An innovative approach to grape metabolomics: Stilbene profiling by suspect screening analysis. *Metabolomics*, *9*(6), 1243–1253. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0530-0>
- Flamini, R., Traldi, P., Desiderio, D. M., & Nibbering, N. M. M. (2010). *Mass Spectrometry in Grape and Wine Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470552926>
- Friedrich, L., Lawton, K., Ruess, W., Masner, P., Specker, N., Rella, M. G., Meier, B., Dincher, S., Staub, T., Uknes, S., Métraux, J. P., Kessmann, H., & Ryals, J. (1996). A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco. *Plant Journal*, *10*(1), 61–70. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1996.10010061.x>
- Fumagalli, F., Rossoni, M., Iriti, M., Di Gennaro, A., Faoro, F., Borroni, E., Borgo, M., Scienza, A., Sala, A., & Folco, G. (2006). From field to health: A simple way to increase the nutraceutical content of grape as shown by NO-dependent vascular relaxation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54*(15), 5344–5349. <https://doi.org/10.1021/jf0607157>
- García, M., Apolinar-Valiente, R., Williams, P., Esteve-Zarzoso, B., Arroyo, T., Crespo,

- J., & Doco, T. (2017). Polysaccharides and oligosaccharides produced on Malvar wines elaborated with *Torulaspora delbrueckii* CLI 918 and *Saccharomyces cerevisiae* CLI 889 native yeasts from D.O. “Vinos de Madrid.” *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(31), 6656–6664. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01676>
- Garde-Cerdán, T., Gutiérrez-Gamboa, G., Baroja, E., Rubio-Bretón, P., & Pérez-Álvarez, E. P. (2018). Influence of methyl jasmonate foliar application to vineyard on grape volatile composition over three consecutive vintages. *Food Research International*, 112, 274–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.048>
- Garde-Cerdán, T., Portu, J., López, R., & Santamaría, P. (2016). Effect of methyl jasmonate application to grapevine leaves on grape amino acid content. *Food Chemistry*, 203, 536–539. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.049>
- Garrido-Bañuelos, G., Buica, A., Schückel, J., Zietsman, A. J. J., Willats, W. G. T., Moore, J. P., & Du Toit, W. J. (2019). Investigating the relationship between grape cell wall polysaccharide composition and the extractability of phenolic compounds into Shiraz wines. Part I: Vintage and ripeness effects. *Food Chemistry*, 278, 36–46. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.134>
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols. A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844–1858. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>
- Gatti, M., Bernizzoni, F., Civardi, S., & Poni, S. (2012). Effects of cluster thinning and preflowering leaf removal on growth and grape composition in cv. Sangiovese. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(3), 325–332. <https://doi.org/10.5344/ajev.2012.11118>
- Gerós, H., Chaves, M. M., & Delrot, S. (2012). *The biochemistry of the grape berry* (H. Gerós, M. M. Chaves, & S. Delrot (eds.)). Bentham Science Publishers. <https://doi.org/10.2174/97816080536051120101>
- Gil-Cortiella, M. (2013). *Influencia de la madurez de la uva y de ciertas prácticas*

- vitivinícolas sobre el color, los compuestos fenólicos y los polisacáridos del vino tinto*. (Tesis Doctoral). Universitat Rovira I Virgil. Tarragona-España.
- Gil-Muñoz, Bautista-Ortín, A. B., Ruiz-García, Y., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2017). Improving phenolic and chromatic characteristics of Monastrell, Merlot and Syrah wines by using methyl jasmonate and benzothiadiazole. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 51, 17–27. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2017.51.1.1814>
- Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., Crespo-Villegas, O., & Garde-Cerdán, T. (2017). Elicitors used as a tool to increase stilbenes in grapes and wines. *Food Research International*, 98, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.035>
- Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., Portu, J., & Garde-Cerdán, T. (2018). Methyl jasmonate: effect on proanthocyanidin content in Monastrell and Tempranillo grapes and wines. *European Food Research and Technology*, 244(4), 611–621. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2981-4>
- Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., Vila-López, R., & Martínez-Cutillas, A. (2010). Anthocyanin profile in Monastrell grapes in six different areas from Denomination of Origin Jumilla during ripening stage. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(9), 1870–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02340.x>
- Gil-Muñoz, R., Moreno-Olivares, J. D., Paladines-Quezada, D. F., Cebrián-Pérez, A., & Fernández-Fernández, J. I. (2018). High anthocyanin level of grape hybrids from Monastrell and their wines. *International Journal of Horticulture & Agriculture*, 3(2), 1–8. <https://doi.org/10.15226/2572-3154/3/2/00122>
- Gil-Muñoz, R., Moreno-Pérez, A. A., Vila-López, R., Fernández-Fernández, J. I., Martínez-Cutillas, A., & Gómez-Plaza, E. (2009). Influence of low temperature prefermentative techniques on chromatic and phenolic characteristics of Syrah and Cabernet Sauvignon wines. *European Food Research and Technology*, 228(5), 777–788. <https://doi.org/10.1007/s00217-008-0989-5>

- Giribaldi, M., Hartung, W., & Schubert, A. (2010). The effects of abscisic acid on grape berry ripening are affected by the timing of treatment. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 9–15.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. Ire partie : les équilibres des anthocyanes et des tanins. *OENO One*, 18(3), 195–217. <https://doi.org/10.20870/oenone.1984.18.3.1751>
- Goddard, M. R., Anfang, N., Tang, R., Gardner, R. C., & Jun, C. (2010). A distinct population of *Saccharomyces cerevisiae* in New Zealand: Evidence for local dispersal by insects and human-aided global dispersal in oak barrels. *Environmental Microbiology*, 12(1), 63–73. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02035.x>
- Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Teresa Escribano-Bailón, M., Heredia, F. J., & Santos-Buelga, C. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(15), 5422–5429. <https://doi.org/10.1021/jf0604586>
- Gomez-Plaza, E., Bautista-Ortín, A. B., & Gil-Muñoz, R. (2018). Bioquímica y aptitud enológica de Monastrell. In A. Martínez-Cutillas & F. Riquelme (Eds.), *El Libro de la Monastrell* (pp. 121–143). Cofradía del Vino Reino de la Monastrell.
- Gómez-Plaza, E., Bautista-Ortín, A. B., Ruiz-García, Y., Fernández-Fernández, J. I., & Gil-Muñoz, R. (2017). Effect of elicitors on the evolution of grape phenolic compounds during the ripening period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97, 977–983. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7823>
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., & Fernández-Fernández, J. I. (2001). Phenolic compounds and color stability of red wines: Effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(3), 266–270. <https://doi.org/10.4066/AMJ.2012.1352>
- Gómez-Plaza, E., Mestre-Ortuño, L., Ruiz-García, Y., Fernández-Fernández, J. I., & López-Roca, J. M. (2012). Effect of benzothiadiazole and methyl jasmonate on the volatile compound composition of *Vitis vinifera* L. Monastrell grapes and wines.

- American Journal of Enology and Viticulture*, 63(3), 394–401.
<https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12011>
- Gonçalves, F., Fernandes, C., & De Pinho, M. N. (2001). White wine clarification by micro/ultrafiltration: Effect of removed colloids in tartaric stability. *Separation and Purification Technology*, 22–23, 423–429. [https://doi.org/10.1016/S1383-5866\(00\)00179-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5866(00)00179-9)
- Goulao, L. F., Fernandes, J. C., Lopes, P., & Amâncio, S. (2012). Tackling the cell wall of the grape berry. In H. Gerós, M. M. Chaves, & S. Delrot (Eds.), *The Biochemistry of the Grape Berry* (pp. 172–193). Bentham Science Publishers Ltd.
- Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2007). Polysaccharide profile and content during the vinification and aging of Tempranillo red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(26), 10720–10728. <https://doi.org/10.1021/jf0716782>
- Guadalupe, Z., Palacios, A., & Ayestarán, B. (2007). Maceration enzymes and mannoproteins: A possible strategy to increase colloidal stability and color extraction in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(12), 4854–4862. <https://doi.org/10.1021/jf063585a>
- Guilloux-Benatier, M., Guerreau, J., & Feuillat, M. (1995). Influence of initial colloid content on yeast macromolecule production and on the metabolism of wine microorganisms. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(4), 486–492. <http://www.ajevonline.org/content/46/4/486.abstract>
- Guilloux-Benatier, Michele, & Chassagne, D. (2003). Comparison of components released by fermented or active dried yeasts after aging on lees in a model wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(3), 746–751. <https://doi.org/10.1021/jf020135j>
- Gutiérrez-Gamboa, G., Pérez-Álvarez, E. P., Rubio-Bretón, P., & Garde-Cerdán, T. (2019). Changes on grape volatile composition through elicitation with methyl jasmonate, chitosan, and a yeast extract in Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grapevines. *Scientia Horticulturae*, 244, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.063>

- Gutiérrez-Gamboa, G., Portu, J., Santamaría, P., López, R., & Garde-Cerdán, T. (2017). Effects on grape amino acid concentration through foliar application of three different elicitors. *Food Research International*, 99, 688–692. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.022>
- Hammond-Kosack, K. E., & Jones, J. D. G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell*, 8(10), 1773–1791. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.10.1773>
- Hanlin, R. L., & Downey, M. O. (2009). Condensed tannin accumulation and composition in skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon grapes during berry development. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60(1), 13–23.
- Hanlin, R. L., Hrmova, M., Harbertson, J. F., & Downey, M. O. (2010). Review: Condensed tannin and grape cell wall interactions and their impact on tannin extractability into wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 173–188. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00068.x>
- Harbertson, J. F., Hodgins, R. E., Thurston, L. N., Schaffer, L. J., Reid, M. S., Landon, J. L., Ross, C. F., & Adams, D. O. (2008). Variability of tannin concentration in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(2), 210–214.
- He, F., He, J. J., Pan, Q. H., & Duan, C. Q. (2010). Mass-spectrometry evidence confirming the presence of pelargonidin-3-O-glucoside in the berry skins of Cabernet Sauvignon and Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(3), 464–468. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2010.00107.x>
- He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2012a). Anthocyanins and their variation in red wines I. Monomeric anthocyanins and their color expression. *Molecules*, 17(2), 1571–1601. <https://doi.org/10.3390/molecules17021571>
- He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2012b). Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and

- their color evolution. *Molecules*, *17*(2), 1483–1519. <https://doi.org/10.3390/molecules17021483>
- He, F., Mu, L., Yan, G. L., Liang, N. N., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. Q. (2010). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*, *15*(12), 9057–9091. <https://doi.org/10.3390/molecules15129057>
- Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2005). Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *11*(2), 205–214. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00288.x>
- Heredia, F. J., Escudero-Gilete, M. L., Hernanz, D., Gordillo, B., Meléndez-Martínez, A. J., Vicario, I. M., & González-Miret, M. L. (2010). Influence of the refrigeration technique on the colour and phenolic composition of syrah red wines obtained by pre-fermentative cold maceration. *Food Chemistry*, *118*(2), 377–383. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.132>
- Hermosín-Gutiérrez, I. (2003). Influence of ethanol content on the extent of copigmentation in a Cencibel young red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(14), 4079–4083. <https://doi.org/10.1021/jf021029k>
- Hernández-Hierro, J. M., Quijada-Morín, N., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. *Food Chemistry*, *146*, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.037>
- Hernández-Jiménez, A., Gómez-Plaza, E., Martínez-Cutillas, A., & Kennedy, J. A. (2009). Grape skin and seed proanthocyanidins from Monastrell × Syrah grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(22), 10798–10803. <https://doi.org/10.1021/jf903465p>
- Hidalgo, J. (2018). Fenómenos prefermentativos. Transformaciones enzimáticas en vendimias y vinos. In *Tratado de Enología (Vol 1)* (3ª, pp. 463–500). Mundi-Prensa.
- Hilz, H. (2007). *Characterisation of cell wall polysaccharides in bilberries and black*

- currants*. (Tesis doctoral) Universidad de Wageningen. Países Bajos.
- Holt, H. E., Francis, I. L., Field, J., Herderich, M. J., & Iland, P. G. (2008). Relationships between berry size, berry phenolic composition and wine quality scores for Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) from different pruning treatments and different vintages. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *14*(3), 191–202. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00019.x>
- Howell, G. S. (2001). Sustainable grape productivity and the growth-yield relationship: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, *52*(3), 165–174.
- Huang, X. M., Huang, H. B., & Wang, H. C. (2005). Cell walls of loosening skin in post-veraison grape berries lose structural polysaccharides and calcium while accumulate structural proteins. *Scientia Horticulturae*, *104*(3), 249–263. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.09.002>
- Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(4), 1376–1386. <https://doi.org/10.1021/jf073031n>
- Iriti, M., & Faoro, F. (2003). Benzothiadiazole (BTH) induces cell-death independent resistance in *Phaseolus vulgaris* against *Uromyces appendiculatus*. *Journal of Phytopathology*, *151*(3), 171–180. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00700.x>
- Iriti, M., Rabotti, G., De Ascensao, A., & Faoro, F. (2003). Benzothiadiazole-induced resistance modulates ozone tolerance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(15), 4308–4314. <https://doi.org/10.1021/jf034308w>
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., & Faoro, F. (2004). Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(14), 4406–4413. <https://doi.org/10.1021/jf049487b>
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., Ferrara, L., & Faoro, F. (2005). Induction of resistance to gray mold with benzothiadiazole modifies amino acid profile and increases

- proanthocyanidins in grape: Primary versus secondary metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 9133–9139. <https://doi.org/10.1021/jf050853g>
- Jackson, R. S. (2008). *Wine science: Principles and applications* (3rd ed.). Elsevier Inc.
- Jackson, R. S. (2009). *Wine tasting: A professional handbook* (2nd ed.). Elsevier Inc.
- Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., & Adrian, M. (2002). Phytoalexins from the vitaceae: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(10), 2731–2741. <https://doi.org/10.1021/jf011429s>
- Jeong, S. T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S., & Esaka, M. (2004). Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Science*, 167(2), 247–252. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2004.03.021>
- Jiménez-Martínez, M. D. (2018). *Posibilidades tecnológicas de las paredes celulares de los orujos de uva como agentes afinantes durante la vinificación*. (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia. Murcia-España.
- John, M., Röhring, H., Schmidt, J., Richard, & Schell, J. (1997). Cell signalling by oligosaccharides. *Trends in Plant Science*, 2(3), 111–115. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01005-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01005-4)
- Joutei, K., Glories, Y., & Mercier, M. (1994). Localisation des tanins dans la pellicule de baie de raisin. *Vitis*, 138, 133–138. <http://www.vitis-vea.de/admin/volltext/e034424.pdf>
- Keestra, K. (2010). Plant cell walls. *Plant Physiology*, 154(2), 483–486. <https://doi.org/10.1104/pp.110.161240>
- Keen, N. T. (1975). Specific elicitors of plant phytoalexin production: Determinants of race specificity in pathogens? *Science*, 187(4171), 74–75. <https://doi.org/10.1126/science.187.4171.74>

- Keller, M., & Torres-Martinez, N. (2004). Does UV radiation affect winegrape composition? *Acta Horticulturae*, 640, 313–319. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.640.36>
- Kennedy, J. A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E. J., & Jones, G. P. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5348–5355. <https://doi.org/10.1021/jf010758h>
- Kennedy, J. A., Matthews, M. A., & Waterhouse, A. L. (2000). Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, 55(1), 77–85. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00196-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00196-5)
- Kennedy, J. A., & Taylor, A. W. (2003). Analysis of proanthocyanidins by high-performance gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography A*, 995(1–2), 99–107. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00420-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00420-5)
- Klarzynski, O., & Fritig, B. (2001). Stimulation of plant defense responses. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III*, 324(10), 953–963. [https://doi.org/10.1016/S0764-4469\(01\)01371-3](https://doi.org/10.1016/S0764-4469(01)01371-3)
- Kliewer, W. M. (1970). Effect of day temperature and light intensity on coloration of *Vitis vinifera* L. grapes. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, 95, 693–697.
- Kliewer, W. M. (1977). Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of Emperor grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(2), 96–103.
- Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. J. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 23(3), 185–202. <https://doi.org/10.1002/yea.1349>
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., & Brul, S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 239–256. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x>

- Koyama, K., Goto-Yamamoto, N., & Hashizume, K. (2007). Influence of maceration temperature in red wine vinification on extraction of phenolics from berry skins and seeds of grape (*Vitis vinifera*). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(4), 958–965. <https://doi.org/10.1271/bbb.60628>
- Koyama, K., Ikeda, H., Poudel, P. R., & Goto-Yamamoto, N. (2012). Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. *Phytochemistry*, 78, 54–64. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.02.026>
- Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., & Mérillon, J. M. (1999). Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: Methyl jasmonate induction and ¹³C biolabeling. *Journal of Natural Products*, 62(12), 1688–1690. <https://doi.org/10.1021/np990239x>
- Kunz, W., Schurter, R., & Maetzke, T. (1997). The chemistry of benzothiadiazole plant activators. *Pesticide Science*, 50(4), 275–282. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9063\(199708\)50:4<275::AID-PS593>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9063(199708)50:4<275::AID-PS593>3.0.CO;2-7)
- Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J. M., & Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2719–2723. <https://doi.org/10.1021/jf990029q>
- Larronde, F., Gaudillère, J. P., Krisa, S., Decendit, A., Deffieux, G., & Mérillon, J. M. (2003). Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in leaves and berries of grapevine plants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54(1), 63–66.
- Lasanta, C. (2009). *Estudio y aplicación de nuevos procesos para la mejora de la elaboración de vinos tintos en zonas cálidas*. (Tesis Doctoral). Universidad de Cádiz. Cádiz-España.
- Lau, J. M., McNeil, M., Darvill, A. G., & Albersheim, P. (1985). Structure of the backbone of rhamnogalacturonan I, a pectic polysaccharide in the primary cell walls of plants. *Carbohydrate Research*, 137(C), 111–125. <https://doi.org/10.1016/0008->

6215(85)85153-3

- Lecas, M., & Brillouet, J. M. (1994). Cell wall composition of grape berry skins. *Phytochemistry*, *35*(5), 1241–1243. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94828-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94828-3)
- Lee, J., & Skinkis, P. A. (2013). Oregon “Pinot noir” grape anthocyanin enhancement by early leaf removal. *Food Chemistry*, *139*(1–4), 893–901. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.022>
- Levengood, J., & Boulton, R. (2004). The variation in the color due to copigmentation in young Cabernet Sauvignon wines. *ACS Symposium Series*, *886*, 35–52. <https://doi.org/10.1021/bk-2004-0886.ch004>
- Lin, J., Gong, D., Zhu, S., Zhang, L., & Zhang, L. (2011). Expression of PPO and POD genes and contents of polyphenolic compounds in harvested mango fruits in relation to Benzothiadiazole-induced defense against anthracnose. *Scientia Horticulturae*, *130*(1), 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.06.014>
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y., & Luo, Y. (2005). Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology*, *35*(3), 263–269. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.08.006>
- Lopez-Alfaro, I., Gonzalez-Arenzana, L., Lopez, N., Santamaria, P., Lopez, R., & Garder-Cerdán, T. (2013). Pulsed electric field treatment enhanced stilbene content in Graciano, Tempranillo and Grenache grape varieties. *Food Chemistry*, *141*(4), 3759–3765. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.06.082>
- Majewska-Sawka, A., & Nothnagel, E. A. (2000). The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiology*, *122*(1), 3–9. <https://doi.org/10.1104/pp.122.1.3>
- Martínez-Cutillas, A., Ruíz-García, L., & Fernández-Fernández, J. I. (2018). Material vegetal de Monastrell. In A. Martínez-Cutillas & F. Riquelme (Eds.), *El Libro de la Monastrell* (pp. 45–70). Cofradía del Vino Reino de la Monastrell.

- Martínez-Lapuente, L., Apolinar-Valiente, R., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Pérez-Magariño, S., Williams, P., & Doco, T. (2018). Polysaccharides, oligosaccharides and nitrogenous compounds change during the ageing of Tempranillo and Verdejo sparkling wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(1), 291–303. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8470>
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Ortega-Heras, M., & Pérez-Magariño, S. (2013). Changes in polysaccharide composition during sparkling wine making and aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12362–12373. <https://doi.org/10.1021/jf403059p>
- Martínez-Pinilla, O., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., & Ayestarán, B. (2012). Sensory profiling and changes in colour and phenolic composition produced by malolactic fermentation in red minority varieties. *Food Research International*, 46(1), 286–293. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.030>
- Martínez de Toda, F. (2014). *Viticultura de calidad: factores que afectan al contenido de compuestos fenólicos*. ACE: Revista de Enología. http://www.acenologia.com/ciencia59_1.htm
- Matić, I., Žižak, Ž., Simonović, M., Simonović, B., Gocrossed D Signevac, D., Šavikin, K., & Juranić, Z. (2010). Cytotoxic effect of wine polyphenolic extracts and resveratrol against human carcinoma cells and normal peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Medicinal Food*, 13(4), 851–862. <https://doi.org/10.1089/jmf.2009.0193>
- Matsushima, J., Hiratsuka, S., Taniguchi, N., Wada, R., & Suzaki, N. (1989). Anthocyanin accumulation and sugar content in the skin of grape cultivar Olympia treated with ABA. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 58(3), 551–556.
- Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D., & Trainotti, D. (2009). Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15(1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00027.x>

- Mattivi, Fulvio. (2006). Gli indici di maturazione delle uve e la loro importanza. *Quaderni della Scuola di Specializzazione in Viticoltura ed Enologia*, 28, 27–40.
- Mazza, G. (1995). Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 35(4), 341–371. <https://doi.org/10.1080/10408399509527704>
- McNeil, M. (1984). Structure and function of the primary cell walls of plants. *Annual Review of Biochemistry*, 53(1), 625–663. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.53.1.625>
- McRae, J. M., Teng, B., & Bindon, K. (2018). Factors influencing red wine color from the grape to the glass. In *Reference Module in Food Science*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21655-7>
- Memelink, J., Verpoorte, R., & Kijne, J. W. (2001). ORCAnization of jasmonate-responsive gene expression in alkaloid metabolism. *Trends in Plant Science*, 6(5), 212–219. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(01\)01924-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(01)01924-0)
- Milanović, V., Comitini, F., & Ciani, M. (2013). Grape berry yeast communities: Influence of fungicide treatments. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.12.019>
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, 43(7), 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
- Molitor, D., Behr, M., Hoffmann, L., & Evers, D. (2012). Impact of grape cluster division on cluster morphology and bunch rot epidemic. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63(4), 508–514. <https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12041>
- Morata, A., Loira, I., Vejarano, R., González, C., Callejo, M. J., & Suárez-Lepe, J. A. (2017). Emerging preservation technologies in grapes for winemaking. *Trends in Food Science and Technology*, 67, 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.06.014>
- Moreno-Escamilla, J. O., Alvarez-Parrilla, E., de la Rosa, L. A., Núñez-Gastélum, J. A.,

- González-Aguilar, G. A., & Rodrigo-García, J. (2018). Effect of elicitors in the nutritional and sensorial quality of fruits and vegetables. In *Preharvest Modulation of Postharvest Fruit and Vegetable Quality* (pp. 71–91). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809807-3.00003-2>
- Moreno-Pérez, A. A. (2013). *Técnicas enológicas de frío y enzimáticas aplicadas a la extractabilidad de Syrah, Cabernet Sauvignon y Monastrell*. (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia. Murcia-España.
- Moreno-Pérez, A. A., Fernández-Fernández, J. I., Bautista-Ortín, A. B., Gómez-Plaza, E., Martínez-Cutillas, A., & Gil-Muñoz, R. (2013). Influence of winemaking techniques on proanthocyanidin extraction in Monastrell wines from four different areas. *European Food Research and Technology*, 236(3), 473–481. <https://doi.org/10.1007/s00217-012-1899-0>
- Morrison, J. C., & Noble, A. C. (1990). The effects of leaf and cluster shading on the composition of Cabernet Sauvignon grapes and on fruit and wine sensory properties. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 193–200.
- Mueller-Harvey, I., Hartley, R. D., Harris, P. J., & Curzon, E. H. (1986). Linkage of p-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. *Carbohydrate Research*, 148(1), 71–85. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(86\)80038-6](https://doi.org/10.1016/0008-6215(86)80038-6)
- Namdeo., A. (2007). Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: A Review. *Review Literature and Arts of the Americas*, 1(1), 69–79.
- Nogales-Bueno, J. (2017). *Estudio del estado de madurez y la aptitud enológica en uva mediante análisis de imagen hiperespectral*. (Tesis Doctoral). Universidad de Sevilla. Sevilla-España.
- Nunan, K. J., Sims, I. M., Bacic, A., Robinson, S. P., & Fincher, G. B. (1997). Isolation and characterization of cell walls from the mesocarp of mature grape berries (*Vitis vinifera*). *Planta*, 203(1), 93–100. <https://doi.org/10.1007/s004250050169>
- Núñez-Delicado, E., Sánchez-Ferrer, A., García-Carmona, F. F., & López-Nicolás, J. M.

- (2005). Effect of organic farming practices on the level of latent polyphenol oxidase in grapes. *Journal of Food Science*, 70(1), C74–C78. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.tb09024.x>
- O'Donnell, P. J., Schmelz, E., Block, A., Miersch, O., Wasternack, C., Jones, J. B., & Klee, H. J. (2003). Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response. *Plant Physiology*, 133(3), 1181–1189. <https://doi.org/10.1104/pp.103.030379>
- O'Neill, M. A., & York, W. S. (2018). The composition and structure of plant primary cell walls. In *Annual Plant Reviews online* (pp. 1–54). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0067>
- OIV. (2018). Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. In OIV (Ed.), *INTERNATIONAL ŒNOLOGICAL CODEX*.
- OIV-OENO 616. (2019). *Tratamiento de las uvas estrujadas con ultrasonidos para favorecer la extracción de compuestos*.
- Oliva, J., Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A. M., Rosario Salinas, M., & Barba, A. (2011). Fungicide effects on ammonium and amino acids of Monastrell grapes. *Food Chemistry*, 129(4), 1676–1680. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.030>
- 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 Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 44(6), 546–552. <https://doi.org/10.1080/03601230902997758>
- Oliva, J., Navarro, S., Barba, A., Navarro, G., & Salinas, M. R. (1999). Effect of pesticide residues on the aromatic composition of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(7), 2830–2836. <https://doi.org/10.1021/jf9813135>
- Oliva, J., Payá, P., & Barba, A. (2010). Influence of fungicide residues in wine quality. In *Fungicides*. InTech. <https://doi.org/10.5772/13174>
- Opie, L. H., & Lecour, S. (2007). The red wine hypothesis: From concepts to protective signalling molecules. *European Heart Journal*, 28(14), 1683–1693.

<https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehm149>

- Ordaz-Ortiz, J. J., Marcus, S. E., & Paul Knox, J. (2009). Cell wall microstructure analysis implicates hemicellulose polysaccharides in cell adhesion in tomato fruit pericarp parenchyma. *Molecular Plant*, 2(5), 910–921. <https://doi.org/10.1093/mp/ssp049>
- Ortega-Regules, A. (2006). *Antocianos, taninos y composición de la pared celular en distintas variedades de uva. Evolución durante la maduración e implicaciones tecnológicas*. (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia. Murcia-España.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2 SPEC. ISS.), 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.024>
- Ortega-Regules, A., Ros-García, J. M., Bautista-Ortín, A. B., López-Roca, J. M., & Gomez-Plaza, E. (2008). Changes in skin cell wall composition during the maturation of four premium wine grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88, 420–428. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3102>
- Ortega-Regules, A., Ros-García, J. M., Bautista-Ortín, A. B., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2008). Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.): Technological implications. *European Food Research and Technology*, 227(1), 223–231. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0714-9>
- Osete-Alcaraz, A., Bautista-Ortín, A. B., Ortega-Regules, A. E., & Gómez-Plaza, E. (2019). Combined use of pectolytic enzymes and ultrasounds for improving the extraction of phenolic compounds during vinification. *Food and Bioprocess Technology*, 12(8), 1330–1339. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02303-0>
- Ough, C., & Nagaoka, R. (1984). Effect of cluster thinning and vineyard yields on grape and wine composition and wine quality of Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35(1), 30–34.
- Paixão, N., Pereira, V., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2008). Quantification of

- polyphenols with potential antioxidant properties in wines using reverse phase HPLC. *Journal of Separation Science*, 31(12), 2189–2198. <https://doi.org/10.1002/jssc.200800021>
- Paladines-Quezada, D. F., Moreno-Olivares, J. D., Fernández-Fernández, J. I., Bautista-Ortín, A. B., & Gil-Muñoz, R. (2019). Influence of methyl jasmonate and benzothiadiazole on the composition of grape skin cell walls and wines. *Food Chemistry*, 277, 691–697. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.029>
- Paladines-Quezada, D. F., Moreno-Olivares, J. D., Fernández-Fernández, J. I., Bleda-Sánchez, J. A., Martínez-Moreno, A., & Gil-Muñoz, R. (2019). Elicitors and pre-fermentative cold maceration: Effects on polyphenol concentration in Monastrell grapes and wines. *Biomolecules*, 9(11 (671)). <https://doi.org/10.3390/biom9110671>
- Parenti, A., Spugnoli, P., Calamai, L., Ferrari, S., & Gori, C. (2004). Effects of cold maceration on red wine quality from Tuscan Sangiovese grape. *European Food Research and Technology*, 218(4), 360–366. <https://doi.org/10.1007/s00217-003-0866-1>
- Pastor del Rio, J. L., & Kennedy, J. A. (2006). Development of proanthocyanidins in *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir grapes and extraction into wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(2), 125–132.
- Pearce, G., Moura, D. S., Stratmann, J., & Ryan, C. A. (2001). Production of multiple plant hormones from a single polyprotein precursor. *Nature*, 411(6839), 817–820. <https://doi.org/10.1038/35081107>
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., & Noble, A. C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1123–1128. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199906\)79:8<1123::AID-JSFA336>3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199906)79:8<1123::AID-JSFA336>3.0.CO;2-D)
- Pellerin, P., & Cabanis, J. C. (2000). Los glúcidos. In C. Flanzky (Ed.), *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos* (pp. 66–96). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa.

- Pellerin, P., Doco, T., Vidal, S., Williams, P., Brillouet, J., & O'Neill, M. (1996). Structural characterization of red wine rhamnogalacturonan II. *Carbohydrate Research*, 290, 183–197. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(96\)00139-5](https://doi.org/10.1016/0008-6215(96)00139-5)
- Pellerin, P., & O'Neill, M. A. (1998). The interaction of the pectic polysaccharide Rhamnogalacturonan II with heavy metals and lanthanides in wines and fruit juices. *Analisis*, 26(6), 32–36. <https://doi.org/10.1051/analisis:1998143>
- Pellerin, P., Vidal, S., Williams, P., & Brillouet, J. M. (1995). Characterization of five type II arabinogalactan-protein fractions from red wine of increasing uronic acid content. *Carbohydrate Research*, 277(1), 135–143. [https://doi.org/10.1016/0008-6215\(95\)00206-9](https://doi.org/10.1016/0008-6215(95)00206-9)
- Peppi, M. C., Fidelibus, M. W., & Dokoozlian, N. K. (2007). Timing and concentration of abscisic acid applications affect the quality of “Crimson seedless” grapes. *International Journal of Fruit Science*, 7(4), 71–83. <https://doi.org/10.1080/15538360802003324>
- Pereira, G. E., Gaudillere, J. P., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M., Deborde, C., Moing, A., & Rolin, D. (2006). Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(18), 6765–6775. <https://doi.org/10.1021/jf061013k>
- Pérez, S., Rodríguez-Carvajal, M. A., & Doco, T. (2003). A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85(1–2), 109–121. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(03\)00053-1](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00053-1)
- Petrie, P. R., Trought, M. C. T., & Howell, G. S. (2000). Fruit composition and ripening of Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.) in relation to leaf area. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(1), 46–51. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00161.x>
- Pinelo, M., Arnous, A., & Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science and Technology*, 17(11), 579–590.

<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2006.05.003>

- Poncet-Legrand, C., Doco, T., Williams, P., & Vernhet, A. (2007). Inhibition of grape seed tannin aggregation by wine mannoproteins: Effect of polysaccharide molecular weight. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58(1), 87–91.
- Portu, J. (2017). *Aplicación foliar de elicitores y compuestos nitrogenados como estrategia para mejorar la composición fenólica de la uva y del vino*. (Tesis Doctoral). Universidad de La Rioja. Logroño-España.
- Portu, López, R., Santamaría, P., & Garde-Cerdán, T. (2018). Methyl jasmonate treatment to increase grape and wine phenolic content in Tempranillo and Graciano varieties during two growing seasons. *Scientia Horticulturae*, 240, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.019>
- Portu, Santamaría, P., López-Alfaro, I., López, R., & Garde-Cerdán, T. (2015). Methyl jasmonate foliar application to tempranillo vineyard improved grape and wine phenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(8), 2328–2337. <https://doi.org/10.1021/jf5060672>
- Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1994). Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry*, 36(3), 781–784. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)89817-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)89817-9)
- Quijada-Morín, N., Williams, P., Rivas-Gonzalo, J. C., Doco, T., & Escribano-Bailón, M. T. (2014). Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry*, 154, 44–51. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.12.101>
- Quijada, N. (2014). *Influencia de la composición fenólica y polisacarídica en las características organolépticas de los vinos tintos*. (Tesis Doctoral). Universidad de Salamanca. Salamanca-España.
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(1), 91. <https://doi.org/10.1042/ba20020118>

- Ramakrishna, A., & Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior*, 6(11), 1720–1731. <https://doi.org/10.4161/psb.6.11.17613>
- Reinbothe, S., Mollenhauer, B., & Reinbothe, C. (1994). JIPs and RIPs: The regulation of plant gene expression by jasmonates in response to environmental cues and pathogens. *Plant Cell*, 6(9), 1197–1209. <https://doi.org/10.1105/tpc.6.9.1197>
- Rentzsch, M., Wilkens, A., & Winterhalter, P. (2009). Non-flavonoid phenolic compounds. In *Wine Chemistry and Biochemistry* (pp. 509–527). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_23
- Revilla, G., & Zarra, I. (2003). 1. Fisiología vegetal. Introducción a las células de las plantas: membranas y pared. In J. Azcón-Bieto & M. Talón (Eds.), *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (pp. 3–22).
- Reyero, J. R., Garijo, J., Pardo, F., & Salinas, M. R. (1999). Influencia del riego excesivo en la producción y en el contenido polifenólico de diferentes variedades viníferas. *Enólogos*, 3, 17–21.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., & Lonvaud, A. (2006). *Handbook of Enology: The microbiology of wine and vinifications* (2nd ed.). John Wiley & Sons, Ltd.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2003). Química del vino. Estabilización y tratamientos. In *Tratado de Enología (Vol 2)* (1ª). Hemisferio sur y ediciones Mundi-Prensa.
- Riou, V., Vernhet, A., Doco, T., & Moutounet, M. (2002). Aggregation of grape seed tannins in model wine-effect of wine polysaccharides. *Food Hydrocolloids*, 16, 17–23.
- Riu-Aumatell, M., López-Barajas, M., López-Tamames, E., & Buxaderas, S. (2002). Influence of yield and maturation index on polysaccharides and other compounds of grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(16), 4604–4607. <https://doi.org/10.1021/jf020035d>

- Roessler, E. B., Pangborn, R. M., Sidel, J. L., & Stone, H. (1978). Expanded statistical tables for estimating significance in paired—preference, paired—difference, duo—trio and triangle tests. *Journal of Food Science*, 43(3), 940–943. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1978.tb02458.x>
- Romero-Azorín, P., García-García, J., Fernández-Fernández, J. I., Gil-Muñoz, R., del Amor Saavedra, F., & Martínez-Cutillas, A. (2016). Improving berry and wine quality attributes and vineyard economic efficiency by long-term deficit irrigation practices under semiarid conditions. *Scientia Horticulturae*, 203, 69–85. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.03.013>
- Romero-Azorín, P., Gil-Muñoz, R., del Amor, F. M., Valdés, E., Fernández, J. I., & Martínez-Cutillas, A. (2013). Regulated deficit irrigation based upon optimum water status improves phenolic composition in Monastrell grapes and wines. *Agricultural Water Management*, 121, 85–101. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2013.01.007>
- Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., López-Roca, J. M., Fernández-Fernández, J. I., & Gómez-Plaza, E. (2005). Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56(3), 212–219. <https://doi.org/10.1088/0026-1394/51/5/L15>
- Romero-Cascales, Inmaculada. (2008). *Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de las enzimas de maceración*. (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia. Murcia-España.
- Ros, A., Pomar, F., López-Serrano, M., & Pedreño, M. A. (2003). Peroxidase: A multifunctional enzyme in grapevines. *Functional Plant Biology*, 30(6), 577–591. <https://doi.org/10.1071/FP02096>
- Rosi, I., & Giovani, G. (2003). Effect of some winemaking variables on the production of exopolysaccharides by *Saccharomyces cerevisiae*. In A. Lonvaud-Funel (Ed.), *7th International Symposium of Oenology* (pp. 324–328). TEC & DOC.
- Roubelakis-Angelakis, K. A., & Kliewer, W. M. (1986). Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total

- phenolics in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37(4), 275–280.
- Ruidavets, J. B., Teissedre, P. L., Ferrières, J., Carando, S., Bougard, G., & Cabanis, J. C. (2000). Catechin in the Mediterranean diet: Vegetable, fruit or wine? *Atherosclerosis*, 153(1), 107–117. [https://doi.org/10.1016/S0021-9150\(00\)00377-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9150(00)00377-4)
- Ruiz-García, Y. (2014). *Elicidores: una herramienta para incrementar el color y el aroma de uvas y vinos*. (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia. Murcia-España.
- Ruiz-García, Y., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., Martínez-Cutillas, A., Romero-Cascales, I., & Gómez-Plaza, E. (2013). Increasing the phenolic compound content of grapes by preharvest application of abscisic acid and a combination of methyl jasmonate and benzothiadiazole. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(16), 3978–3983. <https://doi.org/10.1021/jf400631m>
- Ruiz-García, Y., & Gómez-Plaza, E. (2013). Elicitors: A tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture*, 3(1), 33–52. <https://doi.org/10.3390/agriculture3010033>
- Ruiz-García, Y., Hernández-Jiménez, A., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J. M., Romero-Cascales, I., Martínez-Cutillas, A., & Gil-Muñoz, R. (2012). Application of BTH and methyl jasmonate during the ripening of grapes (*Vitis vinifera* L.) and its effects on the stilbene content: Preliminary results. *Acta Horticulturae*, 939, 397–402.
- Ruiz-García, Y., López-Roca, J. M., Bautista-Ortín, A. B., Gil-Muñoz, R., & Gómez-Plaza, E. (2014). Effect of combined use of benzothiadiazole and methyl jasmonate on volatile compounds of Monastrell wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65(2), 238–243. <https://doi.org/10.5344/ajev.2014.13119>
- Ruiz-García, Y., Romero-Cascales, I., Bautista-Ortín, A. B., Gil-Muñoz, R., Martínez-Cutillas, A., & Gómez-Plaza, E. (2013). Increasing bioactive phenolic compounds in grapes: Response of six Monastrell grape clones to benzothiadiazole and methyl jasmonate treatments. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64(4), 459–465. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13038>
- Ruiz-García, Y., Romero-Cascales, I., Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., López-

- Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2012). Improving grape phenolic content and wine chromatic characteristics through the use of two different elicitors: Methyl jasmonate versus benzothiadiazole. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 1283–1290. <https://doi.org/10.1021/jf204028d>
- Sacchi, K. L., Bisson, L. F., & Adams, D. O. (2005). A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, *56*(3), 197–206. <https://doi.org/10.1002/JSFA.2740670416>
- Sampaio, J. P., & Gonçalves, P. (2008). Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *74*(7), 2144–2152. <https://doi.org/10.1128/AEM.02396-07>
- Sánchez-Ferrer, A., Bru, R., Cabanes, J., & Garcia-Carmona, F. (1988). Characterization of catecholase and cresolase activities of monastrell grape polyphenol oxidase. *Phytochemistry*, *27*(2), 319–321. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)83089-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)83089-9)
- Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1999). Interactions of grape seed tannins with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(1), 42–47. <https://doi.org/10.1021/jf9805146>
- Saulnier, L., Mercereau, T., & Vezinhet, F. (1991). Mannoproteins from flocculating and non-flocculating *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *54*(2), 275–286. <https://doi.org/10.1002/jsfa.v54:2>
- Scarponi, L., Buonaurio, R., & Martinetti, L. (2001). Persistence and translocation of a benzothiadiazole derivative in tomato plants in relation to systemic acquired resistance against *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Pest Management Science*, *57*(3), 262–268. <https://doi.org/10.1002/ps.285>
- Schnitzler, J. P., Madlung, J., Rose, A., & Ulrich Seitz, H. (1992). Biosynthesis of p-hydroxybenzoic acid in elicitor-treated carrot cell cultures. *Planta*, *188*(4), 594–600. <https://doi.org/10.1007/BF00197054>
- Schreiner, M., Mewis, I., Huyskens-Keil, S., Jansen, M. A. K., Zrenner, R., Winkler, J.

- B., O'Brien, N., & Krumbein, A. (2012). UV-B-Induced secondary plant metabolites - potential benefits for plant and human health. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31(3), 229–240. <https://doi.org/10.1080/07352689.2012.664979>
- Schultz, H. R. (2000). Climate change and viticulture: A European perspective on climatology, carbon dioxide and UV-B effects. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(1), 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00156.x>
- Schwarz, M., Picazo-Bacete, J. J., Winterhalter, P., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2005). Effect of copigments and grape cultivar on the color of red wines fermented after the addition of copigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8372–8381. <https://doi.org/10.1021/jf051005o>
- Scott, R. W. (1979). Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Analytical Chemistry*, 51(7), 936–941. <https://doi.org/10.1021/ac50043a036>
- Serra, I., Merino, R., & Hidalgo, M. (2009). *Sistemas de conducción en vid. Incidencia en la producción y calidad del vino: Una revisión*. 25 (1), 41–48.
- Shahab, M., Roberto, S. R., Ahmed, S., Colombo, R. C., Silvestre, J. P., Koyama, R., & de Souza, R. T. (2020). Relationship between anthocyanins and skin color of table grapes treated with abscisic acid at different stages of berry ripening. *Scientia Horticulturae*, 259, 108859. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.108859>
- Shahab, M., Roberto, S. R., Ahmed, S., Colombo, R. C., Silvestre, J. P., Koyama, R., & De Souza, R. T. (2019). Anthocyanin accumulation and color development of 'Benitaka' table grape subjected to exogenous abscisic acid application at different timings of ripening. *Agronomy*, 9(4), 1–12. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040164>
- Showalter, A. M. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*, 5(1), 9–23. <https://doi.org/10.1105/tpc.5.1.9>
- SIAM. (2019). *Sistema de Información Agrario de Murcia*. <http://siam.imida.es/apex/f?p=101:46:5540041647757103>

- Singleton, V., Zaya, J., Trousdale, E., & Salgues, M. (1984). Caftaric acid in grapes and conversion to a reaction product during processing. *Vitis*, 23(2), 113–120. <https://doi.org/10.5073/VITIS.1984.23.113-120>
- Smart, R. E., Smith, S. M., & Winchester, R. V. (1988). Light quality and quantity effects on fruit ripening for Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39(3), 250–258.
- Smetanska, I. (2006). *Impact of elicitors on glucosinolate production in plants and exudates of turnip (Brassica rapa)*. (Tesis Doctoral). Technischen Universität Berlin.
- Soares, S. I., Gonçalves, R. M., Fernandes, I. V. A., Mateus, N., & De Freitas, V. (2009). Mechanistic approach by which polysaccharides inhibit α -amylase/ procyanidin aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4352–4358. <https://doi.org/10.1021/jf900302r>
- Souquet, J. M., Cheynier, V., Brossaud, F., & Moutounet, M. (1996). Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry*, 43(2), 509–512. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(96\)00301-9](https://doi.org/10.1016/0031-9422(96)00301-9)
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., & Tonelli, C. (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology*, 24(5), 743–755. <https://doi.org/10.1007/BF00029856>
- Spayd, S. E., Tarara, J. M., Mee, D. L., & Ferguson, J. C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 171–182.
- Sudha, G., & Ravishankar, G. A. (2003). Elicitation of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* and the involvement of methyl jasmonate and salicylic acid. *Acta Physiologiae Plantarum*, 25(3), 249–256. <https://doi.org/10.1007/s11738-003-0005-4>
- Sudraud, P. (1958). Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *Annales de*

Technologie Agricole, 7, 203–208.

- Tahiri, M., Pellerin, P., Tressol, J. C., Doco, T., Pépin, D., Rayssiguier, Y., & Coudray, C. (2000). The rhamnogalacturonan-II dimer decreases intestinal absorption and tissue accumulation of lead in rats. *The Journal of Nutrition*, 130(2), 249–253. <https://doi.org/10.1093/jn/130.2.249>
- Tassoni, A., Fornalè, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, A. J., Perry, B., & Bagni, N. (2005). Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytologist*, 166(3), 895–905. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2005.01383.x>
- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S. D., & Gerós, H. (2013). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711–18739. <https://doi.org/10.3390/ijms140918711>
- Thompson, J. E., & Stephen C, F. (2000). Evidence for covalent linkage between xyloglucan and acidic pectins in suspension-cultured rose cells. *Planta*, 211(2), 275–286. <https://doi.org/10.1007/s004250000287>
- Toepfl, S., Heinz, V., & Knorr, D. (2006). Applications of pulsed electric fields technology for the food industry. In *Food Engineering Series* (pp. 197–221). Springer. https://doi.org/10.1007/978-0-387-31122-7_7
- Tomlin, C. (2013). The Pesticide manual: a world compendium. In *Choice Reviews Online* (10th ed., Vol. 51, Issue 02). British Crop Protection Council. <https://doi.org/10.5860/choice.51-0896>
- Tran Thanh Van, K., Toubart, P., Cousson, A., Darvill, A. G., Gollin, D. J., Chelf, P., & Albersheim, P. (1985). Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. *Nature*, 314(6012), 615–617. <https://doi.org/10.1038/314615a0>
- Uzquiza, L. (2014). *Utilización de agentes de abscisión de la uva para optimizar la vendimia mecanizada*. (Tesis Doctoral). Universidad de Valladolid. Valladolid-España.

- Van Loon, L. C. (2000). Systemic induced resistance. In *Mechanisms of resistance to plant diseases* (pp. 521–574). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-3937-3_13
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., & Boerjan, W. (2010). Lignin biosynthesis and structure. *Plant Physiology*, *153*(3), 895–905. <https://doi.org/10.1104/pp.110.155119>
- Vernhet, A., Pellerin, P., Belleville, M. P., Planque, J., & Moutounet, M. (1999). Relative impact of major wine polysaccharides on the performances of an organic microfiltration membrane. *American Journal of Enology and Viticulture*, *50*(1), 51–56.
- Verries, C., Guiraud, J. L., Souquet, J. M., Vialet, S., Terrier, N., & Ollé, D. (2008). Validation of an extraction method on whole pericarp of grape berry (*Vitis vinifera* L. cv. Shiraz) to study biochemical and molecular aspects of flavan-3-ol synthesis during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(14), 5896–5904. <https://doi.org/10.1021/jf800028k>
- Vezzulli, S., Civardi, S., Ferrari, F., & Bavaresco, L. (2007). Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, *58*(4), 530–533.
- Vick, B. A., & Zimmerman, D. C. (1984). Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species. *Plant Physiology*, *75*(2), 458–461. <https://doi.org/10.1104/pp.75.2.458>
- Vidal, M., & Blouin, J. (1978). Dosage colorimétrique rapide de l'acide tartrique dans les moûts et les vins. *Revue Française d'Œnologie*, *16*, 39–46.
- Vidal, S., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2000). Soluble polysaccharide content at initial time of experimental must preparation. *American Journal of Enology and Viticulture*, *51*(2), 115–121. <https://www.ajevonline.org/content/51/2/115>
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and*

- Agriculture*, 83(6), 564–573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1394>
- Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*, 85(4), 519–525. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00084-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00084-0)
- Vidal, S., Williams, P., Doco, T., Moutounet, M., & Pellerin, P. (2003). The polysaccharides of red wine: Total fractionation and characterization. *Carbohydrate Polymers*, 54(4), 439–447. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00152-8](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00152-8)
- Vidal, S., Williams, P., O'Neill, M. A., & Pellerin, P. (2001). Polysaccharides from grape berry cell walls. Part I: Tissue distribution and structural characterization of the pectic polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 45(4), 315–323. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00285-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00285-X)
- Vivar-Quintana, A. M., Santos-Buelga, C., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2002). Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 147–155. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01619-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01619-1)
- Vivas de Gaulejac, N., Vivas, N., Guerra, C., & Nonier, M. (2001). Anthocyanin in grape skins during the maturation of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and Merlot Noir from different Bordeaux terroirs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 35, 149–156.
- Vorobiev, E., & Lebovka, N. (2010). Enhanced extraction from solid foods and biosuspensions by pulsed electrical energy. *Food Engineering Reviews*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1007/s12393-010-9021-5>
- Wang, X., Tong, H., Chen, F., & Gangemi, J. D. (2010). Chemical characterization and antioxidant evaluation of muscadine grape pomace extract. *Food Chemistry*, 123(4), 1156–1162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.080>
- Waters, E. J., Pellerin, P., & Brillouet, J. M. (1994). A *Saccharomyces mannoprotein* that protects wine from protein haze. *Carbohydrate Polymers*, 23(3), 185–191. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(94\)90101-5](https://doi.org/10.1016/0144-8617(94)90101-5)

- Waters, E., Pellerin, P., & Brillouet, J. M. (1994). A wine arabinogalactan-protein that reduces heat-induced wine protein haze. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(1), 43–48. <https://doi.org/10.1271/bbb.58.43>
- Winterhalter, P., Kuhnert, S., & Ewald, P. (2015). Bioactives from side streams of wine processing. In *ACS Symposium Series* (Vol. 1203, pp. 337–345). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/bk-2015-1203.ch021>
- Yamamoto, L. Y., Koyama, R., De Assis, A. M., Borges, W. F. S., De Oliveira, I. R., & Roberto, S. R. (2015). Color of berry and juice of “Isabel” grape treated with abscisic acid in different ripening stages. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 50(12), 1160–1167. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2015001200005>
- Yamane, T., Jeong, S. T., Goto-Yamamoto, N., Koshita, Y., & Kobayashi, S. (2006). Effects of temperature on anthocyanin biosynthesis in grape berry skins. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 54–59.
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos* (1ª, pp. 1–225). AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa.
- Zhu, S., & Ma, B. (2007). Benzothiadiazole-or methyl jasmonate-induced resistance to *Colletotrichum musae* in harvested banana fruit is related to elevated defense enzyme activities. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 82(4), 500–506. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512265>
- Zhu, X., Cao, J., Wang, Q., & Jiang, W. (2008). Postharvest infiltration of BTH reduces infection of mango fruits (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) by *Colletotrichum gloeosporioides* and enhances resistance inducing compounds. *Journal of Phytopathology*, 156(2), 68–74. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01320.x>
- Zietsman, A. J. J., Moore, J. P., Fangel, J. U., Willats, W. G. T., Trygg, J., & Vivier, M. A. (2015). Following the compositional changes of fresh grape skin cell walls during the fermentation process in the presence and absence of maceration enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(10), 2798–2810. <https://doi.org/10.1021/jf505200m>