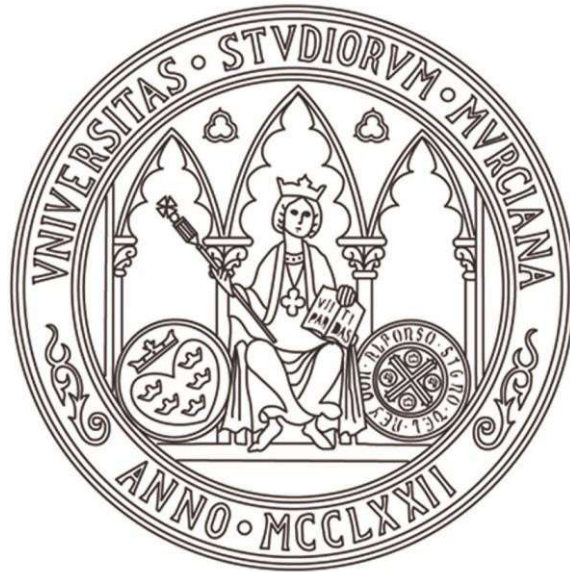




UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Uso de nanoformulaciones para un cultivo más sostenible y de
calidad de la variedad Monastrell.

D.^a María José Giménez Bañón
2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

Uso de nanoformulaciones para un cultivo más sostenible y de calidad
de la variedad Monastrell

Autor: D.^a María José Giménez Bañón

Director/es: D.^a Rocío Gil Muñoz



**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. María José Giménez Bañón

doctorando del Programa de Doctorado en

Tecnología de los alimentos, nutrición y bromatología

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

Uso de nanoformulaciones para un cultivo más sostenible y de calidad de la variedad Monastrell

y dirigida por,

D./Dña. Rocío Gil Muñoz

D./Dña.

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Si la tesis hubiera sido autorizada como tesis por compendio de publicaciones o incluyese 1 o 2 publicaciones (como prevé el artículo 29.8 del reglamento), declarar que cuenta con:

- La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 15 de septiembre de 2023

Fdo.: María José Giménez Bañón

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor

Información básica sobre protección de sus datos personales aportados	
Responsable:	Universidad de Murcia. Avenida teniente Flomesta, 5. Edificio de la Convalecencia. 30003; Murcia. Delegado de Protección de Datos: dpd@um.es
Legitimación:	La Universidad de Murcia se encuentra legitimada para el tratamiento de sus datos por ser necesario para el cumplimiento de una obligación legal aplicable al responsable del tratamiento. art. 6.1.c) del Reglamento General de Protección de Datos
Finalidad:	Gestionar su declaración de autoría y originalidad
Destinatarios:	No se prevén comunicaciones de datos
Derechos:	Los interesados pueden ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación, oposición, limitación del tratamiento, olvido y portabilidad a través del procedimiento establecido a tal efecto en el Registro Electrónico o mediante la presentación de la correspondiente solicitud en las Oficinas de Asistencia en Materia de Registro de la Universidad de Murcia

D^a Rocío Gil Muñoz, investigadora del Departamento de Desarrollo Rural, Enología y Agricultura Sostenible del Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental 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 **“Uso de nanoformulaciones para un cultivo más sostenible y de calidad de la variedad Monastrell”**, realizada por D^a. María José Giménez Bañón bajo mi tutela, y que presenta para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 7 de septiembre de 2023

Fdo. Rocío Gil Muñoz



Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental

Estación Enológica

Avda. Asunción N^o 24-30520 Jumilla (Murcia) Tel. y Fax. 968 75 75 80

|

La ejecución de esta Tesis Doctoral ha ha sido financiada por el Proyecto de
Investigación:

“NANOFERTILIZANTES DOPADOS CON UREA Y JASMONATO DE METILO
PARA UNA VITICULTURA SOSTENIBLE Y MAS EFICIENTE”

subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad, con número de
referencia RTI2018-095794-B-C21.

AGRADECIMIENTOS

Parece que fue ayer y ya han pasado más de 4 años desde que aterrice en la Enológica, de vuelta a los orígenes era lo que me rondaba la cabeza por aquellos días. En aquellos momentos la verdad que no tenía previsto el “complicarme la vida” con un Doctorado, pero cuando surgió la oportunidad, la verdad que no lo pensé. Quiero agradecer a la Dra. Rocío Gil Muñoz el haberme dado esta oportunidad y ayudarme a completar mi formación en el mundo de la investigación. He de decir que también ha sido exigente y cuando ha tenido que corregirme lo ha hecho sin recato....ya me lo dijo Juanda cuando estaba con el primer artículo....no te asustes cuando te lo devuelva Rocío....va a estar todo en rojo. Gracias Rocío, por ser exigente cuando ha sido necesario y también por ser flexible cuando las cosas no han salido a la primera. Me alegro de haberte tenido como directora. Éste ha sido un trabajo duro, con muchas horas, tuyas y mías, y por fin hemos conseguido llegar a buen puerto.

Que voy a decir de mis compañeros de la Enológica....al final somos como un reloj, cada uno conforma una parte del engranaje para que todo funcione. Juan Antonio, Juan Corredor, Seve y David, siempre dispuestos a ayudarnos con las analíticas de los vinos y soportando nuestros asaltos con las catas..... No puedo olvidarme de Maika, aunque ya no este por aquí, los desayunos ya no son lo mismo, nos faltan sus risas.

José Ignacio, hombre sabio, que siempre tiene la respuesta y la solución a todo, muchas gracias por enseñarme cosas cada día. Cayetano, el “jefe de la bodega” aunque el diga que no, y también un poco MacGyber, con tus soluciones ingeniosas a los pequeños problemas técnicos.

Juanda, mi hermanico pequeño en la Enológica y compañero de batallas. Y Ana, esa gran ayuda cuantificadora....no nos abandones por la oficina, te necesitamos. Tampoco quiero olvidarme de Diego, aunque ahora mismo ande por tierras riojanas.

Y como no, muchas gracias a mi familia, a mi madre, hermana y hermano que siempre han estado ahí, en todo momento para ayudarme cuando lo he necesitado. A mis hijas, que son dos soles y han tenido que “aguantar” los días encerradas en casa porque mamá tenía que escribir....os debo unas vacaciones. Y por último, gracias Juan, por haber llegado cuando mi vida estaba patas arriba, por estar ahí y disculparme por haberte “abandonado por la ciencia” tantas veces durante el último año.

Quiero dedicar esta Tesis a mi madre, **Ramona Bañón Santa**.

Por haber sido la persona más fuerte del mundo.

INDICE

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. JUSTIFICACION	2
1.2. OBJETIVOS	4
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1. LA VARIEDAD MONASTRELL EN LA REGIÓN DE MURCIA	6
2.2.1. LA PARED CELULAR	8
2.2.1.1. Estructura de la pared celular	8
2.2.1.2. Composición de la pared celular	10
2.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS	12
2.2.2.1. Antocianos	13
2.2.2.2. Estilbenos	16
2.2.2.3. Proantocianidinas	14
2.2.3. COMPOSICIÓN NITROGENADA	17
2.3. ESTRATEGIAS VITÍCOLAS PARA INCREMENTAR LA CALIDAD DE LA UVA Y EL VINO	19
2.3.1. APLICACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS EN EL VIÑEDO	20
2.3.1.1. Modos de aplicación	21
2.3.1.2. Tipos de compuestos nitrogenados	25
2.3.1.3. Urea	28
2.3.2. APLICACIÓN DE ELICITORES EN EL VIÑEDO	29
2.3.2.1. Modo de actuación de los elicitores	30
2.3.2.2. Tipos de elicitores	31
2.3.2.3. Metil jasmonato	35
2.4. NANOTECNOLOGÍA	37
2.4.1. NANOTECNOLOGÍA EN AGRICULTURA	39
2.4.2. APLICACIÓN DE NANOPARTÍCULAS EN EL VIÑEDO	41

3. MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL	46
3.2. MATERIAL VEGETAL	46
3.3. UBICACIÓN DEL VIÑEDO Y CARACTERÍSTICAS EDAFOCLIMÁTICAS	46
3.3.1. UBICACIÓN DEL VIÑEDO	46
3.3.2. CARACTERÍSTICAS EDAFOLÓGICAS	46
3.3.3. DATOS CLIMATOLÓGICOS	47
3.4. CONTROL DE MADURACIÓN DE LA UVA	49
3.5. TRATAMIENTOS	49
3.5.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS	49
3.5.1.1. Síntesis de nanopartículas con urea superficial (nano-urea)	49
3.5.1.2. Síntesis de nanopartículas con MeJ superficial (nano-MeJ)	50
3.5.2.. PREPARACIÓN Y APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS	50
3.6. DETERMINACIONES EN LAS UVAS	52
3.6.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS UVAS	52
3.6.1.1. Grado Baumé	52
3.6.1.2. pH	52
3.6.1.3. Acidez total	52
3.6.1.4. Acido tartárico	52
3.6.1.5. Acido L-málico	53
3.6.2. ANÁLISIS Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR DE LA PIEL	53
3.6.2.1. Aislamiento de paredes celulares	53
3.6.2.2. Análisis de los componentes de la pared celular	54
3.6.2.2.1. Proteínas	55
3.6.2.2.2. Compuestos fenólicos totales	56
3.6.2.2.3. Azúcares neutros	56
3.6.2.2.4. Ácidos urónicos	57
3.6.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN UVAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	57
3.6.3.1. Antocianos	57

3.6.3.2. Análisis de estilbenos	58
3.6.3.3. Proantocianidinas	60
3.6.4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN NITROGENADA DE LAS UVAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	62
3.7. VINIFICACIONES	64
3.8. DETERMINACIONES EN LOS VINOS	65
3.8.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LOS VINOS	65
3.8.1.1. Grado alcohólico	65
3.8.1.2. pH	66
3.8.1.3. Acidez total	66
3.8.1.4. Acidez volátil	66
3.8.1.5. Acido tartárico	66
3.8.1.6. Acido L-málico	66
3.8.2. PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE LOS VINOS	66
3.8.2.1. Índice de polifenoles totales	67
3.8.2.2. Intensidad de color y tono	67
3.8.2.3. Diferencia de color	67
3.8.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	68
3.8.3.1. Antocianos	68
3.8.3.2. Estilbenos	69
3.8.3.3. Proantocianidinas	69
3.8.4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN NITROGENADA DE LOS VINOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	70
3.9. ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS VINOS	70
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	71
<u>4. EFECTO DE LA UREA Y NANO-UREA SOBRE LA CALIDAD DE UVAS Y VINOS</u>	73
4.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS UVAS Y VINOS	74
4.2. COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR	79

4.2.1.	PARED CELULAR AISLADA	80
4.2.2.	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR	81
4.2.2.1.	Proteínas	81
4.2.2.2.	Compuestos fenólicos totales (CFT)	82
4.2.2.3.	Azúcares neutros	82
4.2.2.4.	Ácidos urónicos	83
4.2.2.5.	Análisis multifactorial	85
4.3.	COMPUESTOS FENÓLICOS DE UVAS Y VINOS	85
4.3.1.	ANTOCIANOS EN UVAS	85
4.3.2.	ANTOCIANOS EN VINO	89
4.3.3.	ESTILBENOS EN UVAS	92
4.3.4.	ESTILBENOS EN VINOS	96
4.3.5.	PROANTOCIANIDINAS EN LOS HOLLEJOS Y SEMILLAS DE LAS UVAS	99
4.3.6.	PROANTOCIANIDINAS EN VINOS	104
4.3.7.	PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE LOS VINOS	108
4.4.	COMPOSICIÓN NITROGENADA DE LAS UVAS Y DE LOS VINOS	109
4.4.1.	COMPOSICIÓN NITROGENADA EN UVAS	109
4.4.2.	COMPOSICIÓN NITROGENADA EN VINOS	115
4.5.	ANÁLISIS DISCRIMINANTE	119
4.6.	ANÁLISIS SENSORIAL	121
5.	<u>EFFECTO DE METIL JASMONATO Y NANO-METIL JASMONATO SOBRE LA CALIDAD DE UVAS Y VINOS</u>	123
5.1.	PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS UVAS Y VINOS	124
5.2.	COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR DE LAS UVAS	130
5.2.1.	PARED CELULAR AISLADA	130
5.2.2.	ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR	131
5.2.2.1.	Proteínas	131
5.2.2.2.	Compuestos fenólicos totales	132
5.2.2.3.	Azúcares neutros	133
5.2.2.4.	Ácidos urónicos	133

5.2.2.5. Análisis multifactorial	136
5.3. COMPUESTOS FENÓLICOS DE UVAS Y VINOS	137
5.3.1. ANTOCIANOS EN UVAS	137
5.3.2. ANTOCIANOS EN VINOS	141
5.3.3. ESTILBENOS EN UVAS	144
5.3.4. ESTILBENOS EN VINOS	147
5.3.5. PROANTOCIANIDINAS EN LOS HOLLEJOS Y SEMILLAS DE LAS UVAS	150
5.3.6. PROANTOCIANIDINAS EN VINOS	155
5.3.7. PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE LOS VINOS	159
5.4. COMPOSICIÓN NITROGENADA DE LAS UVAS Y DE LOS VINOS	161
5.4.1. COMPOSICIÓN NITROGENADA EN UVAS	161
5.4.2. COMPOSICIÓN NITROGENADA EN VINOS	166
5.5. ANÁLISIS DISCRIMINANTE	170
5.6. ANÁLISIS SENSORIAL	173
6. CONCLUSIONES	177
<hr/>	
7. ANEXOS	183
<hr/>	
8. BIBLIOGRAFÍA	205
<hr/>	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Distribución de viñedo de vinificación en la Región de Murcia.	7
Figura 2.1. Estructura de la pared celular vegetal primaria de tipo I.	9
Figura 2.2. Estructura de la pared celular vegetal secundaria.	9
Figura 2.3. Resumen de las rutas biosintéticas de los principales compuestos fenólicos de la vid.	13
Figura 2.4. Estructura de las diferentes antocianidinas encontradas en uvas.	14
Figura 2.5. Estructura de los principales estilbenos encontrados en uvas.	15
Figura 2.6. Estructura de los flavan 3-oles monoméricos.	16
Figura 2.7. Esquema general de la biosíntesis de aminoácidos en plantas.	18
Figura 2.8. Esquema simplificado del ciclo del nitrógeno.	22
Figura 2.9. Modelo de transducción de la señal generada por elicitores.	30
Figura 2.10. Clasificación de elicitores.	32
Figura 2.11. Estructuras de los cuatro estereoisómeros de MeJ.	36
Figura 2.12. Nanoescala.	37
Figura 3.1. Mapa litológico de la zona donde están plantadas las vides objeto de estudio.	47
Figura 3.2. Precipitaciones y temperatura media mensual durante los tres años de estudio.	48
Figura 3.3. Aspecto de las uvas en el momento del invierno.	50
Figura 3.4. Aplicación de tratamientos.	51
Figura 3.5. A) Piel liofilizada pulverizada, B) Residuo no soluble en alcohol.	54
Figura 3.6 Representación del espacio de color CIELab.	67
Figura 3.7. Ficha de cata empleada en las catas triangulares.	71
Figura 4.1. Composición de la pared celular en uvas Monastrell control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	84
Figura 4.2. Concentración de las diferentes fracciones de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$ hollejo) y en semillas ($\mu\text{g/g}$ semilla) en las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	101
Figura 4.3. Concentración de las diferentes fracciones de proantocianidinas en vinos (mg/L) procedentes de uvas Monastrell control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021 al final de la fermentación alcohólica.	105
Figura 4.4. Gráfico de dispersión de análisis discriminante en uvas y vinos de las muestras control y de las procedentes de los tratamientos con urea y nano-urea.	119

Figura 4.5. Preferencia mostrada por los catadores en las catas triangulares realizadas: A, Control vs. urea. B, Control vs. nano-urea.	122
Figura 5.1. Composición de la pared celular en uvas Monastrell control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	135
Figura 5.2. Concentración de las diferentes fracciones de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$ hollejo) y en semillas ($\mu\text{g/g}$ semilla) en las uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	154
Figura 5.3. Concentración de las diferentes fracciones de proantocianidinas en vinos (mg/L) procedentes de uvas Monastrell control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021 al final de la fermentación alcohólica.	157
Figura 5.4. Gráfico de dispersión de análisis discriminante en uvas y vinos de las muestras control y de las procedentes de los tratamientos con MeJ y nano-MeJ.	171
Figura. 5.5. Preferencia mostrada por los catadores en las catas triangulares realizadas. A, Control vs. MeJ. B, Control vs. nano-MeJ.	174
Figura 5.6. Grado de diferencia percibida entre los vinos control vs. MeJ y control vs. nano-MeJ a nivel visual, olfativo y gustativo.	175

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Fertilizantes sólidos que contienen nitrógeno y su modo de aplicación.	26
Tabla 3.1. Tratamientos aplicados.	51
Tabla 3.2. Condiciones cromatográficas para la determinación de antocianos en uva.	58
Tabla 3.3. Condiciones cromatográficas para la determinación de estilbenos en uva.	59
Tabla 3.4. Condiciones cromatográficas para la determinación de proantocianidinas en uva.	61
Tabla 3.5. Condiciones cromatográficas para la determinación de compuestos nitrogenados en uva.	63
Tabla 3.6. Rectas de calibrado empleadas en la cuantificación de la composición nitrogenada de uva.	64
Tabla 3.7. Condiciones cromatográficas para la determinación de antocianos en vino.	69
Tabla 3.8. Catas realizadas.	71
Tabla 4.1. Características físico-químicas y rendimiento de las uvas control y de las tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	76
Tabla 4.2. Características físico-químicas para los vinos obtenidos de las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	78
Tabla 4.3. Cantidad de hollejo y rendimiento del aislamiento de las paredes celulares de las uvas control y de las tratadas con urea y con nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	81
Tabla 4.4. Análisis multifactorial de los componentes de la pared celular con los factores tratamiento, añada y la interacción tratamiento-añada.	85
Tabla 4.5. Concentración de antocianos ($\mu\text{g/g}$ hollejo) en las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	88
Tabla 4.6. Concentración de antocianos (mg/L) en vinos procedentes de las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	91
Tabla 4.7. Concentración de estilbenos ($\mu\text{g/g}$ hollejo) en las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	95
Tabla 4.8. Concentración de estilbenos (mg/L) en vinos procedentes de uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	98
Tabla 4.9. Concentración de proantocianidinas totales, grado medio de polimerización y % de galoilación en hollejo ($\mu\text{g/g}$ hollejo) y en semillas ($\mu\text{g/g}$ semilla) de las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	100
Tabla 4.10. Análisis multifactorial de las distintas fracciones de proantocianidinas, grado medio de polimerización y % de galoilación en hollejos y semillas en uvas	103

control y las tratadas con urea y con nano-urea con los factores tratamiento, añada y la ineracción tratamiento-añada.

Tabla 4.11. Concentración de proantocianidinas totales (mg/L), grado medio de polimerización y % de galoilación, en vinos procedentes de las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	104
Tabla 4.12. Análisis multifactorial de las distintas fracciones de proantocianidinas, grado medio de polimerización y % de galoilación en vinos elaborados a partir de uvas control y las tratadas con urea y con nano-urea con los factores tratamiento, añada y la ineracción tratamiento-añada.	107
Tabla 4.13. Parámetros espectrofotométricos de los vinos procedentes de las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	108
Tabla 4.14. Contenido individual de aminoácidos y de NH_4^+ (mg/L) en mostos procedentes de las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea, durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	113
Tabla 4.15. Análisis multifactorial de los compuestos nitrogenados en uvas con los factores tratamiento, añada y la interacción tratamiento-añada.	114
Tabla 4.16. Contenido individual de aminoácidos y de NH_4^+ (mg/L) en vinos procedentes de las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	117
Tabla 4.17. Análisis multifactorial de los compuestos nitrogenados en los vinos con los factores tratamiento, añada y la interacción tratamiento-añada.	118
Tabla 4.18. Coeficientes discriminantes estandarizados en uvas y vinos para las funciones discriminantes 1 y 2 para el factor tratamiento.	120
Tabla 4.19. Resultados obtenidos en las catas triangulares realizadas para los tratamientos de urea y nano-urea.	121
Tabla 5.1. Características físico-químicas y rendimiento de las uvas control y de las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	126
Tabla 5.2. Características físico-químicas para los vinos obtenidos de las uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	129
Tabla 5.3. Cantidad de hollejo y rendimiento del aislamiento de las paredes celulares de las uvas control y de las tratadas con MeJ y con nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	131
Tabla 5.4. Análisis multifactorial de los componentes de la pared celular con los factores tratamiento, añada y la interacción tratamiento-añada.	136
Tabla 5.5. Concentración de antocianos ($\mu\text{g/g}$ hollejo) en las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	140
Tabla 5.6. Concentración de antocianos (mg/L) en vinos procedentes de uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	143
Tabla 5.7. Concentración de estilbenos ($\mu\text{g/g}$ hollejo) en las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	146

Tabla 5.8. Concentración de estilbenos (mg/L) en vinos procedentes de uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	149
Tabla 5.9. Concentración de proantocianidinas totales, grado medio de polimerización y % de galoilación en hollejo ($\mu\text{g/g}$ hollejo) y en semillas ($\mu\text{g/g}$ semilla) de las uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	150
Tabla 5.10. Análisis multifactorial de las distintas fracciones de proantocianidinas, grado medio de polimerización y % de galoilación en hollejos y semillas en uvas control y las tratadas con MeJ y con nano-MeJ con los factores tratamiento, añada y la interacción tratamiento-añada.	155
Tabla 5.11. Concentración de proantocianidinas totales (mg/L), grado medio de polimerización y % de galoilación en vinos procedentes de las uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	156
Tabla 5.12. Análisis multifactorial de las distintas fracciones de proantocianidinas, grado medio de polimerización y % de galoilación en vinos elaborados a partir de uvas control y las tratadas con MeJ y con nano-MeJ con los factores tratamiento, añada y la interacción tratamiento-añada.	158
Tabla 5.13. Parámetros espectrofotométricos de los vinos procedentes de las uvas control y tratadas con MeJ y Nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	161
Tabla 5.14. Contenido individual de aminoácidos y de NH_4^+ (mg/L) en los mostos procedentes de las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ, durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	164
Tabla 5.15. Análisis multifactorial de los compuestos nitrogenados en uvas con los factores tratamiento, añada y la interacción tratamiento-añada.	165
Tabla 5.16. Contenido individual de aminoácidos y de NH_4^+ (mg/L) en los vinos procedentes de las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	167
Tabla 5.17. Análisis multifactorial de los compuestos nitrogenados en los vinos con los factores tratamiento, añada y la interacción tratamiento-añada.	170
Tabla 5.18. Coeficientes discriminantes estandarizados en uvas y vinos para las funciones discriminantes 1 y 2 para el factor tratamiento.	172
Tabla 5.19. Resultados obtenidos en las catas triangulares realizadas para los tratamientos de MeJ y nano-MeJ.	173

TABLAS ANEXOS

Tabla 7.1. Control de maduración durante las campañas de estudio 2019,2020 y 2021.	184
Figura 7.2. Composición de la pared celular en uvas Monastrell (mg/g hollejo) control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	185
Tabla 7.3. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2019.	186
Tabla 7.4. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2020.	187
Tabla 7.5. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2021.	188
Tabla 7.6. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2019.	189
Tabla 7.7. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2020.	190
Tabla 7.8. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2021.	191
Figura 7.9. Concentración de los derivados de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con urea y nano-urea durante la campaña 2019.	192
Figura 7.10. Concentración de los derivados de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con urea y nano-urea durante la campaña 2020.	193
Figura 7.11. Concentración de los derivados de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con urea y nano-urea durante la campaña 2021.	194
Figura 7.12. Composición de la pared celular en uvas Monastrell (mg/g hollejo) control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021.	195
Tabla 7.13. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2019.	196
Tabla 7.14. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2020.	197
Tabla 7.15. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2021.	198
Tabla 7.16. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2019.	199
Tabla 7.17. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2020.	200

Tabla 7.18. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2021.	201
Figura 7.19. Concentración de los derivados de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2019.	202
Figura 7.20. Concentración de los derivados de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2020.	203
Figura 7.21. Concentración de los derivados de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2021.	204

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACP	Nanopartículas de fosfato cálcico amorfo
Ala	Alanina
ANR	Antocianidina reductasa
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
AT	Acidez total
B	Boro
°Bé	Grado Baumé
BHT	Benzotiadiazol
BR	Brasinoesteroides
C4H	Cinamato hidroxilasa
Ca	Calcio
Cat-Ext	(+)-catequina-floroglucinol
Cat-T	(+)-catequina terminal
CDPK	Proteínas de unión a calcio
CFT	Compuestos fenólicos totales de la pared celular
CHI	Chalcona isomerasa
CHS	Chalcona sintetasa
4CL	4 cumarato CoA ligasa
Cl	Cloro
Cu	Cobre
CWM	Pared celular aislada
Cys	Cisteína
D.O.	Denominación de origen
DAHHP	Ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosónico 7- fosfato
DAP	Fosfato diamónico
DAPI	Ácido diaminopimélico
DFR	Dihidroflavonol reductasa
Di-OH	Dihidroxilado
Ep-3-O-g-Ext	(-)-epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol
Ep-3-O-g-T	(-)-epicatequina-3-orto-galato terminal
Ep-Ext	(-)-epicatequina-4-floroglucinol
EpG-Ext	(-)-epigalocatequina-floroglucinol
Ep-T	(-)-epicatequina terminal
ET	Etileno
ΔE^*	Diferencia de color
F3H	Flavanona 3-hidroxilasa
F3'H,	Flavonoide 3'hidroxilasa

F3'5'H	Flavonoide 3'5'-hidroxilasa
Fe	Hierro
FLS	Flavonol sintetasa
GA	Ácido giberílico
GABA	Ácido γ -aminobutírico
%Gal	Porcentaje de galoilación
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
gMP	Grado medio de polimerización
GT	Glucosil transferasa
His	Histidina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IC	Intensidad de color
Ile	Isoleucina
IPT	Índice de polifenoles totales
JA	Ácido jasmónico
K	Potasio
LAR	Leucoantocianidina reductasa
LDOX	Leucoantocianidina dioxigenasa
Leu	Leucina
Lys	Lisina
MAP	Fosfato monoamónico
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MeJ	Metil jasmonato
Met	Metionina
Mg	Magnesio
Mo	Molibdeno
Mn	Manganeso
N	Nitrógeno
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
Nano-MeJ	Nanopartículas de fosfato cálcico amorfo cargadas con metil jasmonato
Nano-Urea	Nanopartículas de fosfato cálcico amorfo cargadas con urea
NH ₃	Amoníaco
NH ₄ ⁺	Ión amonio
NSA	Nitrosulfato amónico
OH-Pro	Hidroxiprolina
OIV	Organización Internacional de la Viña y el Vino
OMT	Orto-metiltransferasa
Orn	Ornitina
P	Fósforo
PAL	Fenil alanina amonio liasa

PAAs	Proantocianidinas
PEP	Fosfoenol piruvato
Phe	Fenilalanina
PLGA	poliácido láctico-co-glicólico
Pro	Prolina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
S	Azufre
s.n.m.	Sobre el nivel del mar
Ser	Serina
SIAM	Sistema de Información Agraria de Murcia
STS	Estilbeno sintetasa
TF	Factores de transcripción
Thr	Treonina
Tri-OH	Trihidroxilado
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
UFGT	Flavonoide 3-glucosiltransferasa
UV	Ultravioleta
UV-C	Ultravioleta tipo C
Val	Valina
YAN	Nitrógeno fácilmente asimilable
Zn	Zinc

1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.1. JUSTIFICACION

La presente Tesis Doctoral forma parte del proyecto nano-VIT (RTI2018-095794-B-C21, RTI2018-095794-A-C22), un proyecto multidisciplinar, en el que han colaborado tanto el IMIDA como la UNIVERSIDAD DE GRANADA, y con el que se persigue demostrar el gran potencial de la nanotecnología en la viticultura y la enología.

Una parte importante de la agricultura en la Región de Murcia es el cultivo de viñedo para vinificación, siendo predominante en el Altiplano (Yecla y Jumilla) seguido de la Comarca del Noroeste. En los últimos 20 años se viene produciendo una dramática disminución de la superficie dedicada a dicho cultivo, tanto a nivel nacional como regional. En la Región de Murcia en el año 2001 la superficie de viñedo era de 42.187 ha (Portal estadístico de la Región de Murcia, 2023), en el año 2020 tan solo alcanzaba 21.760 ha, por lo tanto en este periodo de tiempo se ha producido un descenso del 48%. Esta importantísima merma en la superficie de viñedo se debe fundamentalmente a la falta de rentabilidad económica y la consiguiente falta de relevo generacional, sobre todo en las pequeñas explotaciones. Además, hay que tener en cuenta el progresivo e imparable avance de otros cultivos implantados en zonas como el Campo de Cartagena y que debido a la problemática que han causado en el Mar Menor, provocando un claro proceso de eutrofización, buscan otras zonas de expansión, como son el Noroeste y Altiplano de la Región de Murcia. En los últimos 20 años, el incremento de superficie dedicada en el Altiplano a frutales y hortalizas ha sido de un 40% y 239% respectivamente.

El cultivo del viñedo no se ciñe solo a una actividad agraria, en nuestro territorio es mucho más que eso, constituye un elemento fundamental del paisaje y suele ser respetuoso con el medioambiente. Además, en los últimos tiempos en los que se trata de fomentar la cultura del vino y el enoturismo, viene a ser un elemento primordial para el mismo. Por otro lado, la vid es un cultivo que asienta y fija población en la zona, pues no se trata solo de cultivar y luego recoger el fruto, sino que lleva asociado la transformación de la materia prima en vino en las bodegas y su posterior comercialización.

El cultivo de la vid se caracteriza por una menor necesidad hídrica y menores tratamientos con fitosanitarios que los cultivos de frutales y hortalizas. En el contexto actual de cambio climático, en el que sobre todo en la zona del sureste peninsular las lluvias son cada vez más escasas, lo que parece más sensato es apostar por cultivos que requieran un aporte escaso o moderado de agua. Se hace necesario pues, el implementar acciones que ayuden a evitar el abandono de viñedos y su sustitución por otros cultivos que para nada definen la esencia de un territorio como es el Altiplano (Yecla y Jumilla) y la Comarca del Noroeste (Bullas).

Entre estas acciones se deben considerar la realización de estudios que mejoren el cultivo del viñedo y concretamente de la variedad Monastrell, que mantengan la productividad y calidad de las uvas obtenidas, todo ello en un ámbito de protección medioambiental y desarrollo sostenible.

Dentro de las medidas enfocadas a mejorar los cultivos de vid, la urea ha demostrado ser eficaz como fuente de nitrógeno (N) para la planta. Por otro lado, los elicitors se han venido utilizando en diversos cultivos. En el viñedo se han empleado como agentes de defensa contra el ataque de patógenos, con el objetivo de reducir el uso de productos fitosanitarios convencionales; además de como estrategia para aumentar la síntesis de metabolitos secundarios en la planta, tales como los compuestos fenólicos. Estos compuestos tienen gran importancia en las uvas y sobre todo en los vinos desde el punto de vista tecnológico y nutricional. Las pieles de las uvas son la mayor fuente de estos compuestos de interés y la composición de su pared celular afecta de manera directa a la liberación de los mismos.

En estudios precedentes en los que se ha aplicado foliarmente urea o metil jasmonato (MeJ), los resultados no siempre han mostrado la eficacia esperada, por ello se plantea la necesidad de establecer otros modos de aplicación para obtener unos resultados más evidentes en la mejora de la calidad final de las uvas y los vinos. Una alternativa podría ser el uso de la nanotecnología, que se ha empleado en otros campos de forma más generalizada como la medicina. En el caso de la agricultura se ha estudiado su utilización como nanofertilizantes, nanopesticidas, nanobiosensores e incluso como estrategia para la rehabilitación de suelos contaminados. En el campo concreto de la

viticultura los estudios disponibles son más escasos. El empleo de nanopartículas dopadas en su superficie por diversas sustancias, es una ventaja debido a la capacidad de éstas de proteger y de liberar lentamente las sustancias soportadas. De este modo, se puede conseguir un uso más eficiente de la urea y el MeJ, evitando tanto pérdidas por evaporación como por la degradación de los compuestos aplicados. Además, esto permitiría una absorción por la planta más eficaz, al no liberarse todo el compuesto activo en un mismo momento. Es por tanto importante evaluar la aplicación de urea y MeJ soportados sobre nanopartículas, para poder establecer su acción sobre la calidad de las uvas y vinos, en nuestro caso de Monastrell.

Para llevar a cabo este objetivo se ha contado con la colaboración del equipo Bionanomet, liderado por el Dr. José Manuel Delgado López, perteneciente al Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada. Ellos han sido los responsables de la síntesis de las nanopartículas aplicadas a nuestros viñedos, sin las cuales este trabajo no podría haberse realizado.

1.2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido la evaluación del efecto de la aplicación de urea y MeJ en forma convencional y soportados sobre nanopartículas de hidroxiapatito en la calidad de las uvas y vinos de la variedad Monastrell. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto producido por los tratamientos sobre los componentes estructurales de la pared celular de la piel de las uvas.
2. Caracterizar la composición fenólica (antocianos, estilbenos y proantocianidinas) y nitrogenada en las uvas y vinos tras la aplicación de los tratamientos.
3. Evaluar la calidad sensorial de los vinos elaborados con las uvas tratadas, con el objetivo de seleccionar aquellos que mayor calidad hayan obtenido.
4. Comparar los resultados obtenidos tras la aplicación en forma convencional y como nanopartículas tanto de la urea como del MeJ, para establecer cuál sería el tratamiento más adecuado y sostenible en cada una de las familias de compuestos analizados.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LA VARIEDAD MONASTRELL EN LA REGIÓN DE MURCIA

La superficie destinada a uva de vinificación en España se situaba a 31 julio de 2020 en 944.478 ha, correspondiendo 21.760 ha a la Región de Murcia.

Dentro de la Región de Murcia la mayor zona productiva se ubica en la comarca del Altiplano donde se encuentran las Denominaciones de Origen de Jumilla y Yecla. En esta zona, la superficie destinada a uva de vinificación era de 18.816 ha en el 2020 (Portal estadístico de la Región de Murcia, 2023), representando el 86,5% del total de superficie de la Región de Murcia dedicada al viñedo. El restante 13,5% queda repartido en el resto de la región, teniendo importancia también en la comarca del Noroeste, donde se ubica la Denominación de Origen Bullas.

Sánchez-Sánchez et al. (2017) (**Figura 1.1**) caracterizaron los paisajes de viñedo de la Región de Murcia a partir de la superficie dedicada al mismo y su relación con la superficie total cultivada, estableciendo la importancia de los mismos en los términos municipales de Jumilla y Yecla con un 24,34% y 21,85% respectivamente. Además, clasificaron los paisajes de viñedos en tres tipos diferentes: paisaje de viñedo en llanura, paisaje de viñedo en pie de monte y paisaje de viñedo en depresiones u hoyas.

De las diferentes variedades presentes en la Región de Murcia destaca la variedad Monastrell con el 77,8% del total de superficie, además de representar cerca del 45% de toda la superficie de Monastrell cultivada en España (37.881 ha en julio 2020) (MAPA, 2021). Esta variedad es considerada como autóctona de estos territorios, estando bien adaptada a las duras condiciones edafoclimáticas de la zona, con escasas lluvias y suelos pobres (Martínez-Cutillas et al., 2018).

Las vides de Monastrell tienen un porte erguido y se cultivan tanto en conducción en vaso como en espaldera. Sus racimos son de tamaño medio-pequeño, de compacidad media-alta y las bayas son de tamaño medio, de color azul-negro intenso, piel gruesa, pulpa carnosa y sabor neutro (Martínez-Cutillas et al., 2018). La calidad que se obtiene en las uvas y posteriormente en el vino depende en gran medida de las condiciones de cultivo, viéndose muy afectada cuando se obtienen altas producciones;

de modo que para poder obtener todo su potencial es necesario que sus bayas alcancen al menos los 13 °Baumé (°Bé).

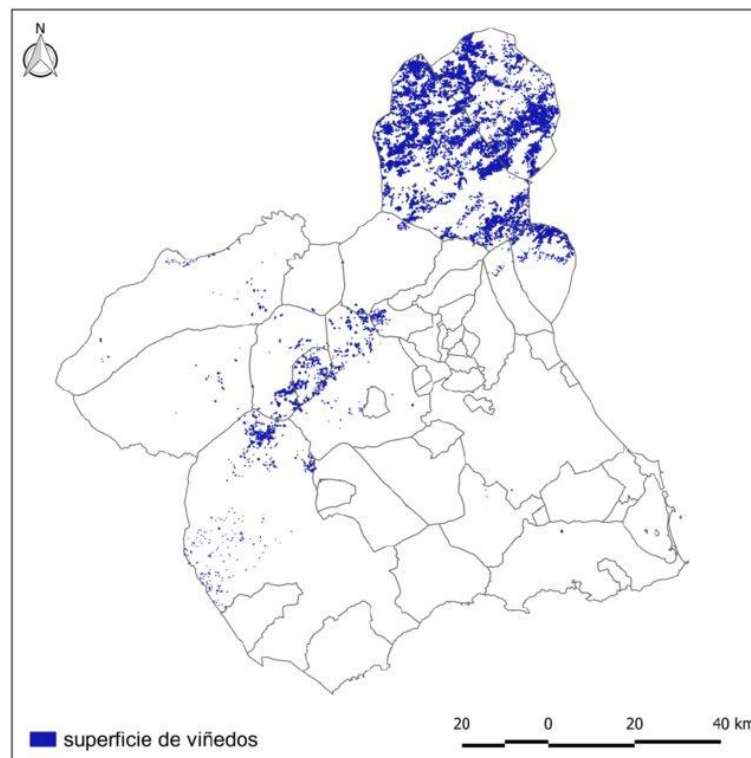


Figura 1.1. Distribución viñedo de vinificación en la Región de Murcia (Sánchez-Sánchez et. al, 2017).

Cuando la variedad Monastrell se cultiva en condiciones óptimas, da lugar a vinos tintos de capa media-alta y de color cereza violáceo con tonos granates. Respecto a sus aromas, son complejos de características balsámicas, especiadas y minerales, además de notas de frutas rojas. En boca son carnosos, cálidos, tánicos y suaves y destacan su equilibrio y extracto (Consejo Regulador Denominación de Origen Yecla, 2023).

2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS UVAS Y DE LOS VINOS

2.2.1. LA PARED CELULAR

En general, los compuestos fenólicos se encuentran localizados en las vacuolas de las células de la piel de la uva además de en las semillas, y son difundidos al vino durante el proceso de fermentación (Garrido y Borges, 2013). Su extractabilidad durante el proceso de elaboración del vino viene influenciada por diferentes factores, tales como la variedad y el lugar de procedencia de la uva (Apolinar-Valiente et al., 2015a), las prácticas agronómicas y el grado de maduración (Ortega-Regules et al., 2008a) o la estructura y composición de la pared celular de la piel de la baya (Garrido-Bañuelos et al., 2021). Muchas prácticas enológicas tienen por objeto degradar la pared celular de la piel para favorecer la liberación de polifenoles, tales como el uso de enzimas y la maceración prefermentativa en frío (Apolinar-Valiente et al., 2015b, Castro-López et al., 2016), además de nuevas tecnologías como la aplicación de ultrasonidos para aumentar la extracción de polisacáridos de la piel de las uvas (Martínez-Lapuente et al., 2021) y su capacidad para mejorar las características cromáticas de los vinos (Pérez-Porras et al., 2022a). Otras técnicas que se han estudiado recientemente son la aplicación de microondas en la etapa pre-fermentativa, lo que permite reducir los tiempos de maceración (Pérez-Porras et al., 2022b). Además, la pared celular de la piel es la mayor fuente de polisacáridos pécticos en el vino (Vidal et al., 2001), lo que influye tanto tecnológicamente como sensorialmente en las cualidades de los mismos, modificando su estabilidad coloidal debido a la capacidad para combinarse con los taninos.

2.2.1.1. Estructura de la pared celular

La estructura de la pared celular vegetal está conformada por la lámina media, la pared primaria y en ocasiones la pared secundaria. Es la lámina media la más externa y primera en depositarse a partir de las vesículas del aparato de Golgi. La pared primaria es sintetizada durante el crecimiento y está constituida por una estructura de microfibras de celulosa entrelazada con hemicelulosa y a su vez incrustada en una matriz de polisacáridos pécticos y algunas hemicelulosas. Se han establecido dos modelos para la estructura de las paredes celulares de las plantas, el tipo I correspondiente a las plantas

dicotiledóneas (**Figura 2.1**) y alguna monocotiledónea y el tipo II correspondiente a la mayoría de monocotiledóneas y a las plantas herbáceas (Carpita y McCann, 2020).

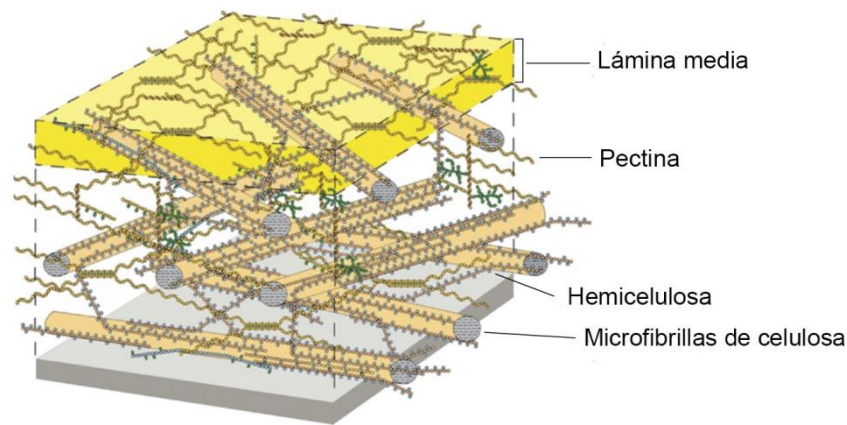


Figura 2.1. Estructura de la pared celular vegetal primaria de tipo I (Carpita et al., 2020).

La pared secundaria (**Figura 2.2**), que aparece en algunos tipos de células como es el caso de las paredes de la semilla de uvas, es una pared gruesa y lignificada que crece dentro de la pared primaria. Está compuesta por celulosa, glucuronoxilanos y otras hemicelulosas, interconectados con una red de ácidos fenilpropanoides y lignina. Además, las fibrillas de hemicelulosa están recubiertas de xylanos y mananos y la lignina se produce mediante el acoplamiento oxidativo de subunidades de monolignol (Ralph et al., 2019).

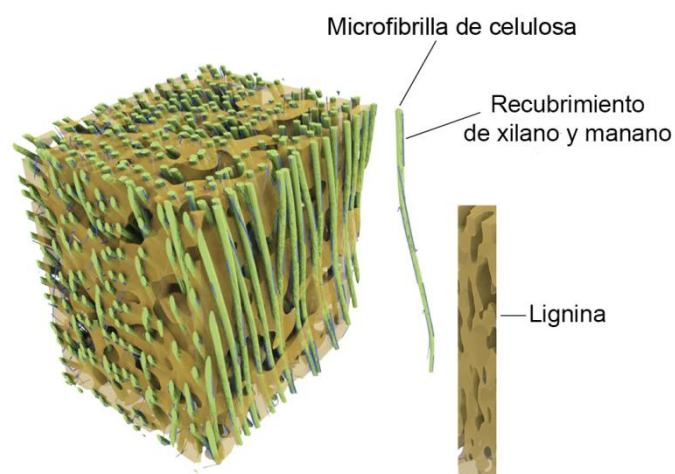


Figura 2.2. Estructura de la pared celular vegetal secundaria (Carpita et al., 2020).

2.2.1.2. Composición de la pared celular

Una aproximación en cuanto a la composición de la pared celular de la piel de la uva ha sido establecida, siendo los polisacáridos los componentes mayoritarios, representando un 50% de la composición global. Entre ellos podemos encontrar los polisacáridos neutros (celulosa, xyloglucano, arabino galactano, xylano y manano) que representan un 30% y las sustancias pécticas un 20% (de ellas un 62% metilesterificadas). De la parte restante, un 15% son proantocianidinas insolubles y por debajo del 5% proteínas estructurales y lignina (Goulao et al., 2012).

Los distintos componentes de la pared celular se pueden clasificar en los siguientes grupos:

Proteínas:

El proteoma de la pared celular de las plantas está compuesto por un amplio número de proteínas que tienen funciones críticas en el desarrollo y respuesta al estrés. Clemente et al., (2022) recopilaron los estudios realizados en 13 especies diferentes de plantas y propusieron una clasificación de las diversas proteínas encontradas atendiendo a sus dominios funcionales. De este modo propusieron una agrupación en nueve clases funcionales: proteínas que actúan sobre los carbohidratos de la pared celular (expansianas y las pectin metilesterasas); oxidoreductasas; proteasas; proteínas relacionadas con el metabolismo lipídico; las relacionadas con los procesos de señalización (arabinogalactanos); proteínas con dominios de interacción (que interaccionan con otras proteínas y con carbohidratos de la pared celular); proteínas estructurales (glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y extensinas); las de función desconocida y una miscelánea de proteínas que no se pueden clasificar en otros grupos.

En la estructura de la pared celular primaria son esenciales las proteínas estructurales, donde se incluyen las proteínas ricas en glicina (Gly), las proteínas ricas en prolina (Pro), las extensinas (proteínas ricas en hidroxiprolina) y las arabinogalactano proteínas. Estas proteínas estructurales se encuentran unidas mediante entrecruzamientos covalentes dentro de la red de la pared y afectan a las propiedades mecánicas de las mismas (Rui y Dinneny, 2020).

Compuestos fenólicos totales:

Están presentes formando enlaces fenólicos cruzados con otros componentes de la pared celular como ligninas, extensinas, glucuronoarabinoxilanos y cadenas laterales de rhammagalacturano-I. Estos enlaces cruzados modifican la consistencia de la pared, la expansión celular y la resistencia a patógenos (Mnich et al., 2020). Según Ortega-Regules et al. (2006) en la pared celular primaria se encuentran mayoritariamente el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico en forma de ésteres con arabinosa y galactosa.

Azúcares neutros:

La celulosa y la hemicelulosa constituyen los llamados polisacáridos neutros. Las microfibrillas de celulosa están formadas a partir de moléculas de glucosa unidas mediante enlaces β -(1→4) glicosídicos formando cadenas de celobiosa (Goulao et al., 2012). Por otro lado, la hemicelulosa actúa entrelazándose con las microfibrillas de celulosa. En las paredes celulares de tipo I la hemicelulosa presente se encuentra en forma de xyloglucano y en menor medida en forma de galactoglucomananos, galactomananos, glucanos y glucuronoarabinoxilanos (Carpita y Gibeaut, 1993).

Pectinas:

Se establecen como heteropolisacáridos que contienen fundamentalmente residuos de ácido galacturónico, que se pueden presentar como ésteres metoxílicos, además de contener una cierta cantidad de azúcares neutros que pueden estar presentes como cadenas laterales (Voragen et al., 2009). Esta fracción péctica está compuesta principalmente de homogalacturonano en un 65%, arabinogalactano I y II en un 23%, ramnogalacturonano de Tipo I en un 10% y ramnogalacturonano de Tipo II en un 2% (Nunan et al., 1997; Vidal et al., 2001).

La composición de la pared celular varía durante el proceso de crecimiento y maduración de la baya. Después del envero la piel se vuelve más blanda, se degrada la lámina media y la superficie de la pared se vuelve ondulada debido a la ruptura de las uniones con calcio entre las moléculas de pectina. Además se produce una solubilización de las pectinas y un aumento de las proteínas estructurales que ayuda a mantener la integridad de la baya (Huang et al., 2005).

Con el aumento del grado de maduración también se produce una disminución de la cantidad de material de pared celular y de la galactosa presente (Ortega-Regules et al., 2008a) ya que se produce una solubilización de arabinogalactano I y una disminución del grado de metil- y acetil- esterificación de la pectina, aunque existe una dependencia con el cultivar (Vicens et al., 2009).

2.2.2. COMPUESTOS FENÓLICOS

Los metabolitos secundarios se generan a partir de productos del metabolismo primario, son sustancias que a priori no tendrían una función vital pero desarrollan funciones muy importantes en la supervivencia de la planta. Entre ellos se encuentran los compuestos fenólicos, los terpenos y alcaloides, además de compuestos aromáticos como aldehídos, alcoholes, ácidos grasos y ésteres (Croteau et al., 2000).

La estructura de los compuestos fenólicos proviene del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo y diversos sustituyentes. Las rutas biosintéticas más habituales de estos compuestos son la del ácido siquímico y la ruta de los fenilpropanoides. La biosíntesis comienza con la unión del fosfoenolpiruvato (PEP) y la D-eritrosa-4-fosfato para obtener finalmente ácido siquímico. A partir de aquí y por la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL) se obtienen L-tirosina (Tyr) y L-fenilalanina (Phe), de esta última derivan principalmente el resto de compuestos fenólicos gracias a la actividad de diversas enzimas. La **Figura 2.3** muestra resumidamente los diferentes compuestos que se generan así como las enzimas involucradas en su síntesis.

Dentro de la gran familia de los compuestos fenólicos y atendiendo a su estructura química se dividen en dos grupos, los compuestos fenólicos flavonoides (antocianos, flavonoles, flavanoles y proantocianidinas (PAs)) y los no flavonoides (estilbenos y ácidos fenólicos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos).

De entre todos ellos, en esta Tesis Doctoral se han estudiado los antocianos, estilbenos y PAs .

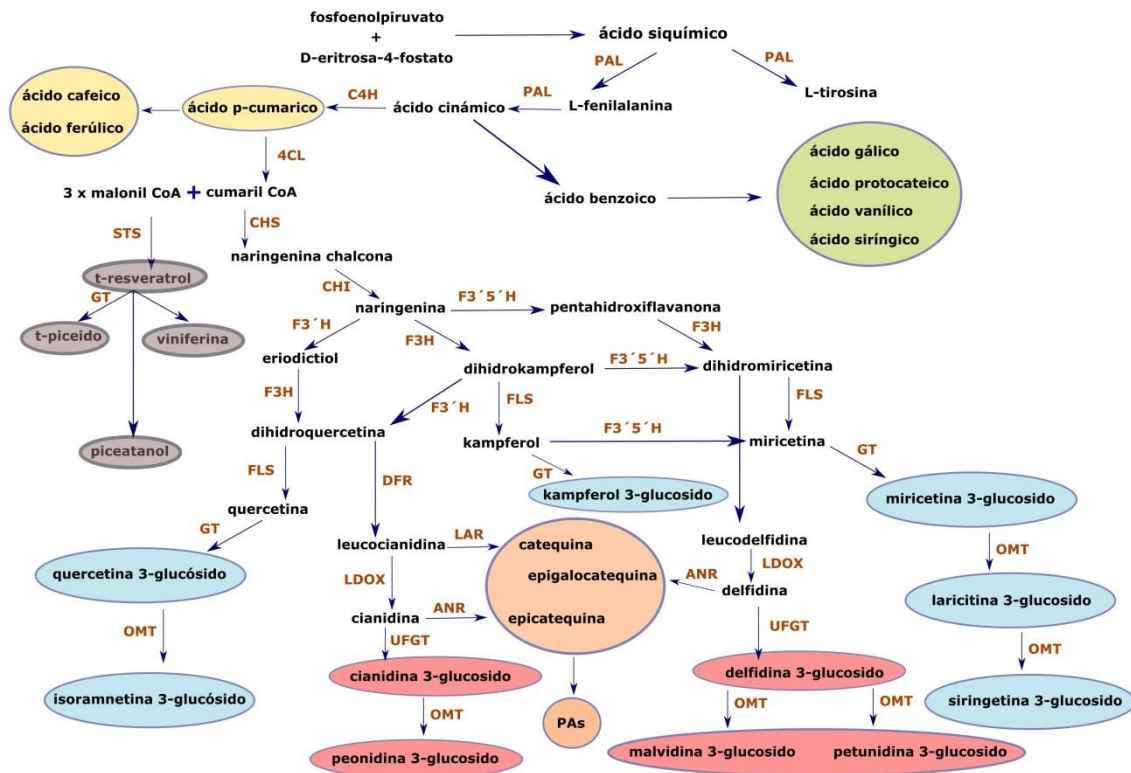


Figura 2.3. Resumen de las rutas biosintéticas de los principales compuestos fenólicos de la vid (a partir de Matus et al. (2009) y Dewick (2002) con algunas modificaciones).

Abreviaturas: ANR, antocianidina reductasa; C4H, cinamato hidroxilasa; 4CL, 4 cumarato CoA ligasa; CHI, chalcona isomerasa; CHS, chalcona sintetasa; DFR, dihidroflavonol reductasa; F3H, flavanona 3-hidroxilasa; F3'H, flavonoide 3'-hidroxilasa; F3'5'H, flavonoide 3'-5'-hidroxilasa; FLS, flavonol sintetasa; GT, glucosil transferasa; LAR, leucoantocianidina reductasa; LDOX, leucoantocianidina dioxigenasa; OMT, O-metiltransferasa; PAL, fenilalanina amonioliasa; STS, estilbena sintetasa; UFGT, flavonoide 3-glucosiltransferasa.

2.2.2.1. Antocianos

Son las sustancias responsables del color de las uvas y vinos tintos. Su síntesis se produce en la piel de las variedades de uva tinta, aunque en las variedades tintoreras también se encuentran en la pulpa.

Su estructura química está basada en el catión flavilio. Los antocianos de las uvas se forman a partir de las antocianidinas tras su glucosilación mayoritariamente en la posición 3. Además una vez glucosiladas, la glucosa puede ser también acilada por distintos ácidos como el ácido acético, el ácido p-cumárico y el ácido cafeico (Rinaldo et al., 2015). En las uvas tintas se han identificado principalmente cinco antocianidinas mostradas en la **Figura 2.4:** cianidina, peonidina, delfidina, petunidina y malvidina

aunque algún autor también ha identificado pelargonidina en Cabernet Sauvignon y en Pinot Noir (He et al., 2010; Garrido y Borges, 2013).

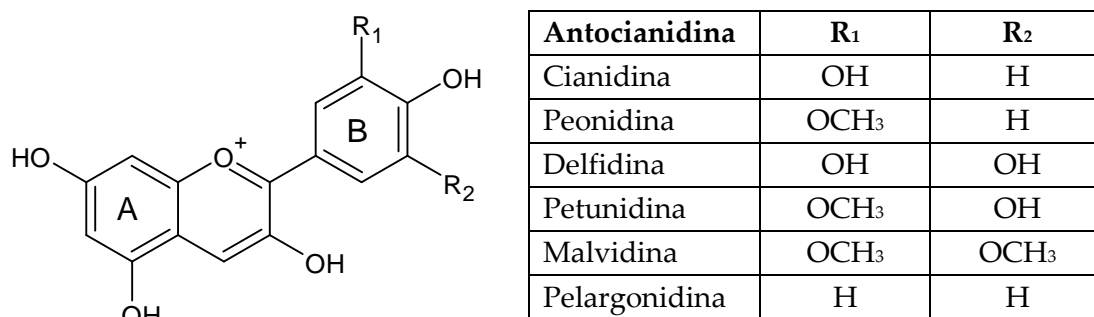


Figura 2.4. Estructura de las diferentes antocianidinas encontradas en uvas.

El perfil antocianico de cada variedad de uva es relativamente estable, aunque su concentración total puede variar ampliamente debido a la añada, a las condiciones ambientales y factores agronómicos (Gil-Muñoz et al., 2010).

Los antocianos extraídos en el vino durante el proceso de fermentación alcanzan un valor máximo relativamente pronto con un descenso posterior (Ribéreau-Gayon et al., 2003). Este descenso puede ser producido por la adsorción sobre las paredes celulares tanto de levaduras (Morata et al., 2006) como de la propia piel de la uva (Fernandes et al., 2017). Las formas monoméricas son las principales responsables del color de los vinos jóvenes, aunque en estos vinos también son importantes los procesos de copigmentación en los cuales los antocianos se asocian con compuestos no coloreados, ayudando a la estabilidad del color de los vinos en el tiempo (Garrido-Bañuelos et al., 2021). Finalmente, durante el envejecimiento del vino se forman compuestos procedentes de los antocianos más complejos y estables, destacando los piroantocianos responsables del cambio de color a tonos más anaranjados (Escribano-Bailón et al., 2019).

2.2.2.2. Estilbenos

Estos compuestos en principio no tienen influencia en la calidad organoléptica de los vinos, aunque si presentan cierto interés nutricional dado sus propiedades

beneficiosas para la salud humana. En la vid se acumulan en las bayas, en el exocarpo durante el desarrollo del fruto y disminuye en bayas maduras (Fornara et al., 2008), aunque también se encuentran en otros tejidos de la planta (Wang et al., 2010).

Entre todos los estilbenos, el resveratrol ha demostrado poseer efectos antioxidantes, inmunomoduladores, antiinflamatorios, así como una amplia gama de beneficios para la salud, como la quimio-prevención del cáncer o la cardioprotección (Dubrovina y Kiselev, 2017).

Estructuralmente están caracterizados por poseer un núcleo común de difenil etileno. El isómero *trans* es la configuración más común de los estilbenos monoméricos. Los estilbenos oligoméricos se producen por acoplamiento oxidativo entre los monoméricos y se caracterizan por configuraciones estructurales complejas. A partir del *trans*-resveratrol derivan el resto de estilbenos (**Figura 2.5**), por acción de diversas enzimas, algunas todavía sin caracterizar. Por isomerización con luz ultravioleta se sintetiza el *cis*-resveratrol. A través de glicosación el piceido, por hidroxilación el piceatanol y por dimerización la ϵ -viniferina (Martínez-Márquez, 2016).

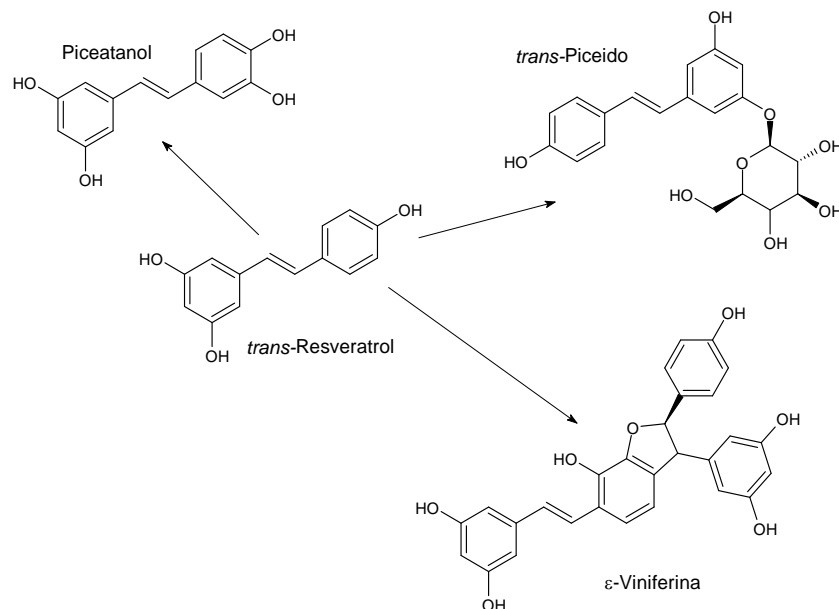


Figura 2.5. Estructura de los principales estilbenos encontrados en uvas.

2.2.2.3. Proantocianidinas

Las PAs también conocidas como taninos condensados, son polímeros que están formados a partir de los flavan-3-oles monoméricos a través de uniones C-C interflavónicas y ocasionalmente uniones C-O-C (Cheynier et al., 2006). Las unidades monoméricas están compuestas de dos anillos aromáticos (A, B) y un heterociclo de pirano y se distinguen por la estereoquímica de los carbonos asimétricos (C2 y C3), la presencia de grupos galoilados y el nivel de hidroxilación del anillo B.

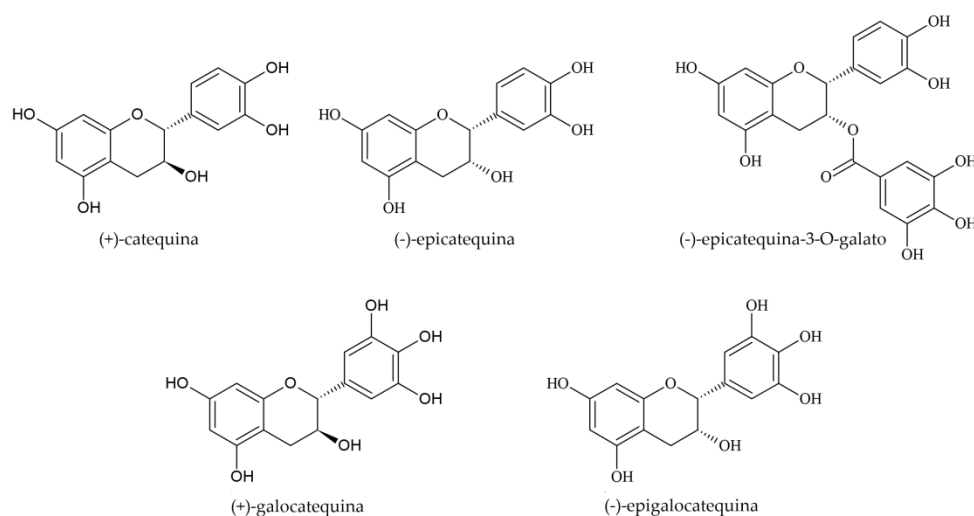


Figura 2.6. Estructura de los flavan 3-oles monoméricos.

En *Vitis vinifera* se encuentran los compuestos dihidroxilados: (+)-catequina, (-)-epicatequina y la forma galoilada, (-)-epicatequina-3-O-galato, y por otro lado los trihidroxilados: (+)-galocatequina y (-)-epigalocatequina (**Figura 2.6**). En la uva se localizan en la piel y en las semillas, siendo la epigalocatequina específica de la piel (Hellström et al., 2009). Las PAs se encuentran en mayor concentración en las semillas, además éstas presentan un mayor grado de galoilación y menor grado de polimerización que las procedentes de los hollejos (Busse-Valverde et al., 2010).

Durante la fermentación se produce un aumento de las PAs extraídas en el vino hasta llegar a un máximo que permanece constante. Las PAs del hollejo se extraen más rápidamente que las de las semillas, estas últimas necesitan en primer lugar la hidratación de la cubierta de la misma y la eliminación de los lípidos presentes (Glories

y Saucier, 2000), además el alcohol que se genera en la fermentación favorece la extracción.

Sensorialmente, las PAs son las responsables de la astringencia y el amargor de los vinos. Durante el proceso de envejecimiento del vino forman polímeros junto con los antocianos ayudando de este modo a la estabilidad del color de los mismos.

2.2.3. COMPOSICIÓN NITROGENADA

El N es un elemento muy importante en cualquier ser vivo, concretamente en las plantas forma parte de la clorofila, los ácidos nucleicos, hormonas, proteínas y aminoácidos.

Mediante el proceso de asimilación el N inorgánico es incorporado a los compuestos orgánicos de las plantas. Este proceso se puede llevar a cabo por cuatro vías diferentes, una de ellas es el proceso de fijación mediante el cual el nitrógeno atmosférico (N_2) es transformado en amonio (NH_4^+) por la acción de microorganismos simbiotes con algunas plantas (leguminosas), las otras tres vías son la asimilación de nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) y NH_4^+ . Los NO_3^- y NO_2^- deben de ser reducidos y transformados en NH_4^+ , y es este último el que se introduce en la ruta bioquímica del glutamato para la síntesis del resto de biomoléculas, entre las que se encuentran los aminoácidos.

En la **Figura 2.7** se observan los distintos procesos llevados a cabo para la síntesis de aminoácidos en las plantas. Dicha síntesis ocurre durante las últimas seis u ocho semanas del periodo de la maduración de la uva (Cosme et al., 2016)

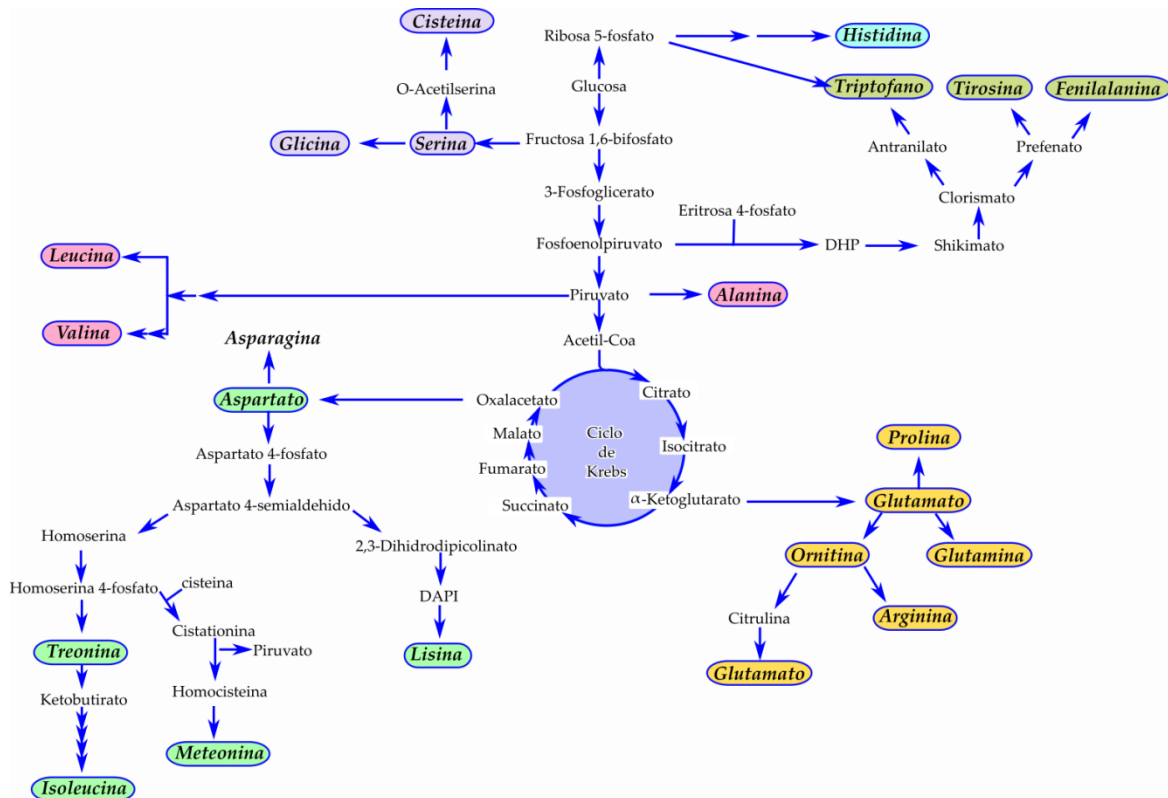


Figura 2.7. Esquema general de la biosíntesis de aminoácidos en plantas (a partir de Gutiérrez Gamboa et al., 2020). Abreviaturas: DAPI, ácido diaminopimélico; DAHP, ácido 3-desoxi-D-arabino-heptulosónico 7-fosfato.

Los aminoácidos presentes en las bayas, juegan junto con el NH_4^+ , un papel fundamental en el proceso de la fermentación alcohólica. Ambos son fuentes primarias para la nutrición y desarrollo de las levaduras. Los aminoácidos más abundantes presentes en el mosto son la Pro y la Arg (Bell y Henschke, 2005). Arg es un aminoácido de fácil asimilación por las levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que la Pro es un aminoácido que presenta más dificultades para ser asimilado por las mismas (Gobert et al., 2017). Se define el N fácilmente asimilable (YAN) como la suma de NH_4^+ y de todos los aminoácidos a excepción de la Pro. Las recomendaciones de YAN en los mostos para un correcto desarrollo de la fermentación alcohólica son entre 150 y 200 mg N/L (Bell y Henschke, 2005). Por otro lado, los compuestos nitrogenados son precursores de muchos compuestos aromáticos responsables del aroma del vino (Moreno-Arribas y Polo, 2009a).

La composición nitrogenada de los mostos y vinos depende de la variedad de uva, de las condiciones edafoclimáticas, de las prácticas agronómicas, el grado de maduración y la adición de N en los procesos enológicos (Gutiérrez-Gamboa et al., 2020).

Los aminoácidos presentes en el vino provienen por un lado de los que estaban presentes en el mosto y no se han utilizado en la fermentación y por otro lado de los liberados por las levaduras por autólisis al final de este proceso (Moreno-Arribas y Polo, 2009b). Otros compuestos nitrogenados menos favorables que se pueden encontrar en los vinos son el etil carbamato, formado a partir de urea y etanol; y las aminas biógenas formadas a partir de la descarboxilación de aminoácidos por la acción de bacterias lácticas (Costantini et al., 2019). La presencia excesiva de estos compuestos puede dar lugar a problemas de toxicidad en los vinos.

2.3. ESTRATEGIAS VITÍCOLAS PARA INCREMENTAR LA CALIDAD DE LA UVA Y EL VINO

Es una realidad que los efectos del cambio climático están siendo cada vez más acusados, manifestándose con un ascenso en las temperaturas medias y desórdenes en los ciclos meteorológicos. Estamos siendo testigos por tanto, de un aumento de los fenómenos meteorológicos extremos con períodos de sequía y fenómenos de lluvias torrenciales cada vez más frecuentes. Además, los episodios con altas temperaturas son cada vez más duraderos, siendo más significativos en el sureste español.

En los viñedos, estas condiciones de sequía y altas temperaturas provocan una inhibición del metabolismo, lo que conduce a la reducción en las acumulaciones de metabolitos secundarios tales como los compuestos fenólicos (Mira de Orduña, 2010) al mismo tiempo que se produce degradación de los mismos. Se ha establecido que temperaturas superiores a 30°C reducen la síntesis de antocianos, y que temperaturas mayores a 37°C pueden llevar a una completa e irreversible inhibición de la misma en algunos cultivos (Kliewer, 1977; Mira de Orduña, 2010). Por otro lado, temperaturas por encima de 35°C durante el invierno reducen significativamente la expresión de genes relacionados con la síntesis y acumulación de antocianos y estilbenos (Kim et al., 2018). Respecto a los aminoácidos, su producción también se ve influenciada por las

condiciones climatológicas, de hecho se favorece con el descenso de las temperaturas nocturnas durante el mes previo a la vendimia (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018a).

Por otra parte, el efecto de las altas temperaturas durante el período de maduración, está provocando un desajuste cada vez más pronunciado entre la madurez fenológica y la madurez tecnológica, encontrándose en muchos casos que para tener una composición fenólica adecuada en la baya es necesario alcanzar unos valores de pH demasiado elevados, una acidez total (AT) muy baja, además de altas concentraciones de azúcares que se traducirán en vinos de alta graduación alcohólica.

Ante este escenario climatológico y con el objeto de intentar mantener y mejorar la calidad de las uvas, se han establecido diversas estrategias agronómicas como son el aclareo de racimos y diferentes sistemas de poda y conducción (Pérez-Lamela et al., 2007); el estudio y la selección del portainjerto (Marín et al., 2021); el uso de diferentes técnicas de riego (Romero-Azorín et al., 2022); la utilización de diferentes elicitores (Paladines-Quezada et al., 2019a; Portu et al., 2018a; Ruiz-García y Gómez-Plaza, 2013) y la aplicación de compuestos nitrogenados como la urea o fenilalanina (Garde-Cerdán et al., 2014a; Garde-Cerdán et al., 2015).

También se han empleado diferentes estrategias enológicas con el fin de conseguir una mayor extractabilidad de compuestos de interés en los vinos, como el uso de enzimas, maceraciones pre-fermentativas o el uso de ultrasonidos que han conseguido buenos resultados en la mejora de la calidad de los vinos (Pérez-Porras et al., 2022a).

2.3.1. APLICACIÓN DE COMPUESTOS NITROGENADOS EN EL VIÑEDO

El N es un macroelemento esencial para la vid, junto con fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S), además también son importantes los oligoelementos molibdeno (Mo), cobre (Cu), manganeso (Mn), boro (B), zinc (Zn), hierro (Fe) y cloro (Cl). El N favorece el desborre, la tasa de cuajado y el proceso de inducción floral, lo que se traduce en una mejora del crecimiento y de la capacidad productiva. La vid se caracteriza por tener unas necesidades de N relativamente moderadas, con un

ritmo regular de absorción de minerales a lo largo de su ciclo y sin períodos críticos (García-Escudero Domínguez, 2010). Para la correcta ejecución de un programa de fertilización se deberían realizar análisis que nos permitan definir las necesidades de la planta, por lo que es recomendable realizar dicho análisis de suelo en invierno cada 3-4 años. También se debe analizar el agua de riego cada temporada para conocer su aportación en nitratos. Finalmente para conocer el estado nutricional de la planta, es importante cuantificar durante el invierno la cantidad de Arg en las raíces (reservas) y la realización de análisis foliares en floración y envero (Gutiérrez-Gamboa et al., 2020).

La absorción de N de la vid comprende fundamentalmente el período comprendido entre la brotación y el envero, donde prácticamente es absorbido el 100% de N, además del K, y más del 90% de P. Un exceso de suministro de N puede llevar asociados diversos problemas como son el exceso de vigor, aumento de la fertilidad de las yemas, del peso de baya y racimo. Además, la estimulación del crecimiento vegetativo dificulta los procesos de agostamiento y maduración de la uva, lo que produce una disminución de la calidad de las mismas. Por otro lado, la vid se vuelve más sensible a la *Botritis* y la mayor compacidad del racimo dificulta su tratamiento. También se pueden producir corrimientos en variedades sensibles, clorosis, aumento de riesgo de carencia de K y aumento de las necesidades de agua. En condiciones normales la aplicación de N no debería exceder los 30-40 Kg/ha (García-Escudero Domínguez, 2010).

2.3.1.1. Modos de aplicación

La **Figura 2.8** representa de modo simplificado el ciclo del N, cualquier tipo de aplicación en forma de abono que contenga N afectará a dicho ciclo.

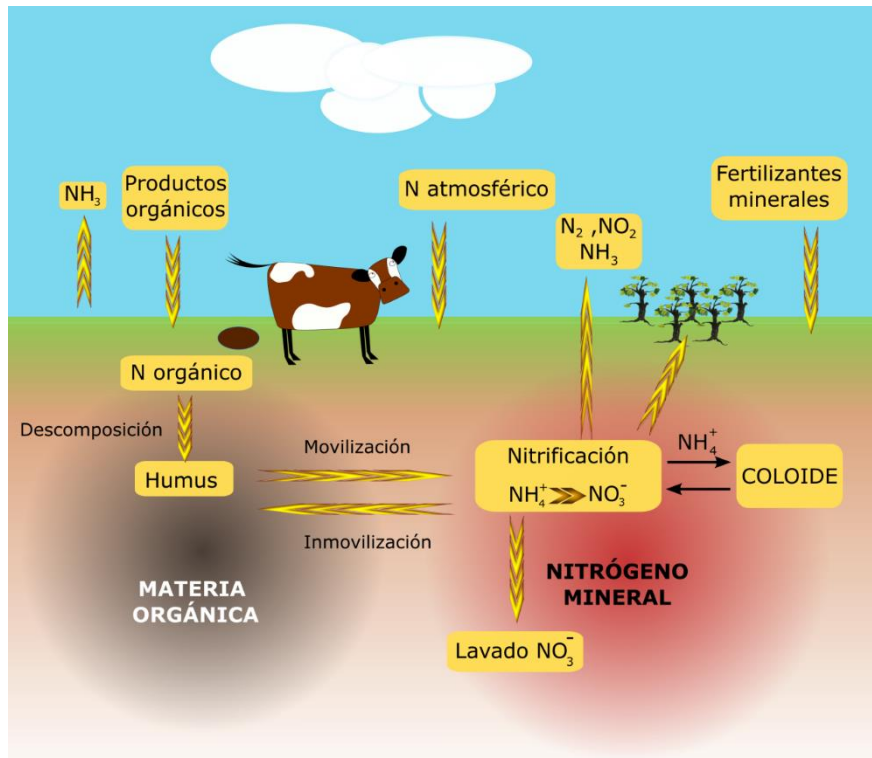


Figura 2.8. Esquema simplificado del ciclo del nitrógeno.

Fertilización en el suelo

El uso de fertilizantes convencionales para suministrar N, P y K, ha sido clave para aumentar el rendimiento de los cultivos. Sin embargo, la cantidad que es asimilada por la planta es notablemente inferior al suministrado, en torno al 50% en el caso de N y K e incluso del 10% para el P (Trenkel, 2010).

Respecto a la aplicación en el suelo, debe de ser cuando las raíces están en crecimiento activo, es decir en la floración y en la postcosecha (Gutiérrez-Gamboa et al., 2020). Después de la vendimia, el N se moviliza desde las hojas senescentes para ser almacenado en los órganos perennes. Posteriormente, en la primavera y antes de comenzar la adsorción por las raíces, se vuelve a movilizar desde las partes perennes a los órganos en desarrollo (Ferrara et al., 2018). Cuando el N es aplicado al suelo suele producir un aumento significativo del estado de N tanto de la planta como del fruto, lo que con cierta frecuencia se traduce en un aumento vegetativo y mayores rendimientos (Schreiner et al., 2013).

Debido a la alta solubilidad de los productos empleados, una parte importante puede acabar contaminando las masas de agua, ya sea por lixiviación o por escorrentía, además también se producen pérdidas por volatilización. Esta baja eficiencia de los productos aplicados en forma convencional se ha convertido desde hace décadas en un problema, por un lado económico y por otro lado medioambiental, siendo el uso intensivo de los fertilizantes uno de los principales factores antropogénicos en la contaminación de aguas subterráneas y superficiales, además de causar problemas de eutrofización (Abascal et al., 2022; Malone y Newton, 2020).

Fertilización foliar

Los problemas asociados a la fertilización en el suelo han conducido al desarrollo de nuevas técnicas de fertilización más sostenibles y eficientes como el uso de la fertilización foliar por pulverización (Fernández et al., 2013; Garde-Cerdán et al., 2014a). En la aplicación foliar hay que tener en cuenta las condiciones ambientales, siendo la temperatura y la humedad relativa las que más afectan. Con una humedad relativa elevada, la permeabilidad aumenta debido a la hidratación cuticular y al retraso en el secado de los compuestos depositados en la superficie de la planta. Un aumento de temperatura también aumenta la solubilidad de los ingredientes activos y adyuvantes, pero disminuye la viscosidad, la tensión superficial y el punto de delicuescencia. Además, se acelera la velocidad de evaporación de las soluciones de pulverización depositadas sobre las hojas, impidiendo la penetración de los componentes cuando se ha desecado (Fernández et al., 2013). Es necesario por tanto, antes de su aplicación tener en cuenta las previsiones meteorológicas evitando momentos con baja humedad relativa, vientos fuertes, lluvias fuertes o temperaturas extremas.

Las formulaciones de las disoluciones también influyen en su efectividad, el pH es un parámetro importante a controlar, siendo el uso de coadyuvantes algo habitual en dichas formulaciones (Fernández et al., 2013).

Aunque se considera que el suelo suele ser la principal fuente de nutrientes para la vida, la fertilización foliar es capaz de satisfacer eficazmente las necesidades nutricionales en determinados momentos críticos (Hannam et al., 2016). Por otro lado, la

aplicación foliar de N puede aumentar el YAN de la uva sin producir un aumento del crecimiento vegetativo ni el rendimiento (Hannam et al., 2014). Aplicado entre floración y vendimia se difunde en las hojas y pasa al fruto con un impacto limitado en el crecimiento de la vid o el rendimiento (Lasa et al., 2012). El uso de N foliar también conlleva un menor riesgo de lixiviación de nitratos a las aguas subterráneas en comparación con las aplicaciones de N al suelo, ya que se aplican menores cantidades de N directamente al follaje (Hannam et al., 2016; Lasa et al., 2012).

Fertirrigación

Consiste en la aportación de los nutrientes disueltos en el agua de riego. Se puede aplicar mediante dos sistemas diferentes:

Riego por aspersión. En el que el agua se aplica a través de difusores o aspersores en forma de finas gotitas, a modo de lluvia. Empleada en el aporte de abonos nitrogenados, muy utilizada en los sistemas de riego en los cultivos de maíz.

Riego localizado. El agua es aportada en una zona del suelo a través de emisores localizados en las conducciones de agua, se emplean pequeños caudales y baja presión. Es una forma sencilla y cómoda de aportar los diferentes nutrientes.

La fertirrigación por riego localizado tiene una serie de ventajas frente al riego por aspersión, como son una mayor eficiencia (empleando menores dosis), menores pérdidas por lixiviación, comodidad de aplicación y una mejor y más rápida asimilación al permanecer la humedad en el bulbo radicular (García-Serrano et al., 2010).

2.3.1.2. Tipos de compuestos nitrogenados

Fertilizantes orgánicos

Los fertilizantes orgánicos se clasifican en dos grupos diferentes, los que sufren un proceso de elaboración antes de su aplicación, llamados fertilizantes orgánicos comerciales y los que se aplican directamente sin procesar.

Los fertilizantes orgánicos comerciales están caracterizados y se conoce su composición. Pueden ser de tres tipos, según su forma de obtención y origen:

- a) *Abonos orgánicos*, generalmente el contenido en N orgánico no debe ser inferior al 85% del N total y se clasifican en función del contenido en nutrientes principales y del origen de la materia prima orgánica utilizada en su elaboración.
- b) *Abonos órgano-minerales*, se obtienen por mezcla de abonos orgánicos y minerales. Se clasifican de acuerdo a su contenido en nutrientes y en su forma de presentación (sólidos o líquidos).
- c) *Enmiendas orgánicas*, su función principal es el aporte de materia orgánica al suelo para mejorar su fertilidad. En este grupo se encuentran la enmienda húmica, turbas y compost.

Los fertilizantes orgánicos sin procesar son por un lado los residuos de explotaciones ganaderas, entre los que encontramos estiércol, purín, gallinaza y palomina. También se encuentra en este grupo aquellos que proceden de los residuos vegetales, como pueden ser los restos de poda. La composición y caracterización de estos fertilizantes no es tan precisa como los que han sufrido un proceso de elaboración (García-Serrano et al., 2010).

Fertilizantes minerales

El abanico de fertilizantes nitrogenados minerales es amplio pudiéndose encontrar en forma de sólidos o líquidos. Según su composición pueden suministrar otros elementos aparte del N.

Nombre común	Composición	% N total	Modo aplicación
Nitrato amónico cálcio (NAC)	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{CaCO}_3$	27	Cobertera
Nitrato amónico	NH_4NO_3	34	Cobertera/Fertirrigación
Nitrosulfato amónico (NSA)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NH}_4\text{NO}_3$	26	Cobertera
Nitromagnesio	$\text{NH}_4\text{NO}_3 + \text{CaCO}_3$ + MgCO_3	22	Cobertera
Urea	NH_2CONH_2	46	Cobertera/foliar
Nitrato de calcio	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	15	Fertirrigación
Nitrato de magnesio	$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$	11	Fertirrigación
Fosfato monoamónico (MAP)	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	12	Fertirrigación
Fosfato diamónico (DAP)	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	18	Fertirrigación
Nitrato potásico	KNO_3	13	Fertirrigación/Foliar
NPK-cristalinos	Varios	Varios	Fertirrigación/Foliar

Tabla 2.1. Fertilizantes sólidos que contienen nitrógeno y su modo de aplicación.

Dependiendo del tipo de aplicación existen diversas formulaciones. En la **Tabla 2.1** se recogen los fertilizantes minerales sólidos más habituales que contienen N.

Los fertilizantes líquidos que contienen N y que más habitualmente son aplicados en el suelo son la solución de abono nitrogenado (20% N) y la solución de nitrato amónico y urea (32% N) que contiene el N en sus tres formas posibles, ureico, amoniacal y nítrico. Otros fertilizantes líquidos empleados mayoritariamente en fertirrigación son solución nitrogenada (32% N y 20% N), ácido nítrico (13% N), solución de nitrato de calcio (8% N), solución de nitrato de magnesio (7% N) y soluciones NPK (García-Serrano et al., 2010).

Fertilizantes con aminoácidos

Según el Real Decreto 999/2017, de 24 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 506/2013, de 28 de junio, sobre productos fertilizantes, dentro del “Grupo 4. Otros abonos y productos especiales” encontramos:

01. *Aminoácidos*, correspondiendo a productos a base de aminoácidos libres, obtenidos por hidrólisis de proteínas, síntesis o fermentación. Deben de contener al menos el 6% en peso de aminoácidos libres.

02. *Abonos con aminoácidos*, se obtienen a partir de otros abonos a los que se les incorporan aminoácidos. Deben de contener al menos el 2% en peso de aminoácidos libres.

Además también se contemplan mezclas de aminoácidos con silicio y con extracto de algas. Son 18 los aminoácidos permitidos para su uso como fertilizantes: alanina (Ala), Arg, ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), Gly, OH-Pro, histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lys), metionina (Met), Phe, Pro, serina (Ser), Tyr, treonina (Thr), triptófano (Trp) y valina (Val).

Fertilizantes estabilizados

Surgen con la finalidad de poner el N a disposición de la planta de manera progresiva. Según Trenkel (2010) se podrían clasificar del siguiente modo:

a) *Fertilizantes de liberación lenta y fertilizantes de liberación controlada.* Dentro de este grupo se encuentra distintos productos según su origen:

1) Productos orgánicos de N de baja solubilidad, que se sintetizan a partir de la reacción de la urea con otros compuestos, obteniéndose isobutilidendiurea, crotonilidendiurea y urea formaldehído.

2) Fertilizantes en los que una barrera física controla su liberación, el abono se presenta en forma de comprimidos recubiertos por polímeros hidrófobos o en formas en las que el principio activo soluble está disperso en una matriz que dificulta su disolución.

3) Productos inorgánicos de baja solubilidad, como puede ser el fosfato amónico magnésico.

La velocidad de liberación del N dependerá de la temperatura, pH y humedad del suelo.

b) *Inhibidores de la nitrificación*, se adicionan compuestos que deprimen la actividad de las nitrosomonas en el suelo, retrasando la oxidación bacteriana del NH_4^+ .

c) *Inhibidores de la ureasa*, se adicionan compuestos que inhiben o retrasan la hidrólisis enzimática de la urea para transformarse en NH_4^+ .

2.3.1.3. Urea

Se presenta en dos formas, la urea granulada para aplicación al suelo y la urea cristalina, completamente soluble, especialmente indicada para su aplicación foliar y uso en fertirrigación.

Cuando se aplica en el suelo debe hacerse con cierta antelación a las necesidades de la planta, para que el N en formato NH_4^+ pueda transformarse a NO_3^- y que esté disponible en el momento requerido por la misma. Por otro lado, en suelos calizos, con ambiente seco y temperaturas elevadas, es necesario enterrarla con laboreo para evitar pérdidas por volatilización en forma de NH_3 . Para aplicación en regadío, el suelo debe de estar húmedo o efectuarse un pequeño riego tras su aplicación (García-Serrano et al., 2010).

La aplicación foliar es recomendada en los momentos en los que es necesario un aporte rápido de N o cuando hay dificultades de absorción por la raíz a causa de una excesiva humedad del suelo, frío, poda excesiva o sequía. A bajas temperaturas, la absorción foliar es mayor que a través de las raíces, aunque no es recomendable aplicar con temperaturas inferiores a 10°C . Las pulverizaciones deben orientarse hacia el envés de las hojas debido a que la absorción se produce de forma más efectiva (García-Serrano et al., 2010). Las características físico-químicas de la urea como son su pequeño tamaño molecular, su naturaleza no iónica y su alta solubilidad facilitan que se absorba rápidamente a través de la cutícula de la hoja, además es importante considerar su bajo coste (Lasa et al., 2012) por lo que su aplicación en esta forma resulta una opción económica para los agricultores.

Una vez absorbida la urea se hidroliza en el citosol, el NH_3 liberado puede ser transportado al cloroplasto y asimilado por la glutamina sintetasa allí presente. Además, el NH_4^+ puede ser asimilado directamente por la glutamina sintetasa citosólica, la cual se encuentra limitada a las células del parénquima del floema en las hojas. El NH_3 también puede pasar al apoplasto. Por otro lado la concentración apoplástica de NH_4^+ es un determinante importante de la volatilización de NH_3 de las plantas (Witte et al., 2002). Se ha reportado que la volatilización del NH_3 es una de las principales causas de las bajas recuperaciones de N fertilizante (alrededor del 30%-70%) después de la aplicación foliar de urea (Gooding y Davies, 1992).

2.3.2. APLICACIÓN DE ELICITORES EN EL VIÑEDO

El término elicitor fue acuñado por primera vez por Albersheim y Valent, (1978), el concepto fue aplicado a moléculas activadoras de bajo peso molecular que eran capaces de inducir la síntesis de fitoalexinas en las plantas en ausencia de un patógeno. Los elicitores por tanto son sustancias capaces de estimular las respuestas de defensa en las plantas (Boller y Felix, 2009; Radman et al., 2003), además de ayudar a la resistencia frente a un posterior ataque de un patógeno (Klarzynski y Fritig, 2001). Por este motivo se ha estudiado ampliamente su uso como alternativa a la aplicación de productos fitosanitarios (Delaunois et al., 2014). Aparte de la inducción de los mecanismos de defensa, la importancia de los elicitores radica en que en ese proceso de defensa se ven activadas las rutas biosintéticas de un gran número de metabolitos secundarios, entre ellos los compuestos fenólicos.

En el viñedo se han probado diversos elicitores, así Portu et al.(2016) investigaron el efecto de la aplicación foliar de MeJ, quitosano y extracto de levadura sobre el contenido fenólico de uvas y vinos de Tempranillo, además Gutiérrez-Gamboa estudió el efecto de estos elicitores sobre la composición nitrogenada (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017a) y sobre la composición aromática de uvas de Tempranillo (Gutiérrez-Gamboa et al., 2019). Por otro lado, Apolinar-Valiente et al. (2018) analizaron el efecto de la aplicación de benzotiadiazol (BHT), MeJ y quitosano procedente de hongos y de crustáceos sobre la composición en polisacáridos y oligosacáridos en vinos de Monastrell procedentes de uvas tratadas. Gil-Muñoz et al. (2017a) investigaron el efecto de la

aplicación foliar de MeJ y pared celular de levadura sobre el contenido en estilbenos en uvas y vinos de Monastrell y Tempranillo. Finalmente, Paladines-Quezada et al. (2019a) analizaron el efecto de la aplicación foliar de MeJ y BHT sobre el contenido polifenólico en uvas y vinos de Monastrell.

2.3.2.1. Modo de actuación de los elicitores

El mecanismo por el cual se desencadena una respuesta en la planta tras la aplicación de un elicitor es bastante similar en todos los tipos de elicitores existentes. Por otro lado cuando una planta se enfrenta a la presencia de un patógeno se consideran elicitores tanto las propias sustancias de origen patógeno como los compuestos liberados por las plantas a causa de la propia acción del patógeno (Angelova et al., 2006).

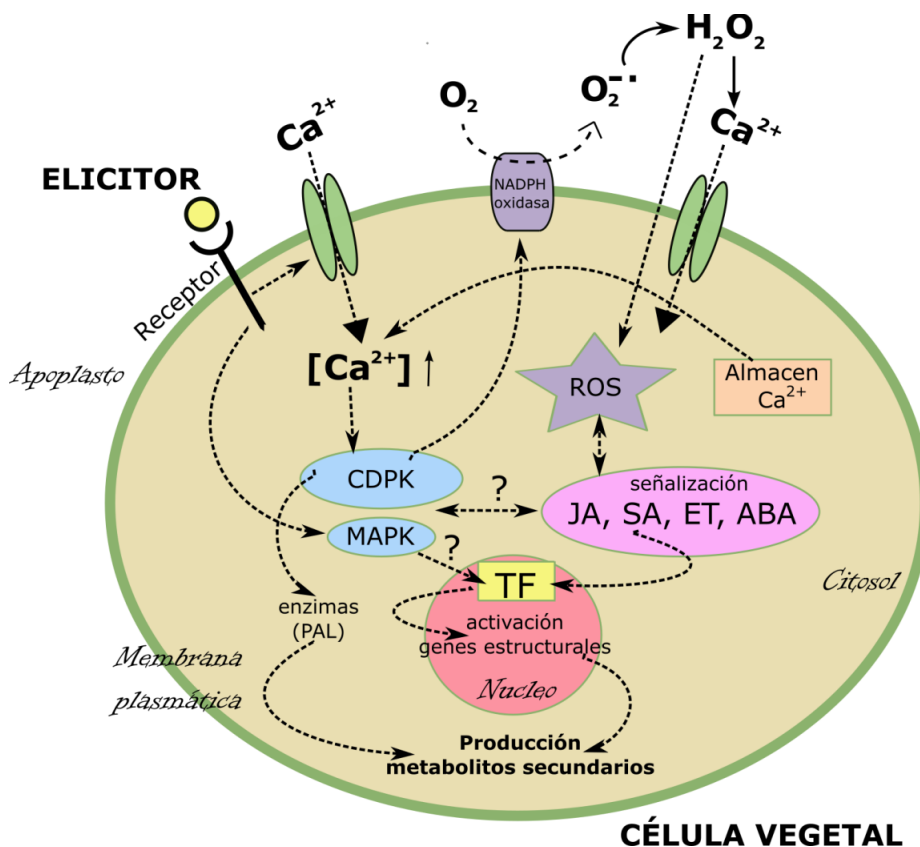


Figura 2.9. Modelo de transducción de la señal generada por elicitores.

La **Figura 2.9**, muestra un modelo propuesto de la transducción de la señal generada tras la aplicación de un elicitor y se puede resumir del siguiente modo, los receptores celulares identifican la señal provocada por el elicitor. Esta identificación produce la entrada de Ca^{2+} en la célula (Seybold et al., 2014), este Ca^{2+} es detectado por

una serie de proteínas de unión al Ca^{2+} (CDPK) que actúan como sensores (Aldon et al., 2018). Las CDPKs son las responsables de la activación de la NADPH oxidasa. Muchos factores de transcripción (TF) están asociados a sensores de Ca^{2+} que están implicados en la señalización de estrés en plantas (Ranty et al., 2016).

Otra respuesta a la identificación del elicitor es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2), además de la activación de la cascada de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Muthamilarasan y Prasad, 2013). La producción de ROS impulsa las vías de señalización de diferentes hormonas como ácido jasmónico (JA), ácido salicílico (SA), etileno (ET) y ácido abscísico (ABA) que activan la biosíntesis de metabolitos secundarios (fitoalexinas) a través de los TF, también se generan proteínas de defensa como lectinas, quitinasas, inhibidores de la α -amilasa y polifenoloxidasas (Fürstenberg-Hägg et al., 2013).

Finalmente, la biosíntesis de los flavonoides está controlada por varios genes estructurales, cada uno de ellos depende de varios TF que regulan su función (Chouhan et al., 2023).

2.3.2.2. Tipos de elicitores

Los elicitores se pueden clasificar de diversas maneras en función del criterio elegido para hacerlo. Una clasificación es en función de su origen clasificándose en bióticos, si su origen es biológico o abióticos si su origen es debido a condiciones ambientales o a la exposición a diversas sustancias que no tengan origen biológico. Por otro lado se pueden clasificar como exógenos, si se producen fuera de la planta o se aplican desde el exterior o endógenos si son producidos dentro de la célula vegetal. Otra posible clasificación es por su diferenciación en elicitores de tipo físico, químico o biológico. Algunos ejemplos de esta última clasificación se muestran a continuación (**Figura 2.10**).

Elicitores Físicos	Temperatura	Elicitores Químicos	Iones metálicos	Elicitores Biológicos	Bacterias
	Salinidad		Sales minerales		Hongos
	Estrés hídrico		Gases		Insectos
	Radiación		Fitohormonas		
	Estrés mecánico				

Figura 2.10. Clasificación de elicitores.

Elicitores físicos

Las plantas pueden verse sometidas a una gran variedad de factores que pueden causarles diversos estreses medioambientales (altas y bajas temperaturas, sequía, salinidad, radiación, etc.). Todos estos factores son potencialmente dañinos para ellas provocando la puesta en marcha de diferentes mecanismos de defensa. Dentro de los diversos factores que pueden producir la elicitación física podemos destacar los siguientes:

Temperatura, debida tanto a altas como a bajas temperaturas. En el estrés por bajas temperaturas, se desencadenan una serie de mecanismos con la finalidad de proteger a las plantas frente a una posible helada, generándose moléculas crioprotectoras como alditoles (sorbitol, ribitol, inositol), azúcares solubles (sacarosa, rafinosa) y compuestos nitrogenados de bajo peso molecular (Pro). También aumenta la lignificación y la deposición de suberina. Por otro lado las altas temperaturas pueden inducir la senescencia de las hojas (Naik y Al-Khayri, 2016).

Salinidad, que provoca la deshidratación celular causando estrés osmótico por la pérdida de agua del citoplasma. Ante esta situación se ha observado en la planta tanto la acumulación como el descenso de ciertos metabolitos secundarios (Bari y Jones, 2009).

Estrés hídrico, debido a la sequía es uno de los que más afecta al desarrollo de las plantas. Para mantener su potencial hídrico se cierran los estomas, lo que modera la pérdida de agua por transpiración. Por otro lado se reduce el crecimiento y la fotosíntesis, y se produce un aumento en la acumulación de ABA, Pro, manitol y compuestos que eliminan radicales libres (Ahmad et al., 2022). Determinados TF de *Vitis amunerensis* mejoran la resistencia a la sequía, estos TF son fuertemente inducidos por la sequía y la aplicación exógena de ABA y MeJ (Su et al., 2020).

Radiación, de diversos tipos como la luz visible, UV o radiaciones ionizantes. Se ha reportado una correlación positiva entre un aumento de la intensidad de luz y los niveles de compuestos fenólicos. Así autores como Wang et al. (2013) mostraron como la irradiación UV-C aumentó la producción de estilbenos tanto en uvas como en hojas de *Vitis vinifera*.

Estrés mecánico, pudiendo estar producido entre otras causas por el viento.

Elicitores químicos

El abanico de elicitores de tipo químico que podemos encontrar es muy amplio, pudiéndose incluir cualquier producto de naturaleza química, abarcando este grupo desde productos de síntesis a compuestos que son naturalmente sintetizados por la propia planta (fitohormonas).

Una gran cantidad de compuestos químicos han sido estudiados como elicitores tanto en cultivos celulares como en diferentes cultivos ubicados en plantaciones. Entre ellos encontramos los metales como Cu, níquel (Ni), plata (Ag), Fe, y cobalto (Co) que entre otros han mostrado su capacidad para elicitar la síntesis de metabolitos secundarios en cultivos celulares (Naik y Al-Khayri, 2016). También se han empleado sales como los fosfitos para inducir los mecanismos de defensa de diversos cultivos como el café (Monteiro et al., 2016). La aplicación de cloruro cálcico solo o en combinación con fitohormonas ha mostrado ser capaz de regular la expresión de enzimas como PAL, STS y de otras en cultivos celulares de uvas (Martins et al., 2018). Estudios llevados a cabo por Chen et al. (2020) mostraron que tratamientos foliares de sulfato de magnesio sobre viñedos de Cabernet Sauvignon cultivados en suelo alcalino incrementaron el contenido en antocianos y flavonoles totales. Por último, el empleo de ozono aplicado en pre- y en post-vendimia además de en tratamientos en el pre-almacenamiento mostró un aumento generalizado de metabolitos secundarios (Modesti et al., 2021).

En cuanto a las fitohormonas, varias de ellas han sido estudiadas como elicitores, ya que muchas se generan endógenamente en la planta cuando se ve sometida a algún tipo de ataque o estrés tanto abiótico como biótico y con la finalidad de defender a la planta de dicho ataque. Entre las fitohormonas se encuentran el JA y su éster MeJ, SA, ET, ABA, el ácido giberílico (GA) y los brasinoesteroides (BR). Aunque como se ha dicho

anteriormente estas hormonas son sintetizadas por la propia planta, existen numerosos estudios en los que se han aplicado exógenamente, entre ellos el de autores como Ruiz-García y Gómez-Plaza (2013) donde se estudió el efecto de tratamientos con ABA, MeJ y BHT detectando incrementos en algunos compuestos fenólicos en uvas de Monastrell. Por otro lado, la aplicación de SA mitigó los daños por estrés en *Vitis vinifera* cv. Giziluzum (Jalili et al., 2023).

Elicidores biológicos

Se incluyen dentro de esta clasificación aquellos compuestos que originariamente provienen de algún microorganismo y se aplican exógenamente.

La quitina es un polisacárido compuesto por subunidades de N-acetil-D-glucosamina, se encuentra en las paredes de los hongos, protistas, diatomeas, algas coralinas, esponjas, corales, gusanos, pogoñóforos, briozoos, moluscos, insectos, arañas, así como crustáceos. Existen tres formas polimorfas de quitina (alfa, beta y gamma) con diferentes características físicas y químicas. El quitosano proviene de la quitina tras su desacetilación (Tsurkan et al., 2021), en la naturaleza es mucho más raro de encontrar, se ha localizado tan solo en las paredes de algunos hongos (Badawy y Rabea, 2011). Estos compuestos presentan una serie de características que los hacen interesantes, como su nula toxicidad, alta biodegradabilidad, sus propiedades antibacterianas y antifúngicas además de su facultad de inducción de las defensas de la planta (Badawy y Rabea, 2011; Hirano, 1999).

El quitosano ha mostrado ser capaz de aumentar la producción de *trans*-resveratrol y viniferina en cultivos celulares de *Vitis vinifera* (Taurino et al., 2015), en contraste a otro estudio en uvas de Tempranillo en el que mostró apenas efecto (Portu et al., 2016).

Los extractos de levadura contienen diversos compuestos que pueden actuar como elicitors, algunos provienen de las paredes celulares como manoproteínas y glucanos, otros de la membrana plasmática como lípidos, esteroides y proteínas (Kapteyn et al., 1999). Portu et al. (2016) encontraron que la aplicación de un extracto de levadura en un viñedo de la variedad Tempranillo, indujo la biosíntesis de compuestos fenólicos

en sus uvas. Gil-Muñoz et al. (2017a) observaron tras su aplicación en viñedos de Monastrell y Tempranillo un incremento en la síntesis de estilbenos, aunque con dependencia de la variedad y la añada.

Proteínas provenientes de microorganismos también han demostrado su poder de elicitación, así estudios realizados sobre plantas de arroz en condiciones de laboratorio tratadas con las proteínas Hrip 1 (proveniente de *Alternaria tenuissima*) y PebB1 (proveniente de *Beauveria bassiana*) mostraron que la expresión génica asociada a la producción de JA, SA, y ET fue modificada en las plantas tratadas. Por otro lado hojas de viñedo inoculadas con *Funneliformis mosseae* mostraron un incremento en compuestos orgánicos volátiles (Velásquez et al., 2020).

Finalmente, la aplicación de *Trichoderma* spp. como bioestimulante también ha sido estudiada, sobre todo en condiciones in vitro, mostrando diversas propiedades como la capacidad de inhibir hongos debido a la generación de ciertas enzimas, además de causar una activación de las enzimas de defensa de la planta como peroxidasa y PAL (Cataldo et al., 2022).

2.3.2.3. Metil jasmonato

El MeJ es el éster metílico del JA (**Figura 2.11**) ampliamente distribuido en el reino vegetal. Su estructura química presenta dos carbonos quirales, con lo cual el MeJ puede existir en cuatro formas estereoisoméricas formadas por dos pares de enantiómeros, por un lado el isómero (+)-(3R,7S) y su imagen especular(-)-(3S,7R) conocidos como (+) y (-)-epi-MeJ, por otro lado el segundo par de enantiómeros (-)-(3R,7R) y (+)-(3S,7S) conocidos como (-) y (+)-MeJ (Flores et al., 2013). Es una fitohormona lipídica y fue detectado por primera vez como un compuesto presente en el aceite esencial de la flor de jazmín (*Jasminum spp*). El MeJ se sintetiza a través de la vía de la lipoxigenasa (Sembdner y Parthier, 1993). Está implicado en procesos de desarrollo, crecimiento y en diferentes procesos fisiológicos, como la fertilidad de las plantas, la formación de órganos de almacenamiento, la elongación de las raíces, la maduración, el enrollamiento de los zarcillos de la vid y senescencia de los frutos, la resistencia oxidativa y la interacción con otras fitohormonas (Avanci et al., 2010; Browse, 2009; Depuydt y Hardtke, 2011; Wasternack y Hause, 2013).

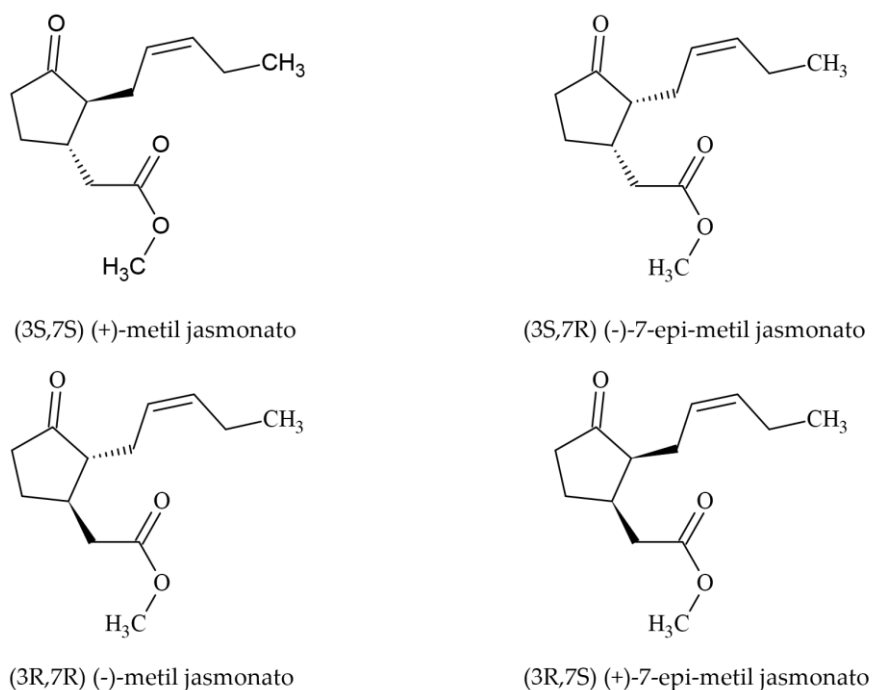


Figura 2.11. Estructuras de los cuatro estereoisómeros de MeJ (Flores et al., 2013).

También es capaz de activar mecanismos de defensa en respuesta a heridas por patógenos y el estrés ambiental (Ballaré, 2011). Por otro lado actúa como elicitador del metabolismo secundario de las plantas (De Geyter et al., 2012). El MeJ desencadena los TF (del tipo bHLH) que regulan la expresión de los genes que codifican una serie de enzimas responsables de la síntesis de compuestos fenólicos, como son PAL, CHS, UFGT y STS (Belhadj et al., 2008). Otros investigadores han documentado el papel de MeJ en la regulación de la expresión génica en diversos cultivos como *Arabidopsis* (Sasaki et al., 2001), vid (Marchive et al., 2013) y arroz (Liu et al., 2012).

Respecto a su aplicación en el viñedo, desde hace unos años se han venido realizando numerosos estudios basados en las aplicaciones foliares de este compuesto. En dichos estudios se ha investigado el incremento de la síntesis de metabolitos secundarios como son los antocianos, flavonoles, PAs, estilbenos y los compuestos aromáticos. Los resultados obtenidos dependieron en gran medida de la añada y también de la variedad estudiada. Así Larronde et al. (2003) encontraron un importante incremento en la concentración de estilbenos en uvas y hojas de la variedad Syrah. Por otro lado, estudios en la variedad Monastrell llevados a cabo por diferentes autores han mostrado un incremento general en antocianos, flavonoles y PAs en sus uvas aunque

estos resultados fueron diferentes en función de la añada (Paladines-Quezada, 2021; Ruiz-García et al., 2012; Ruiz-García y Gómez-Plaza, 2013). También, Gil-Muñoz et al. (2017b) en un estudio llevado a cabo sobre uvas Syrah, Merlot y Tempranillo mostraron un incremento en la concentración de antocianos totales, un descenso en el contenido en flavonoles y diferente comportamiento en la cantidad de taninos encontrada dependiendo de la variedad.

Finalmente, en la gran mayoría de estudios los resultados obtenidos en las uvas se han trasladado de forma diferente a los vinos lo que ha generado ciertas dudas respecto a la eficiencia en la mejora de calidad de los vinos obtenidos con uvas tratadas con MeJ.

2.4. NANOTECNOLOGÍA

La nanotecnología se podría definir como la ciencia de la manipulación, organización, fabricación e ingeniería de productos y materiales a nanoescala (Saritha et al., 2022) que comprende materiales con tamaño de partícula comprendido entre 1 y 100 nm en al menos una dimensión (**Figura 2.12**). El concepto de nanotecnología fue introducido por primera vez por Richard Feynman, Premio Nobel de Física, en 1959 en su discurso titulado “There's Plenty of Room at the Bottom”(Feynman, 2011) .

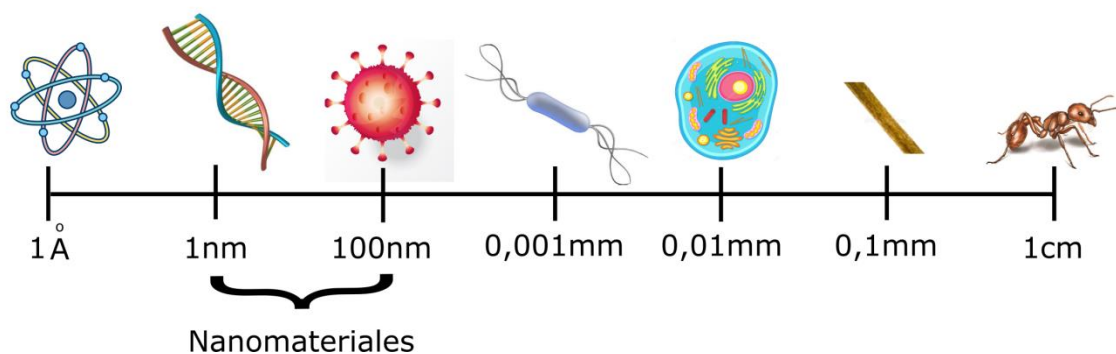


Figura 2.12. Nanoescala.

Desde entonces y hasta la actualidad el desarrollo de la nanotecnología ha sido muy importante, de modo que debido a este gran desarrollo la propia Unión Europea en 2011 estableció en una de sus recomendaciones una definición para los nanomateriales como: “un material natural, accidental o fabricado que contiene partículas, sueltas o formando un agregado o aglomerado, y en el que el 50 % o más de las partículas en la granulometría numérica presenta una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaños comprendido entre 1 y 100 nm”(Comision Europea, 2011).

El gran interés de las nanopartículas radica en su pequeño tamaño al situarse entre el de los materiales macroscópicos y el de las estructuras atómicas o moleculares. Las propiedades de los materiales cambian al aproximarnos a la nanoescala, además pueden ser diferentes dependiendo del tamaño de la nanopartícula, a modo de ejemplo una disolución de nanopartículas de Ag presenta distinta coloración (hasta 7 colores diferentes) dependiendo del tamaño de la nanopartícula (Murphy y Jana, 2002). Entre algunas de las propiedades de las nanopartículas encontramos su gran área superficial, magnetismo, efectos cuánticos, gran conductividad térmica y eléctrica, excelentes propiedades mecánicas, buenos soportes para catálisis y actividad antimicrobiana (Baig et al., 2021). Además estas propiedades son debidas a su pequeño tamaño, a su composición química, la estructura superficial, estabilidad, forma y aglomeración. Existen diversas clases de nanopartículas dependiendo de su origen químico y estructura, (Baig et al., 2021).

1. Nanomateriales a base de carbón (C) (fulerenos, nanotubos, grafeno, nanodiamantes, puntos cuánticos, nanoconos).
2. Materiales nanoporosos, que se clasifican según el tamaño de poro en macroporosos, mesoporosos y microporosos.
3. Otros materiales bidimensionales [siliceno, MXenos (carburos, nitruros o carbonitruros de metales de transición), de elementos del grupo 15 (arsénico (As), antimonio (Sb),...) y 2D-MORFs (nano placas de redes organometálicas)].
4. Nanoestructuras basadas en metales (Ag, Oro (Au), Óxido de Zinc (ZnO), Óxido de cobre (II) (CuO), Óxido de titanio (IV) (TiO₂),.....).
5. Nanopartículas con núcleo.

La gran diversidad del tipo de nanopartículas existentes ha dado lugar a una amplia gama de aplicaciones en diversos campos, como la agricultura, el procesamiento de alimentos, las ciencias medioambientales y la medicina (Haris et al., 2023). En nanomedicina y nanofarmacología se han desarrollado nanopartículas como sistemas de administración inteligentes, pudiéndose cargar con un fármaco u otra sustancia activa para su administración en lugares específicos de un organismo vivo (Wang et al., 2016) en cambio en otros campos como la agricultura su desarrollo ha sido más tardío.

2.4.1. NANOTECNOLOGÍA EN AGRICULTURA

Los fines que se persiguen con el uso de nanotecnología en agricultura son diversos, entre ellos estarían el desarrollo de agroquímicos más eficientes y menos contaminantes (nanoformulaciones), creación de dispositivos que puedan ayudar a detectar el estrés biótico o abiótico antes de que pueda afectar a la producción (nanosensores), o nuevas técnicas de manipulación genética que permitan una mayor eficacia en los programas de mejora vegetal (Pérez-de-Luque y Hermosín, 2013).

Respecto a las nanoformulaciones, el objetivo que se persigue es que sean capaces de liberar los agroquímicos de manera controlada y precisa, además de que sean capaces de protegerlos frente a las condiciones medioambientales y evitar pérdidas por degradación, volatilización, escorrentía o lixiviado, entre otras. Por otro lado, es necesario conocer como las plantas absorben las nanopartículas, como se mueven dentro de las mismas y cómo reaccionan con las células vegetales (Pérez-de-Luque, 2017). Tras la aplicación foliar, las nanopartículas deben ser absorbidas por la planta a través de la hoja. A priori existen dos vías de entrada, la cutícula o los estomas presentes en la superficie de la hoja. El tamaño de la nanopartícula va a ser el factor clave para una absorción exitosa ya que mientras que el tamaño de los canales presentes en la cutícula son inferiores a 4,8 nm, el de los estomas tienen un tamaño de 10-100 nm, (Wang et al., 2023). La absorción va a depender de la composición química de la nanopartícula, de su morfología y de su tamaño (Pérez-de-Luque, 2017), además también de la especie de planta sobre la que se aplique.

En segundo lugar, una vez absorbidas por la planta, el movimiento dentro de la misma puede ser de dos modos diferentes: la vía apoplástica, en el que la nanopartícula se movería por difusión simple a través de los espacios extracelulares (Sattelmacher, 2001) o a través de la vía simplástica en la que el transporte se produce por ósmosis entre células adyacentes y a través de los plasmodesmos (canales que atraviesan la pared celular y conectan los citoplasmas de las células adyacentes) (Roberts y Oparka, 2003). En este movimiento por el interior de la planta finalmente se alcanzaría el floema y/o el xilema para distribuirse por el resto de la planta. En último lugar, las nanopartículas deben de entrar dentro de la célula si queremos que actúen sobre ella, aunque puede ser que el interés no sea éste, sino que busquemos que la nanopartícula actúe sobre alguna bacteria u hongo y así poder tratar enfermedades sistémicas o infecciosas (Pérez-de-Luque, 2017).

Entre las diferentes aplicaciones de la nanotecnología en agricultura está su uso como nanopesticidas que permiten reducir la dosis de plaguicidas y la frecuencia de aplicación, permitiendo una gestión más sostenible de las plagas (Usman et al., 2020). Así el uso de clorfenapir asociado con nanopartículas de sílice contra el gusano del algodón, mostró una actividad dos veces superior a la del clorfenapir en modo de micropartículas (Song et al., 2012). También se ha contrastado el efecto sinérgico de óxido de grafeno con diferentes insecticidas contra el barrenador asiático del maíz, permitiendo en algunos casos doblar su toxicidad por contacto (Wang et al., 2019). Además nanopartículas obtenidas a partir de extracto de corteza de limón y cargadas con óxidos de zinc y cobre son capaces de inhibir el crecimiento de *Alternaria citri*, responsable de la podredumbre negra de los cítricos (Sardar et al., 2022).

Otra aplicación cada vez más utilizada es su uso como nanofertilizantes. De este modo, tanto la aplicación foliar como en el suelo de nanopartículas de ZnO aumentó el crecimiento, los pigmentos fotosintéticos y la actividad antioxidante en maíz (Azam et al., 2022). Por otro lado, se han realizado ensayos en trigo que han demostrado que el uso de nanofertilizantes que contienen NPK mantienen una eficacia similar al tratamiento convencional con la ventaja de que la dosis aplicada de N se redujo en un 40% (Ramírez-Rodríguez et al., 2020). Además, estudios de dos suelos en laboratorio

aplicando un nanofertilizante que contenía P, ha mostrado que permite una liberación de P de forma gradual además de no perjudicar a los microorganismos del suelo (Ciurli et al., 2022).

Otro de los usos al que está siendo destinado está siendo el de la fabricación de nanobiosensores que contienen nanomateriales que actúan como biorreceptores para detectar uno o varios analitos. Los nanobiosensores funcionan mediante un mecanismo de apagado/encendido, pudiendo detectar hasta partes por trillón (ppt) con la ventaja de que limitan el efecto matriz basándose en la nanoformulación (Antonacci et al., 2018).

Finalmente, se están llevando a cabo estudios en los que se están empleando nanomateriales para el tratamiento de suelos contaminados y en donde las nanopartículas afectan a la movilidad, transformación y toxicidad de contaminantes orgánicos e inorgánicos (Usman et al., 2020).

2.4.2. APLICACIÓN DE NANO-PARTÍCULAS EN EL VIÑEDO

El uso de nanopartículas en el viñedo es más reciente que en otros cultivos agrícolas, aunque en los últimos años se han realizado diversos estudios utilizando este tipo de materiales con diferentes fines.

Entre las diversas aplicaciones llevadas a cabo encontramos el empleo de nanotecnología como alternativa al uso de fungicidas convencionales. La patente desarrollada por Schneider et al. (2010) en la que se utilizaban nanopartículas de Cu ha mostrado una gran eficacia frente a la infección por *Plasmopara vitícola* (*mildiu*), reduciendo drásticamente el porcentaje de área dañada por hoja en los distintos ensayos llevados a cabo. También se han empleado nanoestructuras de hidroxapatito que son capaces de aumentar la bioactividad de los iones de Cu, el ensayo se realizó en primer lugar in vitro contra *Botrytis cinerea* y posteriormente en plantas en invernadero, contra *Plasmopora vitícola* (Battiston et al., 2019). Además, para evitar el ataque de hongos en los cortes de poda se ha desarrollado un adhesivo a base de nanofibras de proteína de soja-polivinil alcohol y proteína de soja-policaprolactona (Sett et al., 2015). Finalmente, para el control integrado de plagas como *Lobesia botrana* también se han desarrollado

nanofibras biodegradables de poliéster que permiten una liberación prolongada de la feromona correspondiente (Bansal et al., 2012).

Dentro de los usos como fertilizante encontramos el estudio llevado a cabo por Sabir et al. (2014) quienes aplicaron un fertilizante en modo de nanocalcita, encontrando una mejora del crecimiento del viñedo, mayor producción y una mejor calidad de las uvas y del contenido en nutrientes en la hoja. Por otro lado, Pérez-Álvarez et al. (2021) estudiaron el efecto de nanopartículas de fosfato de calcio amorfo que habían sido cargadas con urea sobre el contenido en aminoácidos en el mosto de uvas de Tempranillo, observando que el resultado fue similar al obtenido con el tratamiento convencional con urea pero empleando una menor dosis. Por último, Mahdavi et al. (2022) estudiaron el efecto de la fertilización de *Vitis vinífera L.* con nano ZnO y nanoquelato de Zn, comparándolo con el empleo de sulfato de zinc ($ZnSO_4$), obteniendo los mejores resultados respecto a la producción y a la calidad de las uvas cuando se utilizó el nanoquelato de Zn.

Además, se han llevado a cabo trabajos en los que las nanopartículas se han empleado para la administración de elicitores. Entre ellos el empleo de MeJ cargado sobre nanotransportadores de poliácido láctico-co-glicólico (PLGA) sobre cultivos celulares, observándose una síntesis de estilbenos más rápida que en aquellas muestras en las que se aplicó MeJ de manera convencional (Chronopoulou et al., 2019). También en los últimos años se han realizado estudios de la aplicación de nanopartículas de fosfato cálcico cargadas con MeJ a modo de elicitador sobre viñedos, así Parra-Torrejón et al. (2021) mostraron la liberación gradual y prolongada de MeJ utilizando estas nanopartículas, consiguiendo un incremento en estilbenos en uvas de Monastrell. Por otro lado, nosotros estudiamos el efecto de nano-MeJ sobre el perfil aromático de vinos de Monastrell encontrando que tanto el tratamiento convencional como el nanotratamiento incrementaron la composición en ésteres que confieren aromas afrutados (Giménez-Bañón et al., 2022). En otro estudio sobre el perfil aromático de uvas de Tempranillo se detectó un incremento en los terpenos y en los bencenoides (Marín-San Román et al., 2023). Además, Gil-Muñoz et al. (2023) en un estudio sobre maduración de uva Monastrell en la que se aplicaron nanopartículas de fosfato cálcico con dos morfologías

diferentes, encontraron pequeñas diferencias entre los resultados de las dos morfologías, que promovieron un retraso significativo en la acumulación de azúcar y un aumento de los diferentes compuestos fenólicos en comparación con la uva control. Finalmente, otra investigación sobre uvas Tempranillo tratadas con las mismas nanopartículas en el que se pretendía estudiar su impacto sobre la producción de compuestos fenólicos, mostró un incremento en ácidos hidroxicinámicos, flavanoles, flavonoles y estilbenos, aunque el incremento dependió de la añada estudiada (Garde-Cerdán et al., 2023a).

Otros elicitores aplicados en forma de nanopartículas han sido el SA, el tratamiento fue aplicado sobre sobre uvas de Red Sultana (*Vitis vinifera* L.) antes del envero en formato de nanopartículas de quitosano obteniéndose un incremento en los compuestos fenólicos (Khalili et al., 2022) También se ha estudiado el uso de nanopartículas de óxido de grafeno funcionalizadas con Pro para aliviar el estrés oxidativo producido por la salinidad en plantas de *Vitis vinifera* L. cv Sultana (Zahedi et al., 2023).

Aparte de estos usos en el viñedo, desde hace algunos años se lleva estudiando el empleo de diversas nanopartículas en técnicas enológicas con diversas finalidades. Entre ellas estaría la eliminación de biomasa procedente de levaduras tras la fermentación alcohólica y también tras la fermentación maloláctica, para ello se emplearon tanto levaduras como bacterias funcionalizadas con nanopartículas superparamagnéticas de γ -Fe₂O₃ (Berovic et al., 2014; Dušak et al., 2016). Además, otro tipo de nanopartículas magnéticas se han estudiado para la eliminación de proteínas (Mierczynska-Vasilev et al., 2019) y aminas biógenas (Bettini et al., 2015) en vinos. Otro uso importante llevado a cabo ha sido la eliminación de aromas indeseados como 4-etilfenol y el 4-etilguayacol mediante nanofiltración (Ugarte et al., 2005). El uso de nanomembranas además se ha probado para la eliminación de ácido acético obteniéndose buenos resultados, aunque con la consecuencia colateral de que se elimina parte del alcohol (Temido et al., 2015). También se ha probado el uso de nanopartículas para prevenir la acción de microorganismos dañinos para el vino, con la finalidad de poder sustituir al anhídrido sulfuroso (SO₂). Entre estos estudios se encuentra el llevado a cabo por Izquierdo-Cañas et al. (2012), quienes observaron el efecto antiséptico de

nanopartículas de Ag sobre el mosto antes de la fermentación y comprobaron que fueron capaces de controlar el desarrollo de bacterias acéticas y bacterias lácticas, aunque no de controlar la oxidación en vino blanco de Merseguera. Por otro lado, Garde-Cerdán et al. (2014b) estudiaron el uso de un complejo coloidal de Ag sobre mosto de Tempranillo antes de la fermentación alcohólica y durante el almacenamiento del vino obtenido. El tratamiento con el complejo coloidal resultó ser más efectivo que el tratamiento con SO₂ sobre el crecimiento de bacterias acéticas, además de no afectar al desarrollo de la fermentación y a las cualidades organolépticas del vino. Sin embargo los tratamientos con los coloides de Ag no fueron capaces de controlar el desarrollo de bacterias lácticas durante el almacenamiento del vino.

Finalmente, se está estudiando el uso de los propios residuos de la industria enológica en la obtención de nanopartículas para diversos usos, de este modo se han obtenido mediante síntesis verde nanopartículas de Ag empleando el extracto en agua de orujos de uva blanca para su uso como agente antifúngico y como biodetectores (Carbone et al., 2019). Además, a partir de extracto de raspón se ha logrado la síntesis verde de nanopartículas de Ag para la modificación de electrodos para la determinación simultánea de Pb(II) y Cd(II) (Bastos-Arrieta et al., 2018).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Los estudios realizados en este trabajo se llevaron a cabo durante tres años consecutivos: 2019, 2020 y 2021. Se realizó la aplicación de tratamientos foliares con un fertilizante: urea y con un elicitador: MeJ, en forma convencional y soportados ambos sobre nanopartículas de hidroxapatito.

3.2. MATERIAL VEGETAL

Todos los tratamientos se realizaron en vides *Vitis vinifera* L. cv. Monastrell, injertadas sobre patrón Richter 110 (*Vitis rupestris* x *Vitis berlandieri*), con una edad de 14 años. El sistema de conducción fue en vaso alto, con una distribución de la plantación de 3 m entre las filas y 0,8 m entre las plantas de una misma fila (4167 cepas/ha). La orientación fue Este-Oeste. El sistema de riego fue por goteo realizando aportaciones mínimas según la climatología de cada año.

3.3. UBICACIÓN DEL VIÑEDO Y CARACTERÍSTICAS EDAFOCLIMÁTICAS

3.3.1. UBICACIÓN DEL VIÑEDO

El viñedo utilizado estaba situado en la Finca Experimental Hacienda Nueva, en el término municipal de Cehegín (Murcia, España) (latitud 38.11179 y longitud -1.6808) a una altitud de 432 m. s.n.m., en el Noroeste de la Región de Murcia.

3.3.2. CARACTERÍSTICAS EDAFOLÓGICAS

La parcela en la que se llevaron a cabo los tratamientos se caracteriza por tener una litología de arcillas abigarradas, yesos en facies “keuper” y areniscas (Instituto Geológico Nacional) como se aprecia en la **Figura 3.1**. El suelo es una marga arcillosa de 80 cm de profundidad (33% arcilla, 38% limo y 30% arena) muy pobre en materia orgánica (1,12%) (Romero-Azorín y García-García, 2020).

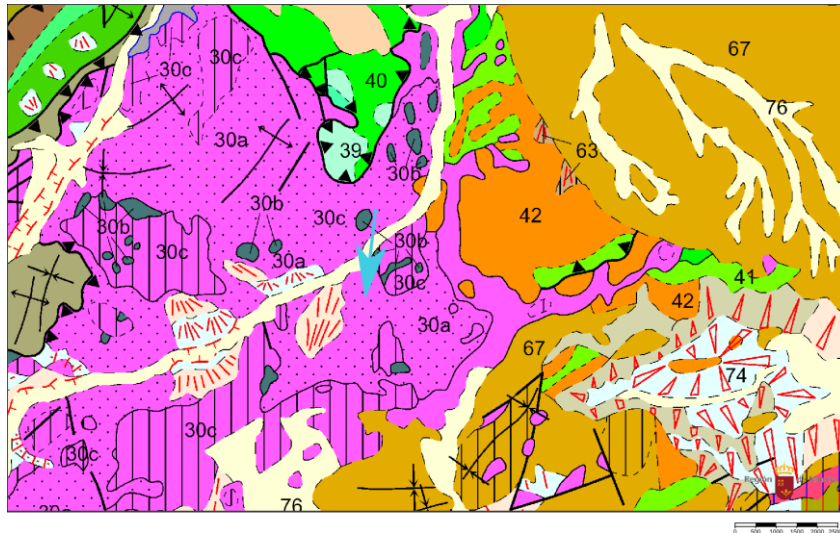


Figura 3.1. Mapa litológico de la zona donde están plantadas las vides objeto de estudio (Instituto Geológico Nacional).

3.3.3. DATOS CLIMATOLÓGICOS

El clima en esta zona es de tipo Mediterráneo semiárido, con veranos largos, secos y calurosos e inviernos cortos y fríos. La precipitación media anual suele ser inferior a los 400 mm al año (Romero-Azorín y García-García, 2020).

En las **Figuras 3.2** (A, B y C) se muestran los datos de las precipitaciones y temperaturas medias mensuales correspondientes a los años de estudio.

Los datos climáticos se recogieron de la estación meteorológica CR32 (Campbell mod. CR 10X), perteneciente al Sistema de Información Agraria de Murcia (SIAM) y ubicada en la misma Finca Experimental Hacienda Nueva.

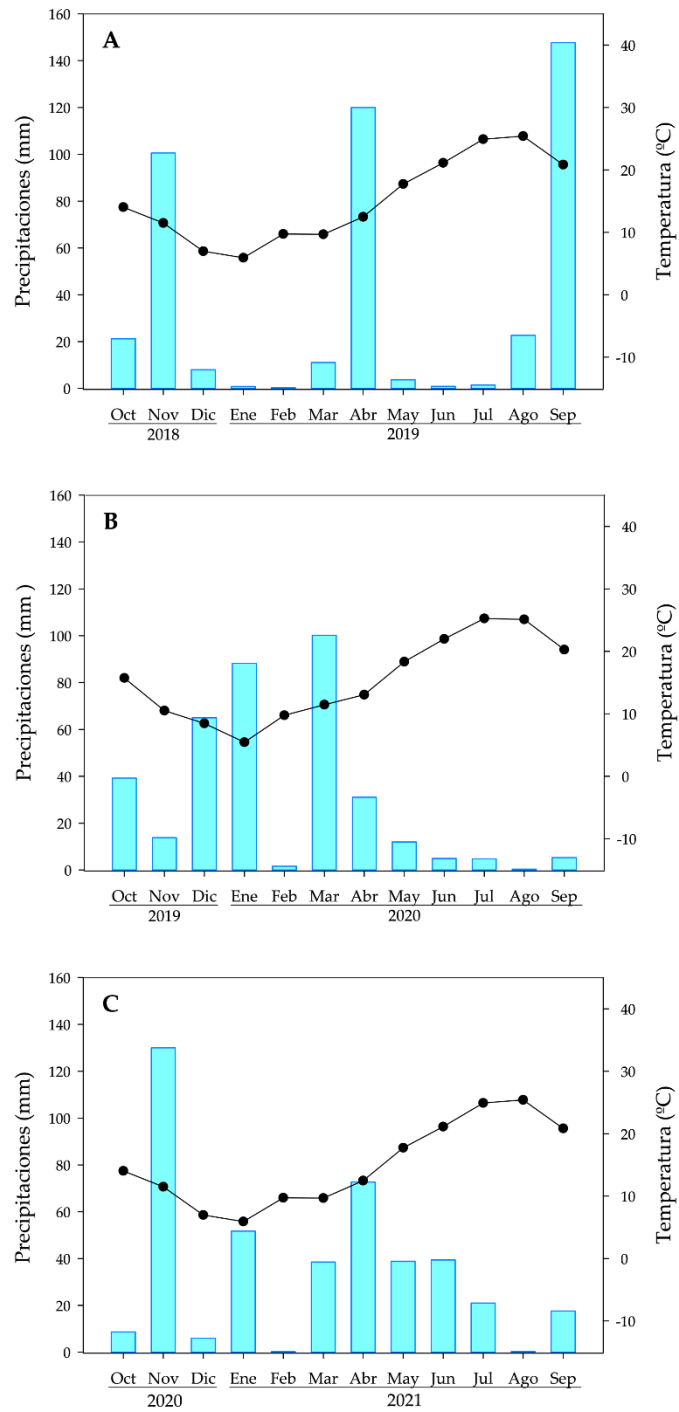


Figura 3.2. Precipitaciones (barras) y temperatura (puntos) media mensual durante los tres años de estudio A: 2018/2019, B: 2019/2020 y C: 2020/2021.

3.4. CONTROL DE MADURACIÓN DE LA UVA

El control de maduración de las uvas se realizó desde la segunda semana de agosto hasta el momento de vendimia, con muestreos semanales. Para ello, en cada muestreo se cortaron pequeños racimos de unas 4/5 bayas de manera aleatoria en diversas vides hasta alcanzar unos 300 gramos. Las analíticas realizadas fueron las mismas que para la caracterización de la uva a la entrada en bodega (apartado 3.6.1), los datos de maduración están recogidos en la **Tabla 7.1** (7. Anexos).

El momento de vendimia se determinó teniendo en cuenta tanto los parámetros analíticos como el aspecto de la pepita de la uva, así como la cata de la piel de las uvas. Las fechas de vendimia fueron: el 23/09/2019, el 29/09/2020 y el 4/10/2021.

3.5. TRATAMIENTOS

3.5.1. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS

La síntesis y caracterización de nanopartículas fue llevada a cabo por el equipo Bionanomet liderado por el Dr. José Manuel López Delgado, perteneciente al Departamento de Química Inorgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada.

3.5.1.1. Síntesis de nanopartículas con urea superficial (nano-urea)

Se sintetizaron nanopartículas de fosfato cálcico amorfo (ACP) a partir de un método de precipitación a temperatura ambiente previamente reportado por Ramírez-Rodríguez et al. (2020). Resumiendo, este método consistió en mezclar dos volúmenes iguales de dos disoluciones (1:1 v/v): (A) CaCl_2 (0,2 M) y Na_3Cit (0, M) y (B) K_2HPO_4 (0,12 M) y Na_2CO_3 (0,1 M). La mezcla se mantuvo en agitación durante 5 minutos. Posteriormente, el precipitado producido se recogió y lavó por centrifugación con agua ultrapura (6000 rpm, 10 min, 10 °C).

Para la adsorción de la urea, se suspendieron 200 mg de ACP en 6 ml de una disolución de urea 4,3% (m/v). La mezcla permaneció 24 h en agitación a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, las nanopartículas cargadas con urea (nano-urea) se recogieron y lavaron por centrifugación con agua ultrapura (12000 rpm, 15 min, 18 °C).

Estas nanopartículas permanecieron a 4°C hasta el momento de llevar a cabo las aplicaciones.

3.5.1.2. Síntesis de nanopartículas con MeJ superficial (nano-MeJ)

Se sintetizaron nanopartículas de ACP utilizando el mismo método descrito en el punto anterior (3.5.1.1).

Para la adsorción del MeJ, se suspendieron 200 mg de ACP en 10 mL de agua ultrapura y a continuación, se añadieron 20 mg de MeJ. Esta mezcla permaneció en agitación a temperatura ambiente durante 24 h. Las nanopartículas cargadas con MeJ (nano-MeJ) se recogieron tras lavado con agua ultrapura y centrifugación (12000 rpm, 15 min, 18 °C). Permanecieron a 4°C hasta el momento de llevar a cabo las aplicaciones.

3.5.2. PREPARACIÓN Y APLICACIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Los tratamientos se aplicaron en dos momentos, el primero en el envero (**Figura 3.3**), momento en el que el 50% de la uva había cambiado de color, y el segundo una semana después.



Figura 3.3. Aspecto de las uvas en el momento del envero.

Cada tratamiento se aplicó por triplicado, utilizando 10 plantas para cada una de las repeticiones. También se utilizó un control sobre el que solo se aplicó agua. Las distintas disoluciones acuosas de los tratamientos se prepararon en el laboratorio el día anterior a su aplicación (**Tabla 3.1**).

Tratamiento	Concentración
Control	Agua
MeJ	2,24 g/L
Nano-MeJ	0,224 g/L (equivalente en MeJ)
Urea	4,8 g/L
Nano-urea	0,6 g/L (equivalente en urea)

Tabla 3.1. Tratamientos aplicados.

Todos los tratamientos, incluido el control fueron preparados con Tween 80 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) (0,1% v/v), como agente surfactante no iónico y emulsionante, con la finalidad de obtener una suspensión homogénea y asegurar una mejor absorción por parte de la planta.

La aplicación se realizó con la ayuda de un pulverizador eléctrico a batería Matabi Evolution 15 L (Goizper Group, España). Sobre cada planta se aplicaron 200 ml de disolución (**Figura 3.4**).



Figura 3.4. Aplicación de tratamientos.

3.6. DETERMINACIONES EN LAS UVAS

3.6.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS UVAS

A la llegada de la uva a la bodega se tomó una muestra representativa de aproximadamente 300 gramos de cada una de las repeticiones. Se cortaron los granos por el pedúnculo, con precaución de no romper la baya, se contaron y pesaron para calcular posteriormente el peso de 100 granos. Se trituraron durante dos minutos con un Robot Coupé modelo GT 550 Blender (Francia), evitando la ruptura de las pepitas. El triturado se centrifugó a 4500 rpm durante 15 minutos (Centrifuga Meditronic, J.P. Selecta, España) y con el mosto obtenido se analizaron los siguientes parámetros enológicos: sólidos solubles totales (°Bé), pH, AT, ácido tartárico y ácido L-málico. Todas las analíticas se realizaron por duplicado.

3.6.1.1. Grado Baumé

Se empleó un refractómetro digital Atago RX-5000X (Atago CO., LTD, Japón) con sensor de temperatura incorporado. Previamente se ajustó a cero con agua destilada.

3.6.1.2. pH

Se determinó con un valorador automático Schott, alpha plus TA20 (SCHOTT-GERÄTE GmbH, Alemania) utilizando un electrodo de vidrio (Xylem analytics Germany GmbH, Alemania) y siguiendo el método oficial (OIV-MA-AS313-15).

3.6.1.3. Acidez total

Fue determinada por potenciometría con un valorador automático Schott, alpha plus TA20 (SCHOTT-GERÄTE GmbH, Alemania) utilizando un electrodo de vidrio (Xylem analytics Germany GmbH, Alemania) según el método oficial (OIV-MA-AS313-01). Los resultados fueron expresados en g/L de ácido tartárico.

3.6.1.4. Ácido tartárico

Se determinó siguiendo el método colorimétrico Rebelein con algunas modificaciones (Vidal y Blouin, 1978), para ello se empleó un analizador automático

CETLAB 600 (Microdom, Francia) (Resolución OIV/OENO 391/2010). Los resultados obtenidos fueron expresados en g/L de ácido tartárico.

3.6.1.5. Ácido L-málico

Se empleó un analizador automático CETLAB 600 (Microdom, Francia), con el uso de un test enzimático y siguiendo el método oficial (OIV-MA-AS313-26). Los resultados obtenidos fueron expresados en g/L de ácido málico.

3.6.2. ANÁLISIS Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR DE LA PIEL

3.6.2.1. Aislamiento de paredes celulares

A la llegada de la uva a la bodega, se tomó una muestra representativa de aproximadamente unos 100 gramos de uva. Se cortaron las bayas por el pedúnculo y se congelaron a -20 °C. Una vez congeladas se pelaron con un bisturí, separando la piel y congelando ésta de nuevo a -20 °C. Las pieles congeladas se liofilizaron en un liofilizador Cryodos 50 (IMA-TELSTAR, España) y posteriormente se trituraron en un molinillo de bolas (Vibratory Ball Mill Pulverisette 0, Cryo-box, Alemania) para pulverizarlas.

Para el aislamiento de las paredes celulares de la piel se consideró el método de separación de sólidos insolubles en alcohol de De Vries et al. (1984), con algunas modificaciones propuestas por Paladines-Quezada (2021). En primer lugar se colocó 3 g de piel pulverizada en un vaso de precipitado (**Figura 3.5(A)**) con 50 mL de agua milli-Q, a continuación se hirvieron durante 5 minutos con agitación, con el propósito de inactivar enzimas, para ello se utilizó una placa calefactora HC1202 (Bibby Sterilin, Francia). La mezcla obtenida se centrifugó a 11000 rpm en una centrífuga (Eppendorf 5810R, Alemania) a 25 °C durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el sólido se resuspendió en etanol al 70% (ACS, ISO, Panreac) caliente (40-45°C), durante 30 minutos con agitación constante, manteniendo la temperatura. Dicha extracción con etanol al 70% se repitió hasta que no se detectaron azúcares en el sobrenadante realizando un test con fenol y ácido sulfúrico (Dubois et al., 1956). La presencia de azúcares se manifiesta por una coloración anaranjado-rosada que desaparece con la ausencia de los mismos.

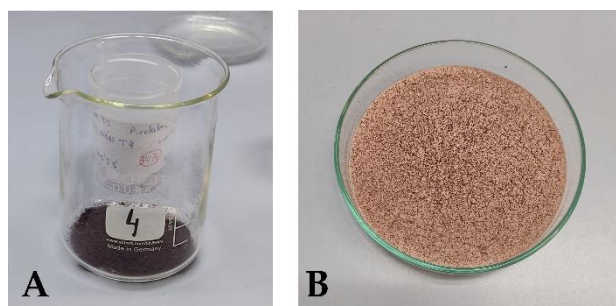


Figura 3.5. A) Piel liofilizada pulverizada, B) Residuo no soluble en alcohol.

El residuo final obtenido se lavó una vez con etanol absoluto (ACS, ISO, Panreac), y dos veces con acetona (ACS, ISO, Panreac). En este último paso se centrifugó de nuevo, se eliminó la acetona sobrenadante y se traspasó el residuo a una placa Petri donde se dejó bajo corriente de aire durante toda la noche para su completo secado (**Figura 3.5(B)**). A continuación se recogió y guardó la muestra en un desecador hasta la realización de las diferentes analíticas.

3.6.2.2. Análisis de los componentes de la pared celular

A partir del residuo no soluble en alcohol, es decir la pared celular aislada anteriormente, se determinaron los siguientes componentes: proteínas, compuestos fenólicos, azúcares neutros (glucosa no celulósica y glucosa celulósica) y ácidos urónicos. Estos análisis se realizaron por cuadruplicado.

Se llevaron a cabo tres tipos de hidrólisis para obtener las muestras sobre las que se realizaron las analíticas mencionadas anteriormente, una hidrólisis de Seaman, una hidrólisis ácida y una hidrólisis alcalina.

La **hidrólisis de Seaman** consiste en realizar primero una pre-hidrólisis y posteriormente una hidrólisis ácida, con ello se consigue hidrolizar los enlaces glicosídicos fuertes que se encuentra unidos a la celulosa:

- *Pre-hidrólisis*: en un tubo pirex con tapón de rosca se pesaron 10 mg de pared celular a la que se le añadieron 0,45 mL de ácido sulfúrico al 72% (ISO, Panreac). La mezcla se agitó en un vortex y permaneció 1 hora en un baño de agua a 30°C (Selecta, Unitronic OR, España).

- *Hidrólisis*: a la muestra previamente pre-hidrolizada se añadieron con precaución 4,95 mL de agua destilada. Se agitó suavemente la mezcla y se introdujo en una estufa Memmert U40 (Alemania) durante 3 horas a 100 °C. Posteriormente, 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). Una porción del sobrenadante obtenido (2 mL) se traspasó a un microtubo con rosca y se volvió a centrifugar, en este caso a 10000 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania), obteniéndose el **sobrenadante 1**.

La siguiente hidrólisis fue una **hidrólisis ácida**, para ello se pesaron en un tubo pirex con tapón de rosca 10 mg de pared celular y se le añadieron 4 mL de ácido sulfúrico 1M (ISO, Panreac). Se agitó suavemente la mezcla en un vortex y permaneció durante 3 horas a 100 °C en la estufa Memmert U40 (Alemania). Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 2 horas, se agitó de nuevo y se centrifugó a 4500 rpm durante 20 minutos (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania). Una fracción del sobrenadante obtenido (2 mL) se traspasó a un microtubo con rosca y se volvió a centrifugar, en este caso a 10000 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania), obteniéndose el **sobrenadante 2**.

Finalmente se realizó una **hidrólisis alcalina**, 10 mg de pared celular se pesaron en un microtubo con tapón de rosca y se le añadió 1 mL de NaOH 1N (Panreac, Barcelona, España). Se agitó suavemente la mezcla en un vortex y permaneció durante diez minutos a 100 °C en la estufa Memmert U40 (Alemania). Una vez enfriada a temperatura ambiente (1 hora), se centrifugó a 10000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania) durante 10 minutos obteniéndose el **sobrenadante 3**.

3.6.2.2.1. Proteínas

Se emplearon 30 µL del **sobrenadante 3** a los que se añadió 2370 µL de agua destilada y 600 µL de reactivo Bradford (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Se agitó la mezcla y a los 15 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro UV/visible, modelo 1600-UV (Shimadzu Corporation, Japón). Para su cuantificación se utilizó una recta de calibrado realizada con albúmina de suero bovino Fraccion V (Roche

Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) con concentraciones comprendidas entre 1 y 8 mg/L (Bradford, 1976).

3.6.2.2.2. Compuestos fenólicos totales

Se emplearon 30 μ L del **sobrenadante 3** al que se le adicionaron 2730 μ L de agua destilada, 120 μ L de NaOH 1N (Panreac, Barcelona, España), y 120 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac, Barcelona, España) previamente diluido con agua destilada (1:1). Se agitó la mezcla en un vortex y se dejó reposar 1 hora. Finalmente, se midió la absorbancia a 700 nm en un espectrofotómetro UV/visible, modelo 1600-UV (Shimadzu Corporation, Japón). Para su cuantificación se utilizó una recta de calibrado realizada con ácido gálico (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) con concentraciones comprendidas entre 100 y 1000 mg/L (Ortega-Regules et al., 2006).

3.6.2.2.3. Azúcares neutros

Hemicelulosa (glucosa no celulósica)

Se partió del **sobrenadante 2** y el análisis se llevó a cabo directamente en un analizador automático Miura (TDI, Italia) para el que se utilizó un kit enzimático D-Glucosa de TDI (Italia).

Glucosa total

Es la suma de la glucosa celulósica y la glucosa no celulósica (hemicelulosa). Se determinó partiendo del **sobrenadante 1**. Para su análisis se utilizó de nuevo el kit enzimático D-Glucosa y se llevó a cabo con el analizador automático Miura 200 (TDI, Italia).

Glucosa celulósica

Se calculó realizando la diferencia entre la glucosa total y la glucosa no celulósica (hemicelulosa).

3.6.2.2.4. Ácidos urónicos

Para cuantificar los ácidos urónicos, que son los principales componentes de las pectinas, se usó el método propuesto por Scott (1979). Se tomaron 50 μL del **sobrenadante 1** y se mezclaron con 4 mL de ácido sulfúrico al 96 % (ISO, Panreac). Se agitó suavemente la mezcla en un vortex y se calentó en un baño de agua Selecta, Unitronic OR (España) a 70°C durante 10 minutos. Una vez enfriada a temperatura ambiente, se le añadieron 200 μL de 3,5-dimetilfenol (Merck, Darmstadt, Alemania) [0,1% en ácido acético glacial (Merck, Darmstadt, Alemania)]. Posteriormente, a los 15 minutos se midieron las absorbancias a 450 nm y a 397 nm en un espectrofotómetro UV/visible, modelo 1600-UV (Shimadzu Corporation, Japón). La medida a 397 nm se emplea para corregir la interferencia que producen los azúcares neutros. Como blanco se utilizó una muestra con agua destilada. Para la cuantificación de ácidos urónicos, se realizó una recta de calibrado con una disolución de ácido D-(+)-galacturónico monohidrato (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). Las muestras patrón se prepararon con concentraciones comprendidas entre 25 y 500 mg/L.

3.6.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN UVAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

3.6.3.1. Antocianos

A la llegada de la uva a la bodega, se recogieron muestras de 20 bayas por tratamiento y réplica que fueron congeladas (-20 °C). Para el análisis, se utilizó el protocolo descrito por Moreno-Pérez (2013) con ligeras modificaciones. Se separó el hollejo de la pulpa con la ayuda de un bisturí. Se retiró el exceso de humedad de las pieles con la ayuda de papel absorbente. A continuación los hollejos fueron pesados, congelados, liofilizados con un Lyofilizador Cryodos Telsar 50 (España) y triturados con un molinillo Vibratory Ball Mill Pulverisette 0, Cryo-box, Fritsch Analysette 3 (Alemania). Se realizó una extracción con metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac), utilizando 40 mL de metanol por cada 2 g de piel fresca, con agitación orbital durante 4 h (Labotron, INFORS, Suiza) a 150 rpm y a 25 °C.

Posteriormente 1 ml del extracto metanólico se mezcló con 1 ml de ácido fórmico al 4,5 %, la mezcla fue filtrada con filtros de nylon de 0,45 μm (Albet LabScience, Dassel) e introducida en viales para su análisis por HPLC. El equipo empleado fue un cromatógrafo líquido Alliance 2695 (Waters, USA) acoplado a un detector de diodo array Waters 2998. Las condiciones cromatográficas utilizadas se detallan en la **Tabla 3.2**. Para la separación de los compuestos se empleó un flujo en gradiente utilizando como fase móviles las siguientes: Fase A: ácido fórmico (4,5%) en agua MilliQ (Millipore, USA) y Fase B: acetonitrilo HPLC (Carlo Erba, Val de Reuil, France).

Columna:	SIELC Primesep B2 de 4,6 mm x 250 mm, y 5,0 μm , (Illinois, USA),							
Volumen de inyección:	20 μL		Flujo:	0.8 mL/min		Temperatura:	25°C	
Tiempo(min)	0.0	28.0	30.0	52.0	60.0	70.0	80.0	90.0
Fase A (%)	95	91	87	79	76	30	95	95
Fase B (%)	5	9	13	21	24	70	5	5

Tabla 3.2. Condiciones cromatográficas para la determinación de antocianos en uva.

La identificación de los diferentes compuestos se llevó a cabo comparando sus espectros con los indicados por la bibliografía (Boido et al., 2006; Cano-López et al., 2006; Chinnici et al., 2009) y para su cuantificación se utilizó el cromatograma obtenido a 520 nm empleando cloruro de malvidin-3-glucósido (Extrasynthèse, Genay, Francia) como estándar externo. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g/g}$ de hollejo fresco para cada uno de los compuestos identificados.

3.6.3.2. Análisis de estilbenos

En el momento de la llegada de la uva a bodega se separaron 40 gramos de uva para cada tratamiento y réplica, que fueron congelados. Posteriormente se separó el hollejo de la pulpa con la ayuda de un bisturí. Se retiró el exceso de humedad de las pieles con la ayuda de papel absorbente y se pesaron los hollejos. A continuación fueron liofilizados con un Liofilizador Cryodos Telsar 50 (España) y finamente triturados con un molinillo Vibratory Ball Mill Pulverisette 0, Cryo-box, Fritsch Analysette 3 (Alemania). El proceso de extracción se llevó a cabo en oscuridad y a baja temperatura, para ello las muestras fueron situadas en una bandeja con hielo picado. Cada muestra se colocó en un tubo Falcon de 50 ml recubierto con papel de aluminio, se añadió 10 ml de

dietil éter (Diethyl ether (UV-IR-HPLC), Panreac-Applichem, GmbH, Darmstadt, Germany) y se agitó con un ULTRA-TURRAX (IKA® T25D, Werke GmbH & CO. KG, Alemania) durante 1 minuto, permaneciendo la muestra en baño de hielo. Posteriormente se llevó a un agitador orbital (Labotron, INFORS, Suiza) a 290 rpm durante 20 minutos, tras los cuales fue centrifugada a 10000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania) a una temperatura de 4°C durante 10 minutos. Finalmente, se separó el sobrenadante y se llevó a otro tubo Falcon de 15 ml. Se realizó una segunda extracción siguiendo el mismo procedimiento explicado anteriormente, pero esta vez utilizando 5 ml de dietil éter. El extracto obtenido en esta segunda extracción se adicionó sobre el obtenido en la primera, consistiendo la suma de ambas el extracto total.

El extracto total se llevó a sequedad a una temperatura de 38°C bajo corriente de N utilizando para ello un equipo Techne consistente en un concentrador modelo FDB03OD, Dri-Block DB-3 (Cole-Parmer Ltd., Reino Unido). El residuo seco fue redisoluto con 500 µl de metanol y filtrado con un filtro de nylon de 0,22 µm en viales de color ámbar.

Finalmente se analizaron las muestras por cromatografía líquida de alta resolución. El equipo empleado fue un HPLC Alliance 2695 (Waters, USA) equipado con un sistema de automuestreo y un detector de diodo array Waters 2998. Las condiciones cromatográficas utilizadas se detallan en la **Tabla 3.3**. Para la separación de compuestos se empleó un flujo en gradiente utilizando como fase móviles las siguientes: Fase A: ácido fórmico (1% v/v) en agua MilliQ (Millipore, USA) y Fase B: acetonitrilo HPLC (Carlo Erba, Val de Reuil, France).

Columna: LiChrospher®100-RP-18 (5µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)						
Volumen de inyección: 10 µL		Flujo: 0.7 mL/min			Temperatura: 25°C	
Tiempo(min)	0.01	4.0	20.0	30.0	32.0	42.0
Fase A (%)	100	85	60	45	100	100
Fase B (%)	0	15	40	55	0	0

Tabla 3.3. Condiciones cromatográficas para la determinación de estilbenos en uva.

Para la cuantificación de estilbenos se utilizó el cromatograma obtenido a 320 nm. Se identificaron los siguientes estilbenos *trans*-piceido, piceatanol, *cis*-piceido, *trans*-

resveratrol y ϵ -viniferina. Para la identificación se emplearon los patrones correspondientes (Sigma-Aldrich, MO, USA). Las rectas de calibrado se obtuvieron a partir de disoluciones comprendidas entre 0,25 y 100 mg/L de los patrones en etanol. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g/g}$ de hollejo fresco para cada uno de los compuestos identificados.

3.6.3.3. Proantocianidinas

Se llevó a cabo la determinación de PAs, conocidos también como taninos condensados, en pieles y semillas, siguiendo el protocolo de Moreno-Pérez (2013) con ligeras modificaciones. Esta metodología se basa en la ruptura de las cadenas poliméricas de PAs mediante la reacción de floroglucinólisis en la que en condiciones ácidas se rompe fácilmente el enlace interflavonoide, de este modo las PAs se despolimerizan y liberan las subunidades terminales y las subunidades de extensión como intermedias electrofílicas de flavan-3-oles. Estos intermediarios electrofílicos son los que reaccionan con un reactivo nucleofílico (floroglucinol) para generar aductos analizables (Kennedy y Jones, 2001).

A la llegada de la uva a bodega, se separaron 10 bayas por cada tratamiento y repetición y se congelaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se retiraron el hollejo y las semillas de la pulpa con ayuda de un bisturí. Se eliminó el exceso de humedad de las pieles con la ayuda de papel absorbente, se registraron los pesos de ambas partes de la uva y se contaron las semillas. Los hollejos y las semillas por separado, fueron sometieron a una extracción en 10 ml de acetona/agua 2:1, durante 24 horas utilizando un agitador orbital (Labotron, INFORS, Suiza) a 200 rpm y a temperatura ambiente. El extracto se llevó a sequedad mediante corriente de N a 35°C usando un equipo Techne consistente en un concentrador modelo FDB03OD, Dri-Block DB-3 (Cole-Parmer Ltd., Reino Unido). A continuación se redisolvió con ayuda de un ultrasonidos (sonicador LT-100PRO, Tierratech S.L., España) en 2 mL de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac). Los extractos se guardaron a -80°C para su posterior análisis.

Para la reacción de floroglucinólisis, en un tubo eppendorf de 2 mL, se añadió una alícuota de 50 μL de cada extracto (hollejo y semilla) por duplicado, en una de las

réplicas se llevó a cabo la reacción de floroglucinolisis y la otra se utilizó como blanco para eliminar la aportación de los monómeros naturales. Para ello, se añadieron 50 μL de reactivo 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)] a una réplica y solo 50 μL de metanol a la réplica que se utilizó como blanco. Seguidamente, las muestras se sumergieron en un baño de agua (Selecta, Unitronic OR, España) a 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos. Para detener la reacción de floroglucinolisis, se añadió 100 μL de acetato sódico 200 mM (Merck, Darmstadt, Alemania). Para finalizar, las muestras se centrifugaron a 13000 rpm (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania) durante 5 min a temperatura ambiente y el sobrenadante se llevó a viales para su análisis por HPLC.

El equipo de HPLC utilizado fue un Waters 2695 (Waters, USA) equipado con un sistema de automuestreo y un detector diodo array Waters 2996. Las condiciones cromatográficas utilizadas se detallan en la **Tabla 3.4**. Para la separación de compuestos se empleó un flujo en gradiente utilizando como fase móviles las siguientes: Fase A: ácido fórmico (2% v/v) en agua MilliQ (Millipore, USA) y Fase B: acetonitrilo: agua: ácido fórmico (80:18:2, v/v).

Columna: Atlantis C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) con pre-columna (20mm x 4,6 mm, 5 μm) (Waters, PA, USA)						
Volumen de inyección: 10 μL		Flujo: 0.8 mL/min		Temperatura: 30 $^{\circ}\text{C}$		
Tiempo(min)	0.0	5.0	35.0	65.0	80.0	90.0
Fase A (%)	100	100	90	80	100	100
Fase B (%)	0	0	10	20	0	0

Tabla 3.4. Condiciones cromatográficas para la determinación de proantocianidinas en uva.

Para la cuantificación de flavan-3-oles se utilizó el cromatograma obtenido a 280 nm. Los picos de los 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 comparando sus espectros según la bibliografía (Kennedy et al., 2001). Los compuestos que se obtuvieron tras la floroglucinolisis fueron (-)-epigallocatequina-floroglucinol (EpG-Ext),

(+)-catequina-floroglucinol (Cat-Ext), (-)-epicatequina-4-floroglucinol (Ep-Ext), (+)-catequina terminal (Cat-T), (-)-epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol (Ep-3-O-g-Ext), (-)-epicatequina terminal (Ep-T) y (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal (Ep-3-O-g-T). Para la cuantificación de los mismos se emplearon los factores de respuesta relativos a la catequina de cada uno de ellos. Los resultados se expresaron en $\mu\text{g/g}$ de hollejo fresco y $\mu\text{g/g}$ de pepita para cada uno de los compuestos identificados.

Se calculó el **grado medio de polimerización (gMP)** como la suma de subunidades (monómeros y aductos de la floroglucinólisis) y dividido por la suma de los monómeros. El porcentaje de cada monómero se calculó con respecto a la suma de la concentración, expresada en moles, de los monómeros totales.

$$gMP = \Sigma (\text{moles monómeros} + \text{moles aductos}) / \Sigma (\text{moles monómeros})$$

Para el cálculo del **porcentaje de galoilación (%Gal)** se sumó el porcentaje de epicatequina-3-O-galato (monómero terminal) más el porcentaje del aducto epicatequina-3-O-galato-floroglucinol (monómero de extensión).

$$\%Gal = \%Epicatequina-3-O-galato-floroglucinol + \%Epicatequina-3-O-galato$$

3.6.4. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN NITROGENADA DE LAS UVAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

En el momento de vendimia se separaron 45 bayas (unos 60-70 gramos) por tratamiento y réplica y se congelaron a -20°C . Las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y sobre papel absorbente se secaron cuidadosamente para eliminar el agua formada en la condensación durante la descongelación. Posteriormente se aplastaron y la mezcla se centrifugó durante 15 minutos a 4500 rpm (Centrifuga Meditronic, J.P. Selecta, España) para separar el mosto de la piel y las pepitas. Cada muestra se derivatizó siguiendo la metodología propuesta por Gómez-Alonso et al. (2007) con algunas modificaciones. En un tubo pirex con tapón de rosca se adicionaron: 1,750 ml de tampón borato 1M (pH 9) [ácido bórico (pure, pharma grade, Applichem-Panreac GmbH, Darmstadt, Germany)], 750 μl de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac), 1 ml de muestra (previamente centrifugada a 10000 rpm), 20 μl de estándar

interno ácido DL-2-aminoadípico (1 g/L, en HCl 0,1 N)) ($\geq 99\%$ Sigma-Aldrich, MO, USA) y 30 μl de etoximetilenmalonato de dietilo 99% (Sigma-Aldrich, MO, USA) como agente derivatizante. Cada una de las muestras se agitó suavemente, se sonicó con ultrasonidos (sonicador LT-100PRO, Tierratech S.L., España) durante 30 minutos y seguidamente se introdujeron en una estufa Memmert U40 (Alemania) a 75°C durante 2 horas. Una vez enfriadas a temperatura ambiente se filtraron utilizando un filtro de nylon, 0,22 μm en viales de 1,5 ml para HPLC.

El equipo empleado fue un cromatógrafo líquido Alliance 2695 (Waters, USA) acoplado a un detector diodo array Waters 2998. Las condiciones cromatográficas utilizadas se detallan en la **Tabla 3.5**. Para la separación de los compuestos se empleó un flujo en gradiente utilizando como fase móviles las siguientes: Fase A: tampón acetato 25 mM pH 5,8 con 0,02% de azida sódica y fase móvil B: acetonitrilo HPLC (Carlo Erba, Val de Reuil, France).

Columna: Cortecs® Shield RP18 2.7 μm 4.6x150 mm (Waters,PA, USA)										
Volumen de inyección: 3 μL			Flujo: 0.6 mL/min				Temperatura: 25°C			
Tiempo(min)	0	10	19	20	23	24	26.5	28.5	32.5	60.5
Fase A (%)	94	86	80	74	70	50	37	0	37	94
Fase B (%)	6	14	20	26	30	50	63	100	63	6

Tabla 3.5. Condiciones cromatográficas para la determinación de compuestos nitrogenados en uva.

Para la cuantificación de los compuestos nitrogenados se utilizó el cromatograma obtenido a 280 nm. La identificación de cada uno de los compuestos se realizó a partir de los patrones correspondientes (Sigma-Aldrich, MO, USA). Las rectas de calibrado (**Tabla 3.6**) se obtuvieron a partir de disoluciones en HCl 0,1M de los distintos compuestos. Los resultados obtenidos se expresaron en mg/L para cada uno de los compuestos identificados.

Compuesto	Recta	R ²
Asp	$y = 0,0584x - 0,0088$	0,9991
Glu	$y = 0,0501x - 0,0199$	0,9985
Ser	$y = 0,0596x - 0,1154$	0,9965
Asn	$y = 0,0599x - 0,0329$	0,9988
Gln	$y = 0,0337x - 0,0207$	0,9988
His	$y = 0,0449x - 0,0631$	0,9993
Gly	$y = 0,1061x - 0,3765$	0,9906
Thr	$y = 0,055x - 0,1297$	0,9968
β-Ala	$y = 0,0937x - 0,1402$	0,9996
Arg	$y = 0,0396x - 0,0567$	0,9994
α-Ala	$y = 0,0893x - 0,1556$	0,9984
GABA	$y = 0,0644x - 0,2306$	0,9909
Pro	$y = 0,0198x - 0,2553$	0,9979
NH ₄ ⁺	$y = 0,0713x - 0,0753$	0,9989
Tyr	$y = 0,0381x - 0,0572$	0,9991
Val	$y = 0,0735x - 0,1102$	0,9996
Met	$y = 0,0542x - 0,0693$	0,9994
Cys	$y = 0,0234x - 0,0165$	0,9958
Ile	$y = 0,0577x - 0,1087$	0,9982
Leu	$y = 0,0624x - 0,1999$	0,9923
Trp	$y = 0,0316x - 0,0836$	0,9957
Phe	$y = 0,0467x - 0,0569$	0,9993
Orn	$y = 0,1187x - 0,1628$	0,9993
Lys	$y = 0,0475x - 0,0512$	0,9995

Tabla 3.6. Rectas de calibrado empleadas en la cuantificación de la composición nitrogenada de uvas.

3.7. VINIFICACIONES

La vendimia se realizó manualmente en cajas de 15 Kg y fue transportada a la Bodega Experimental (Estación Enológica de Jumilla). Una vez allí se tomaron las muestras para los posteriores análisis que se realizan sobre las uvas y se introdujo en cámaras de refrigeración (5-8°C) donde permaneció durante 24 horas antes de su elaboración. Posteriormente las uvas fueron despalilladas, estrujadas e introducidas en depósitos de acero inoxidable de 50 L. En el proceso de estrujado fueron sulfitadas con 80 mg/Kg de metabisulfito potásico (Laffort, Bordeaux, France). Se añadió N alimentario

en el espacio de cabeza del depósito y se taparon hasta la jornada siguiente. Al día siguiente se tomó muestra de mosto de cada uno de los depósitos, se centrifugó y se analizaron los parámetros físico-químicos (apartado 3.6.1) para determinar las correcciones de acidez necesarias.

A continuación, se preparó un pie de cuba con levaduras comerciales (*Zymaflore FX10 Saccharomyces cerevisiae*, 20 g/100 Kg) para cada uno de los depósitos. Finalmente, se adicionó el pie de cuba en la parte inferior del depósito y en la parte superior opuesta se llevó a cabo la corrección de acidez con ácido tartárico hasta 6,5 g/L. La temperatura de fermentación fue de 26/27°C. Se controló la temperatura y densidad de los depósitos una vez al día, realizándose también un bazuqueo diario hundiendo el sombrero en el mosto. La maceración se prolongó hasta los 14 días. A continuación, se llevó a cabo el sangrado del vino y prensado de los orujos en una prensa neumática de la marca Grifo (Italia) con 75 L de capacidad, 1,5 bares de presión y un 65 % de rendimiento. Los vinos obtenidos se trasegaron con aireación a los dos días del prensado para eliminar las lías gruesas y evitar problemas de reducción de los mismos. Se llevó a cabo un segundo trasiego después de dos días del primero y se guardó cada uno de los vinos obtenidos en un bag in box. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado al finalizar la fermentación alcohólica.

3.8. DETERMINACIONES EN LOS VINOS

3.8.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LOS VINOS

Una vez terminada la fermentación alcohólica, cuando los vinos ya se habían trasegado al bag in box, se centrifugaron y se eliminó el exceso de CO₂ con un sonicador LT100 PRO (Tierratech S.L., España). A continuación se realizaron las siguientes analíticas.

3.8.1.1. Grado alcohólico

Se determinó a través de espectroscopia de infrarrojo cercano (NIR) (Resolución OIV/OENO 390/2010), empleando un analizador Alcolyzer Wine (Anton Paar® GmbH, Austria). Los resultados fueron expresados en porcentaje de volumen de alcohol que contiene cada vino.

3.8.1.2. pH

Se determinó con un valorador automático Schott, alpha plus TA20 (SCHOTT-GERÄTE GmbH, Alemania) utilizando un electrodo de vidrio (Xylem analytics Germany GmbH, Alemania) usando el método oficial (OIV-MA-AS313-15).

3.8.1.3. Acidez total

Fue determinada por potenciometría con un valorador automático Schott, alpha plus TA20 (SCHOTT-GERÄTE GmbH, Alemania) utilizando un electrodo de vidrio (Xylem analytics Germany GmbH, Alemania) usando el método oficial (OIV-MA-AS313-01). Los resultados fueron expresados en g/L de ácido tartárico.

3.8.1.4. Acidez volátil

La acidez volátil se determinó mediante un analizador de flujo continuo segmentado Quattro (Axflow, Alemania) siguiendo la metodología oficial (Resolución OIV/OENO 391/2010). Los resultados fueron expresados en g/L de ácido acético.

3.8.1.5. Ácido tartárico

Se determinó siguiendo un método colorimétrico empleando para ello un analizador automático CETLAB 600 (Microdom, Francia), (Resolución OIV/OENO 391/2010). Los resultados obtenidos fueron expresados en g/L de ácido tartárico.

3.8.1.6. Ácido L-málico

Se empleó un analizador automático CETLAB 600 (Microdom, Francia), con el uso de un test enzimático siguiendo el método oficial (OIV-MA-AS313-26). Los resultados obtenidos fueron expresados en g/L de ácido málico.

3.8.2. PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE LOS VINOS

Para las medidas de índice de polifenoles totales (IPT), intensidad de color (IC), tono y diferencia de color (ΔE^*) se utilizó un espectrofotómetro Shimadzu 1600-UV (Shimadzu Corporation, Japón).

3.8.2.1. Índice de polifenoles totales

El vino se diluyó a razón de 1:100 con agua destilada. Se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Las medidas se realizaron midiendo la absorbancia a 280 nm.

3.8.2.2. Intensidad de color y tono

Se obtuvo a partir de las sumas de absorbancia a tres longitudes de onda, a 620 nm (componente azul), 520 nm (componente roja) y 420 nm (componente amarillo) (Glories, 1984). Para ello se midió directamente el vino en cubeta de vidrio de 1 mm de paso óptico.

Para calcular el tono se realizó el cociente entre las absorbancias a 420 y 520 nm.

3.8.2.3. Diferencia de color

El espacio de color CIELab es un sistema cartesiano formado por tres ejes (**Figura 3.6**). En el eje vertical L^* se representa la medida de la luminosidad, en un eje horizontal a^* , se representa la medida del contenido rojo (+) o verde (-) y en el otro eje horizontal b^* , se representa la medida del contenido de amarillo (+) o de azul (-) de un color.

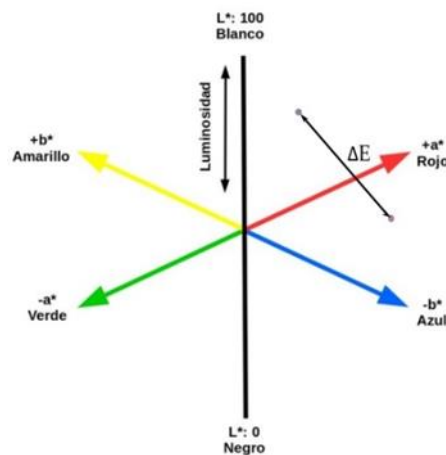


Figura 3.6 Representación del espacio de color CIELab.

Los parámetros CIELab, fueron obtenidos mediante la medida de la absorbancia en un intervalo de longitudes de onda entre 380 y 780 nm y con cubetas de 1 mm de paso óptico y referidas a un observador a 10° e iluminante D65. El cálculo se realizó a través

del software "Color" (UVPC Optional Color Analysis 2.7, Shimadzu Scientific Instrument).

ΔE^* es la distancia euclidiana entre dos puntos (dos colores) de este espacio tridimensional y se calculó a través de la siguiente expresión (OIV-MA-AS2-11).

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

Diferencias de color ΔE^* por encima de 3 se consideran distinguibles para el ojo humano (Martínez et al., 2001). Se calcularon las ΔE^* entre el vino control y los vinos procedentes de los distintos tratamientos aplicados.

3.8.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS DE LOS VINOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

3.8.3.1. Antocianos

Una vez filtrado el vino con un filtro de nylon de 0,45 μm (Albet LabScience, Dassel) se analizó los antocianos mediante inyección directa de 20 μL en un cromatógrafo líquido Alliance 2695 (Waters, USA), equipado con un detector diodo array Waters 2998. Las condiciones cromatográficas utilizadas se detallan en la **Tabla 3.7**. Para la separación de compuestos se empleó un flujo en gradiente utilizando como fases móviles las siguientes: Fase A: ácido fórmico (98% puro, Panreac-Applichem, GmbH, Darmstadt, Germany) 4,5% en agua MilliQ (Millipore, USA) y Fase B: acetonitrilo HPLC (Carlo Erba, Val de Reuil, France). La identificación de los diferentes compuestos se llevó a cabo comparando sus espectros con los indicados por la bibliografía (Boido 2006; Cano-López 2006; Chinnici 2009) y para su cuantificación se utilizó el cromatograma obtenido a 520 nm y se empleó cloruro de malvidin-3-glucósido (Extrasynthèse, Genay, Francia) como patrón externo. Los resultados se expresaron en mg/L para cada uno de los compuestos identificados.

Columna:	Cortecs® Shield RP18 2.7µm 4.6x150 mm (Waters,PA, USA)						
Volumen de inyección:	20 µL		Flujo: 0.8 mL/min			Temperatura: 25°C	
Tiempo (min)	0	1	28.69	29.98	31.57	34.45	40.20
Fase A (%)	95	95	65	20	20	95	95
Fase B (%)	5	5	35	80	80	5	5

Tabla 3.7. Condiciones cromatográficas para la determinación de antocianos en vino.

3.8.3.2. Estilbenos

La extracción con dietil éter y separación cromatográfica se realizaron siguiendo el mismo procedimiento descrito para las uvas (apartado 3.6.3.2). Para ello se tomaron 5 ml de vino al que se adicionaron 5 ml de dietil éter (UV-IR-HPLC), (Panreac-Applichem, GmbH, Darmstadt, Germany) en una primera extracción y otros 5 ml en una segunda extracción. La determinación y cuantificación de los diferentes estilbenos analizados: *trans*-piceido, piceatanol, *cis*-piceido, *trans*-resveratrol y ϵ -viniferina, se llevó a cabo siguiendo la misma metodología explicada en el apartado 3.6.3.2.

3.8.3.3. Proantocianidinas

Para su determinación en los vinos se empleó, al igual que en las uvas, la reacción de floroglucinólisis para romper las cadenas de los flavonoles poliméricos. Previamente, las muestras fueron tratadas siguiendo la metodología de Kennedy y Jones (2001) con algunas modificaciones. En primer lugar 5 mL de vino se llevaron a sequedad mediante corriente de N a 35°C usando un equipo Techne consistente en un concentrador modelo FDB03OD, Dri-Block DB-3 (Cole-Parmer Ltd., Reino Unido). El extracto seco obtenido se redisolvió en 2 mL de agua Milli-Q con ayuda de ultrasonidos (sonicador LT-100PRO, Tierratech S.L., España). A continuación, las muestras se pasaron por cartuchos SEP-PAK C18 (Vac 6 cc 1g) (Waters, Mildford, USA) que habían sido previamente acondicionados con 10 mL de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac) y 10 mL de agua Milli-Q. Posteriormente los cartuchos se lavaron con 20 mL de agua Milli-Q y para la elución de las PAs se adicionó 10 mL de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac). Este nuevo extracto se llevó a sequedad en el concentrador de N. Finalmente, el extracto seco obtenido se redisolvió con 400 µl de metanol (HPLC gradiente, PAI-ACS, Panreac). Este extracto fue sometido al mismo proceso de fluoroglucinólisis que las uvas (apartado

3.6.3.3), pero sin la necesidad de realizar la muestra blanco. La metodología empleada para la separación, identificación y cuantificación de las distintas PAs fue la misma que la empleada para hollejos y semillas (apartado 3.6.3.3).

3.8.4. ANALISIS DE LA COMPOSICIÓN NITROGENADA DE LOS VINOS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

El procedimiento de extracción y de identificación de los distintos componentes nitrogenados en los vinos se realizó siguiendo el mismo protocolo descrito para las uvas (apartado 3.6.4). Las muestras de vino fueron previamente centrifugadas (Centrífuga Eppendorf 5810R, Alemania) a 10000 rpm durante 5 minutos y se partió de 1 ml de vino. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las mismas que en el caso de las uvas pero con la excepción del volumen de inyección utilizado, que en el caso de los vinos se utilizaron 6 μ l.

3.9. ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS VINOS

El análisis sensorial fue realizado por un panel de catadores cualificados formado por personal de la Estación Enológica de Jumilla.

Se realizó una cata triangular para determinar si existían diferencias significativas entre el vino control y los procedentes de los distintos tratamientos, para ello se empleó la ficha de cata mostrada en la **Figura 3.7**. Las diferentes catas se realizaron presentando a cada catador tres muestras de vino codificadas aleatoriamente, entre ellas dos muestras eran iguales y una diferente. Cada catador debía indicar que dos muestras eran iguales y cual diferente (elección forzada), y puntuar el grado de diferencia encontrado en la fase visual, olfativa y gustativa empleando una escala de 1 a 5 puntos (1=nula; 2=débil; 3=media; 4= fuerte y 5=muy fuerte). Además, también debía indicar que muestra era su preferida.

Se enfrentaron las siguientes muestras (**Tabla 3.8**) en un total de cuatro catas:

Catas triangulares	
1. Control vs. MeJ	3. Control vs. Urea
2. Control vs. Nano-MeJ	4. Control vs. Nano-Urea

Tabla 3.8. Catas realizadas.

En la valoración de los resultados obtenidos solo se tuvieron en cuenta las catas en las que el catador había indicado correctamente que vinos eran iguales y cual diferente. Para determinar si los resultados eran estadísticamente significativos se siguieron las indicaciones de la norma AENOR (ISO 4120:2021).

81 – FICHA DE CATA TRIANGULAR

Ante usted hay tres muestras. Dos de ellas son iguales entre sí. Dígase 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.

MUESTRAS IGUALES	<input type="text"/>	MUESTRA DISTINTA	<input type="text"/>	MUESTRA PREFERIDA	<input type="text"/>		
ATRIBUTOS	Diferencia percibida entre las muestras					OBSERVACIONES:	LOTE 1
	NULA	DEBIL	MEDIA	FUERTE	MUY FUERTE		
FASE VISUAL							
FASE OLFATIVA							
FASE GUSTATIVA							

Figura 3.7. Ficha de cata empleada en las catas triangulares.

3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) para comprobar si existían diferencias significativas entre las medias de los diferentes compuestos evaluados. Además se realizó un análisis multivariable de la varianza (MANOVA) para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los factores estudiados (tratamiento y año) con relación a las variables dependientes medidas. Para los dos análisis, la separación de medias se realizó utilizando el test LSD (Least Significant Difference). Finalmente, con el fin de poder conocer si con los parámetros medidos podríamos distinguir unos tratamientos de otros se llevó a cabo un análisis discriminante.

Los distintos análisis fueron realizados con los siguientes programas estadísticos: R Studio 1.1.453 (Boston, MA) y Statgraphics 18 (Statpoint Technologies, INC., Warrenton, VA, USA).

4. EFECTO DE LA UREA Y NANO-UREA SOBRE LA CALIDAD DE UVAS Y VINOS

4.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS UVAS Y VINOS

A continuación se muestran los parámetros físico-químicos de las uvas control y de las procedentes de los tratamientos con urea y nano-urea. Los parámetros físico-químicos medidos fueron °Bé, AT, pH, ácido tartárico y ácido málico, además del ratio °Bé/AT como medida de la madurez tecnológica de la uva. Como parámetro indicador del rendimiento se tuvo en cuenta el peso de 100 bayas.

Como se puede observar en la **Tabla 4.1**, en el año 2019 la uva se vendimió antes de alcanzar una madurez tecnológica adecuada, siendo el año en el que se obtuvo un menor valor en la relación °Bé/AT tanto para las uvas control como para las tratadas. Esta vendimia anticipada fue debida a que los días previos se produjeron lluvias torrenciales, y ante la posibilidad de aparición de algún brote de podredumbre se decidió adelantar la vendimia. Tal como se puede observar, pocas diferencias pudieron percibirse para los diferentes parámetros medidos durante los tres años de estudio, siendo solo algunos de ellos significativos. Así el °Bé presentó un valor inferior en el tratamiento nano-urea solo en el año 2021 indicando un posible retraso en la maduración. La AT no se vio afectada ninguno de los años estudiados, sin embargo la relación °Bé/AT mostró una tendencia a disminuir en el tratamiento con nano-urea, aun sin llegar a ser significativa. El pH no se vio afectado en los años 2019 y 2020 y tan solo aumentó en el tratamiento con urea en el año 2021. Finalmente, el ácido tartárico se vio incrementado por ambos tratamientos en 2021, mientras que el ácido málico descendió en 2020 en los dos tratamientos pero en el 2021 solo lo hizo en el de nano-urea.

Diversos autores encontraron diferentes comportamientos en uvas de diferentes variedades tratadas con urea para cada uno de estos parámetros. Respecto al °Bé, Portu et al. (2015b) en uvas de Tempranillo, Garde-Cerdán et al. (2017) en uvas de Tempranillo y Monastrell y Hannam et al. (2014) en uvas de Cabernet Sauvignon y Viognier encontraron que este parámetro no se vio afectado por el tratamiento. Sin embargo Hui et al. (2021) detectaron un incremento del grado de madurez en uvas de Cabernet Sauvignon y Hannam et al. (2014) en uvas de la variedad Merlot y Pinot Noir tratadas con urea hallaron distinto comportamiento en función de la añada.

En cuanto a la AT, en la bibliografía se encuentran diversos efectos cuando se aplica urea foliarmente dependiendo de la variedad, dosis empleada y añada (Hannam et al. 2014; Portu et al., 2015b; Garde-Cerdán et al. 2017 y Hui et al. 2021). Respecto al pH, autores como Portu et al. (2015b) mostraron que el tratamiento con urea no afectaba a este parámetro en la variedad Tempranillo independientemente de la dosis empleada. En otro estudio en dos variedades, Tempranillo y Monastrell tampoco se vio modificado el pH al emplear urea (Garde-Cerdán et al., 2017). Sin embargo Hannam et al. (2014) obtuvieron diversas respuestas dependiendo de la variedad a la cual se aplicaba el tratamiento, así variedades como Cabernet Sauvignon, Pinot Noir y Viognier no vieron afectado el pH de sus uvas tras la aplicación de urea, pero Merlot sufrió un incremento dependiendo de la añada al igual que Pinot Gris.

Con respecto al rendimiento, el año 2020 fue en el que pudimos observar un tamaño de baya mayor. Este incremento de tamaño podría ser explicado debido al gran volumen de lluvias registrado desde septiembre del 2019 a febrero del 2020, que pudieron facilitar la toma de reservas por la planta y que se tradujo en la añada siguiente en este aumento de rendimiento. El tamaño de baya no se vio influenciado por ninguno de los tratamientos y esto corresponde con lo encontrado por otros autores que no detectaron un aumento significativo del rendimiento en uvas tratadas foliarmente con urea (Hannam et al., 2014; Lasa et al., 2012).

En relación al análisis multifactorial (**Tabla 4.1**), el factor añada fue el más importante, explicando el mayor porcentaje de variabilidad encontrada en todos los parámetros medidos, excepto en el caso del ácido málico que solo alcanzó un valor del 24%. Por otro lado, el factor tratamiento tuvo poco efecto, aunque pudimos observar que el mayor efecto fue detectado precisamente sobre el ácido málico (18%). Finalmente la interacción año-tratamiento fue importante en el contenido en ácido tartárico (35%).

	Añada	Control	Urea	Nano-urea	p-value	Análisis multifactorial		
						T (%)	A(%)	TxA(%)
°Baumé	2019	12,92 ± 0,41	12,63 ± 0,09	12,82 ± 0,23	ns			
	2020	14,19 ± 0,32	13,68 ± 0,30	13,75 ± 0,31	ns	3	71	11
	2021	13,14 ± 0,21 a	13,55 ± 0,17 a	13,02 ± 0,04 b	**	(ns)	(***)	(*)
AT*	2019	2,85 ± 0,21	2,77 ± 0,12	2,94 ± 0,14	ns			
	2020	2,34 ± 0,09	2,21 ± 0,09	2,34 ± 0,06	ns	3	89	1
	2021	1,92 ± 0,13	2,00 ± 0,09	2,14 ± 0,02	ns	(*)	(***)	(ns)
°Bé/AT	2019	4,56 ± 0,47	4,56 ± 0,19	4,37 ± 0,29	ns			
	2020	6,06 ± 0,34	6,19 ± 0,34	5,87 ± 0,27	ns	4	86	2
	2021	6,84 ± 0,51	6,81 ± 0,36	6,08 ± 0,06	ns	(*)	(***)	(ns)
pH	2019	3,88 ± 0,03	3,85 ± 0,07	3,83 ± 0,04	ns			
	2020	4,09 ± 0,02	4,08 ± 0,02	4,10 ± 0,03	ns	4	83	7
	2021	4,11 ± 0,06 b	4,22 ± 0,02a	4,04 ± 0,02 b	**	(*)	(***)	(**)
Ácido tartárico (g/L)	2019	3,90 ± 0,13	3,79 ± 0,15	4,14 ± 0,21	ns			
	2020	4,49 ± 0,15	4,24 ± 0,12	4,27 ± 0,14	ns	4	43	35
	2021	3,97 ± 0,08 b	4,45 ± 0,09 a	4,30 ± 0,07 a	***	(ns)	(***)	(***)
Ácido málico (g/L)	2019	1,41 ± 0,35	1,28 ± 0,05	1,14 ± 0,31	ns			
	2020	1,44 ± 0,06a	1,14 ± 0,09 b	1,17 ± 0,05 b	**	18	24	13
	2021	1,04 ± 0,07 ab	1,16 ± 0,07 a	0,95 ± 0,03 b	*	(*)	(*)	(ns)
Peso 100 bayas (g)	2019	155,0 ± 5,7	149,9 ± 5,5	156,6 ± 9,1	ns			
	2020	162,8 ± 3,7	164,9 ± 2,4	158,6 ± 2,4	ns	3	51	13
	2021	143,7 ± 11,0	152,8 ± 2,5	141,1 ± 10,2	ns	(ns)	(***)	(***)

Tabla 4.1. Características físico-químicas y rendimiento de las uvas control y de las tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021. * Acidez total (AT) expresada en g/L de ácido tartárico. Los datos expresan las medias ± desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05); ns, no significativo.

Los resultados de los parámetros físico-químicos de los vinos se presentan en la **Tabla 4.2**. Algunos de los parámetros medidos se vieron modificados significativamente durante dos de los años estudiados (2020 y 2021), sin embargo durante el año 2019 no se observó ninguna diferencia entre los vinos procedentes de uvas tratadas y los vinos control.

Así, el contenido alcohólico se vio afectado por el tratamiento con urea dos de los años de estudio pero de distinto modo, en el año 2020 este parámetro disminuyó y sin embargo en el año 2021 aumentó, lo que concuerda con los resultados mostrados para el °Bé de las uvas (**Tabla 4.1**), aunque en ellas el cambio no fue estadísticamente significativo.

La acidez volátil se vio modificada en el año 2021 y se comportó de manera diferente para los dos tratamientos estudiados, con un ascenso en los vinos procedentes del tratamiento con urea y un descenso en los vinos procedentes del tratamiento con nano-urea. Respecto a la AT solo se observaron cambios en 2021 donde se registró un descenso en el tratamiento con urea y un incremento en el de nano-urea. El pH de forma general no se vio afectado, de manera que solo se detectó un descenso en 2021 en los vinos procedentes del tratamiento con nano-urea. En relación a la AT y al pH no podemos achacar los cambios al tratamiento, puesto que todos los mostos se corrigieron con ácido tartárico en el momento del encubado. Finalmente, el ácido málico solo se vio modificado en 2020 con un descenso en ambos tratamientos.

						Análisis multifactorial		
	Añada	Control	Urea	Nano-urea	p-value	T (%)	A(%)	TxA(%)
Alcohol % (v/v)	2019	12,94 ± 0,16	12,86 ± 0,07	13,15 ± 0,42	ns			
	2020	14,72 ± 0,34 a	13,84 ± 0,29 b	14,18 ± 0,20 ab	*	2	71	17
	2021	13,44 ± 0,15 b	13,90 ± 0,13 a	13,32 ± 0,05 b	**	(ns)	(***)	(***)
Acidez volátil ¹	2019	0,40 ± 0,04	0,38 ± 0,01	0,40 ± 0,03	ns			
	2020	0,41 ± 0,04 ab	0,41 ± 0,03	0,44 ± 0,03	ns	14	6	63
	2021	0,40 ± 0,02 b	0,52 ± 0,02 a	0,34 ± 0,01 c	***	(**)	(ns)	(***)
AT ²	2019	7,44 ± 0,11 a	7,44 ± 0,10	7,06 ± 0,27	ns			
	2020	7,04 ± 0,16	6,92 ± 0,07	6,69 ± 0,42	ns	3	32	34
	2021	7,05 ± 0,06 b	6,79 ± 0,02 c	7,31 ± 0,06 a	***	(ns)	(**)	(**)
pH	2019	3,33 ± 0,08	3,28 ± 0,02	3,37 ± 0,04	ns			
	2020	3,43 ± 0,02	3,36 ± 0,01	3,39 ± 0,11	ns	6	22	30
	2021	3,38 ± 0,03 a	3,41 ± 0,02 a	3,33 ± 0,02 b	*	(ns)	(*)	(*)
Ácido málico (g/L)	2019	1,69 ± 0,32	1,69 ± 0,04	1,59 ± 0,06	ns			
	2020	1,44 ± 0,04 a	1,31 ± 0,03 b	1,32 ± 0,04 b	**	2	72	6
	2021	1,35 ± 0,07	1,38 ± 0,05	1,41 ± 0,06	ns	(ns)	(***)	(ns)

Tabla 4.2. Características físico-químicas para los vinos obtenidos de las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021. ¹Acidez volátil expresada como g/L de ácido acético. ² Acidez total (AT) expresada en g/L de ácido tartárico. Los datos representan las medias ± desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05); ns, no significativo.

Los resultados obtenidos por otros autores en vinos procedentes de uvas tratadas con urea son dispares. Así, Portu et al., (2015a) en vinos de Tempranillo procedentes de uvas tratadas con dos dosis diferentes de urea no observaron ningún efecto en el contenido alcohólico, la acidez volátil y el ácido málico, sin embargo detectaron un incremento de pH y un descenso de la AT en los vinos procedentes de la uva tratada con la dosis de urea empleada más baja. Gutiérrez-Gamboa et al. (2017b) en uvas de Cabernet Sauvignon, no detectaron cambios en la graduación alcohólica ni en la acidez volátil de sus vinos, pero si un descenso en el valor del pH y aumento en la AT en vinos, siendo por tanto resultados contrarios a los obtenidos por Portu et al. (2015a). Finalmente, Lang et al. (2019) en un estudio durante dos años consecutivos sobre vinos de la variedad Regent no observaron ningún cambio en el grado alcohólico, pH, AT, contenidos en ácido tartárico y en málico.

El análisis multifactorial realizado (**Tabla 4.2**), nos mostró que el factor añada fue el determinante para la variabilidad obtenida en el % alcohol y el contenido en ácido málico. La acción del tratamiento solo fue significativa en el caso de la acidez volátil. Por último, la interacción tratamiento-año mostró el mayor porcentaje de variabilidad para la acidez volátil (63%), mostrando también su influencia en el caso de la AT (34%) y el pH (30%).

4.2. COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR

Las modificaciones tanto moleculares como bioquímicas de la pared celular juegan un papel muy importante en la fisiología de la planta, viéndose influenciados por éstas, el crecimiento de la planta, la senescencia, la abscisión y las respuestas al estrés biótico y abiótico. La pared celular está caracterizada por ser una estructura dinámica y que se remodela durante las distintas etapas del desarrollo en respuesta a estímulos externos (Marowa et al., 2016).

Diversos estudios indican que la síntesis y remodelación de la pared celular se ven afectados por la disponibilidad de N, a través de una respuesta compleja de la que no se conocen los mecanismos moleculares (Ogden et al., 2018). En *Arabidopsis thaliana* se ha identificado la co-expresión de algunos genes relacionados con la pared celular y los transportadores de NO_3^- y NH_4^+ (Aoki et al., 2016). En callos de células de hojas de

Vitis vinífera se encontró una expresión diversificada de genes relacionados con el ablandamiento de la pared celular en respuesta a deficiencia de N (Fernandes et al., 2016).

Hasta el momento, no se han encontrado estudios que recojan como se ve afectada la pared celular de las uvas tras aplicación foliar de urea, ya sea de modo convencional o en forma de nanopartículas (nano-urea).

4.2.1. PARED CELULAR AISLADA

En la **Tabla 4.3** se recogen el porcentaje de hollejo de la uva así como el rendimiento de pared celular en las uvas control y en las uvas procedentes de los tratamientos con urea y nano-urea. Los cálculos se realizaron respecto a peso seco de hollejo con la finalidad de que los resultados obtenidos no se vieran enmascarados por las diferencias en el contenido en agua remanente que pudieran tener las distintas fracciones de piel. Respecto al porcentaje de piel obtenido, ambos tratamientos (urea y nano-urea) parecen no tener gran influencia sobre este parámetro, mostrándose tan solo un pequeño aumento significativo en el año 2019. Esto denotaría que tanto la urea como la nano-urea no fueron capaces de aumentar la cantidad de piel de las uvas. Sin embargo la cantidad de pared celular aislada en cada uno de los tratamientos aumentó todos los años respecto al obtenido en las uvas control, indicando un engrosamiento de las paredes celulares en los tratamientos con urea y con nano-urea como posible respuesta al estrés abiótico sufrido por la planta. De hecho, esta reportado por diversos estudios como diferentes tipos de estrés afectan a la integridad de la pared celular (Rui y Dinneny, 2020).

		% Hollejo ¹	% CWM ²
		(peso seco)	(en piel seca)
2019	Control	3,02b	25,66c
	Urea	3,11a	28,47b
	Nano-urea	3,09a	28,82a
	p-value	*	***
2020	Control	3,26	24,94c
	Urea	3,27	26,66b
	Nano-urea	3,29	28,53a
	p-value	ns	***
2021	Control	3,08	22,62c
	Urea	2,93	27,59b
	Nano-urea	2,94	28,88a
	p-value	ns	***

Tabla 4.3. Cantidad de hollejo y rendimiento del aislamiento de las paredes celulares de las uvas control y de las tratadas con urea y con nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Abreviaturas: ¹ Porcentaje de hollejo en peso seco respecto al peso de las uvas. ² Pared celular aislada respecto al peso seco de los hollejos. Diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$); ns, no significativo.

4.2.2. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR

La **Figura 4.1** muestra la composición de la pared celular de la uva para el control y los dos tratamientos (urea y nano-urea) durante los tres años de estudio (2019, 2020 y 2021). Los diferentes componentes analizados fueron proteínas, compuestos fenólicos, azúcares neutros (celulosa y hemicelulosa) y ácidos urónicos.

4.2.2.1. Proteínas

Los resultados obtenidos para las proteínas fueron diferentes según la añada, así en el año 2019 tan solo el tratamiento con nano-urea fue capaz de conseguir un incremento de las proteínas, a diferencia del año 2020 en el que no se mostró ninguna diferencia significativa entre las uvas control y las tratadas. Sin embargo, en el año 2021 ambos tratamientos incrementaron el contenido en proteínas pudiendo afectar este hecho a una mayor dificultad en la extractabilidad de compuestos de interés durante la elaboración del vino.

La expresión de las proteínas está regulada por diversos estreses abióticos, entre los que se encuentran la aplicación de compuestos exógenos. Varios estudios han

mostrado que las proteínas modifican la rigidez de la pared celular mediante el entrecruzamiento de diferentes polímeros (Tenhaken, 2015). Se ha detectado como varios tipos de expansinas responden a deficiencias de nutrientes, incluyendo las de N (Li et al., 2014).

4.2.2.2. Compuestos fenólicos totales (CFT)

Los compuestos fenólicos presentes en la pared celular no se vieron afectados por ninguno de los tratamientos durante el año 2019. Sin embargo, durante la siguiente añada, fue en el tratamiento con urea donde se detectó en la pared celular de sus uvas la menor concentración de CFT, y lo mismo ocurrió en el año 2021 para el tratamiento con nano-urea. Estos descensos registrados podrían suponer un debilitamiento de la pared celular debido a que a través de los compuestos fenólicos se establecen enlaces entrecruzados con otros componentes de la pared celular. Estos resultados estarían en contraposición a otros que indican que en situaciones de estrés abiótico, se induce la generación de peroxidasas y de especies reactivas al oxígeno, y son ambas las responsables de la formación de redes entre los compuestos fenólicos y las glicoproteínas de la pared celular, lo que provocaría un aumento de la rigidez de la propia pared (Tenhaken, 2015).

4.2.2.3. Azúcares neutros

El tratamiento con nano-urea en el año 2019 mostró las concentraciones más bajas de glucosa celulósica, en cambio en el año 2020 no se vio afectada por ninguno de los tratamientos y finalmente en el año 2021 fue en las uvas control donde se mostraron las concentraciones más altas. Un descenso en la celulosa supondría una pared celular más débil y podría estar relacionado con lo encontrado en estudios en arroz, donde se vio que aplicaciones de N en altas concentraciones producían una menor expresión de genes que regulan la biosíntesis de celulosa, además el análisis de la pared celular de las raíces mostraba una reducción de celulosa y lignina (Zhang et al., 2017), aunque en este estudio la aplicación de N fue en el suelo y no foliar como lo hemos aplicado nosotros. Por otro lado, Fernandes et al. (2016) observaron que en condiciones de deficiencia de N se producía un descenso en el contenido de celulosa en las paredes celulares de callos de células de *Vitis vinífera*.

Respecto a la glucosa no celulósica (hemicelulosa), los resultados mostraron un incremento en 2019 y 2021 en los dos tratamientos ya que en el año 2020 solo fue detectado este incremento en las paredes de las pieles de las uvas tratadas con urea. Un aumento en la cantidad de hemicelulosa provocaría un reforzamiento de la pared celular, debido a que actúa fijando las microfibrillas de celulosa (Ortega-Regules et al., 2008b). Los xiloglucanos, los principales polímeros que forman la hemicelulosa, también se vieron afectados en *Arabidopsis thaliana* por la absorción de N, ya que varias enzimas relacionadas con ellos se coexpresaron con el transportador de NO_3^- (Landi y Esposito, 2017).

4.2.2.4. Ácidos urónicos

En el año 2019 ambos tratamientos ocasionaron un descenso en la cantidad de ácidos urónicos, siendo más acusado en el tratamiento con urea. Sin embargo en los años 2020 y 2021 el efecto fue el contrario, se incrementó el contenido en ácidos urónicos en ambos tratamientos un 69% (urea) y 76% (nano-urea) en 2020 y 47% (urea) y 27% (nano-urea) en 2021. Este aumento de las pectinas debido a que actúan como sustancias cementantes en la pared celular (Jarvis, 1984) darían lugar a un reforzamiento de la misma. Es destacable el hecho de que los incrementos encontrados en 2020 y 2021 en las paredes de las uvas tratadas tuvieron mucho más peso que las variaciones producidas en el resto de componentes de la pared, así en 2020 el incremento del resto de componentes fue del 20% y 13% en los tratamientos con urea y nano-urea y en 2021 lo fue del 15% y 7% respectivamente, por lo que cabría suponer que las pectinas pudieron tener mucha más relevancia en su efecto sobre la rigidez de la pared celular.

Contrario al aumento en la cantidad de pectinas, encontramos como genes que regulan la expresión de pectinasas (pectín liasa, pectín acetilesterasa y pectín metilesterasa), se encuentran co-expresados con los transportadores de N en *Arabidopsis thaliana*, lo que podría inducir un debilitamiento de la pared celular (Landi y Esposito, 2017).

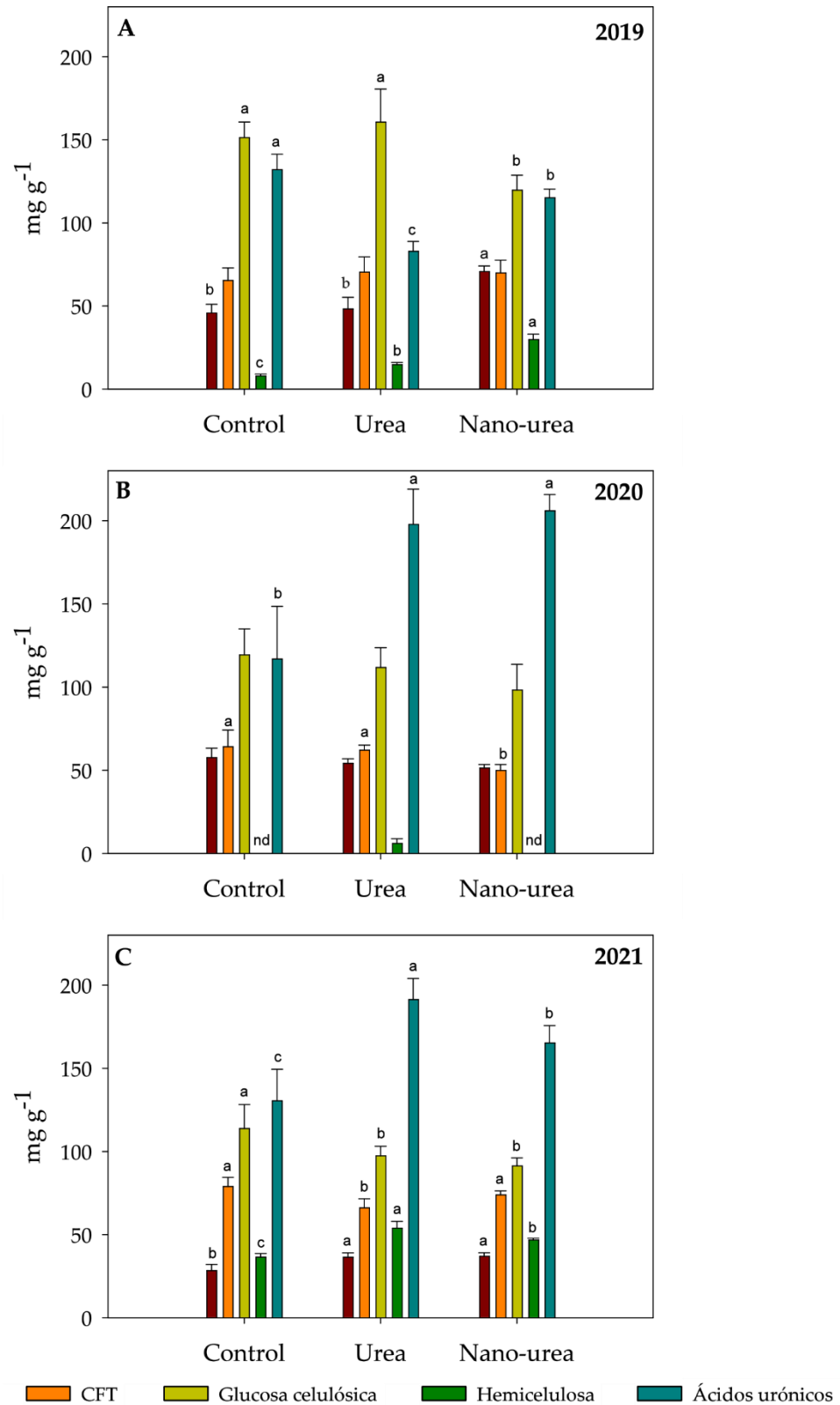


Figura 4.1. Composición de la pared celular en uvas Monastrell control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas (A) 2019, (B) 2020 y (C) 2021. Diferentes letras en las barras del mismo color indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (95% ($p < 0,05$)), nd: no detectado.

4.2.2.5. Análisis multifactorial

Se realizó un análisis multifactorial para definir como afectaban los factores tratamiento, añada y la interacción entre ambos a cada grupo de compuestos analizados en la pared celular.

	T (%)	A (%)	TxA (%)
Proteínas	9 ***	60 ***	22 ***
CFT	5 ns	39 ***	22 **
Glucosa celulósica	20 ***	57 ***	7 ns
Hemicelulosa	6 ***	87 ***	6 ***
Ácidos urónicos	14 ***	43 ***	35 ***

Tabla 4.4. Análisis multifactorial de los componentes de la pared celular con los factores tratamiento (T), añada (A) y la interacción tratamiento-añada (TxA). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$); ns, no significativo.

Como se puede observar en la **Tabla 4.4**, el factor predominante en todos los resultados obtenidos fue la añada, llegando a ser su influencia desde el 39% para los CFT hasta el 87% en el caso de la hemicelulosa. Respecto al efecto de los tratamientos, pudimos observar que la glucosa celulósica fue la que se vio más afectada con un 20%, seguido de los ácidos urónicos con un 14%. En el lado opuesto tenemos los CFT cuyo porcentaje de afectación se quedó en un 5% y además de modo no significativo. La interacción tratamiento-año tuvo importancia sobre todo en los ácidos urónicos (35%).

Otras investigaciones también mostraron resultados similares en los que la influencia de la estacionalidad fue evidente cuando estudiaron los diferentes componentes de la pared celular. Así Moreno-Olivares et al. (2022), mostraron diferencias entre las distintas añadas estudiadas en la mayoría de los componentes analizados en un estudio de caracterización de la pared celular de nuevos descendientes híbridos de Monastrell.

4.3. COMPUESTOS FENÓLICOS DE UVAS Y VINOS

4.3.1. ANTOCIANOS EN UVAS

La **Tabla 4.5** muestra el contenido de antocianos totales y los sumatorios por tipos de antocianos tales como los antocianos no acilados, encontrándose dentro de este grupo las formas di-hidroxiladas (Di-OH) (cianidina y peonidina) y las formas tri-hidroxiladas (Tri-OH) (delfinidina, petunidina y malvidina). Por otro lado se muestran los antocianos

acilados que son aquellos antocianos monoglucósidos acilados por diferentes ácidos orgánicos como son el ácido acético o el ácido cumárico dando lugar a los acetatos y cumaratos respectivamente.

Respecto a los diferentes años estudiados pudimos observar que la concentración antociánica de las uvas varió notablemente entre ellos obteniéndose las mayores concentraciones en el año 2019, seguido del año 2021 y finalmente del año 2020. Estos resultados podrían explicarse debido a las diferencias climatológicas experimentadas durante las tres añadas, así en el año 2020 se alcanzaron temperaturas superiores a los 35°C durante 15 días en el mes de agosto, frente a los 12 días que lo hicieron en 2019 y los 10 días en 2021. Temperaturas superiores a 35° C inhiben la síntesis (Kim et al., 2018) y además provocan la degradación de antocianos (Mori et al., 2007); pudiendo estas circunstancias ser las responsables del bajo contenido en antocianos que obtuvimos en el año 2020. En contraste, la alta concentración que encontramos de estos compuestos en el año 2019 pudo deberse en parte a que la vendimia se realizó prematuramente debido a las lluvias torrenciales que se produjeron durante el mes de septiembre. Es sabido que durante la maduración se produce un aumento en la síntesis de antocianos hasta alcanzar un máximo que posteriormente disminuye (Ortega-Regules et al., 2008c), siendo por lo tanto muy posible que se vendimiará próximo a este máximo.

El efecto de los tratamientos fue distinto los tres años de estudio en los diferentes parámetros antociánicos analizados. Respecto a los antocianos totales, en 2019 las concentraciones más bajas se obtuvieron en las uvas procedentes de ambos tratamientos, aún sin llegar a ser cambios significativos, en 2020 no encontramos diferencias entre las uvas control y las tratadas y en 2021 observamos un incremento en la concentración total de antocianos en las uvas tratadas con urea y un descenso en las tratadas nano-urea. Este comportamiento también fue el observado en los antocianos no acilados y las formas Tri-OH. Con respecto al resto de grupos analizados, solo encontramos diferencias significativas durante el último año de estudio, obteniendo las mayores concentraciones de antocianos acilados y cumaratos en las uvas control y las tratadas con urea y en el caso de las formas Di-OH y acetatos solo en las uvas tratadas con urea.

En cuanto a los reportado por otros autores, Portu et al. (2015b) detectaron un incremento en los antocianos totales sobre uva Tempranillo tratada con urea a dos concentraciones diferentes, aunque la fracción de antocianos acilados no se vio modificada. Por otro lado Cheng et al. (2020), en uvas de Cabernet Sauvignon tratadas con urea también a dos concentraciones diferentes, registraron un aumento en la concentración total de antocianos y en la fracción de antocianos no acilados, aunque estos últimos solo se vieron incrementados con la concentración más baja de urea.

El análisis multifactorial nos mostró que la añada fue el factor determinante en la modificación en el contenido de antocianos, sobre todo para el grupo de los antocianos no acilados (71%). Los tratamientos por si solos no fueron determinantes en la variabilidad experimentada en los resultados para los diferentes tipos de antocianos analizados, sin embargo la interacción tratamiento-añada mostró un porcentaje mayor en las formas Di-OH (22%) y en los acetatos (17%).

						Análisis multifactorial		
	Añada	Control	Urea	Nano-urea	p-value	T (%)	A(%)	TxA(%)
Antocianos Totales	2019	35944,54 ± 8541,29	30347,95 ± 4381,04	30937,84 ± 878,98	ns			
	2020	19975,09 ± 1293,97	21319 ± 1791,93	21222,12 ± 1538,16	ns	3	65	9
	2021	26887,99 ± 771,54 b	29566,11 ± 724,77 a	23616,34 ± 1421,81 c	**	(ns)	(***)	(ns)
No acilados	2019	31248,14 ± 7560,91	26253,79 ± 3616,79	27416,68 ± 763,26	ns			
	2020	16447,92 ± 1336,54	17206,97 ± 1450,05	17322,69 ± 1187,58	ns	2	71	8
	2021	21789,88 ± 472,18 b	24223,89 ± 717,16 a	19244,37 ± 1211,93c	**	(ns)	(***)	(ns)
Acilados	2019	4696,4 ± 991,77	4094,16 ± 788,10	3521,16 ± 445,19	ns			
	2020	3527,17 ± 90,20	4112,04 ± 446,43	3899,43 ± 428,28	ns	12	40	16
	2021	5098,11 ± 319,27 a	5342,21 ± 102,02 a	4371,98 ± 312,35 b	*	(ns)	(***)	(ns)
Di-OH	2019	8500,17 ± 1216,15	7468,09 ± 575,10	9817,35 ± 1576,02	ns			
	2020	5355,93 ± 778,15	4673,73 ± 554,97	5328,18 ± 408,83	ns	0	64	22
	2021	6713,45 ± 376,69 b	8390,33 ± 3,79 a	5871,81 ± 522,00 c	***	(ns)	(***)	(**)
Tri-OH	2019	22747,97 ± 6373,46	18785,70 ± 3478,85	17599,33 ± 2012,72	ns			
	2020	11091,98 ± 575,69	12533,24 ± 1327,02	11994,51 ± 1129,80	ns	4	61	8
	2021	15076,42 ± 612,52 a	15833,57 ± 720,79 a	13372,56 ± 1001,60 b	*	(ns)	(***)	(ns)
Acetatos	2019	892,3 ± 184,51	735,47 ± 173,90	710,31 ± 75,71	ns			
	2020	812,02 ± 22,85	971,70 ± 103,75	914,45 ± 99,95	ns	7	53	17
	2021	1088,57 ± 61,64 b	1237,07 ± 43,86 a	959,67 ± 54,94 c	**	(ns)	(***)	(*)
Cumaratos	2019	3754,47 ± 825,98	3286,11 ± 581,25	2794,57 ± 349,85	ns			
	2020	2701,64 ± 95,84	3117,74 ± 336,42	2969,61 ± 323,58	ns	13	38	15
	2021	3933,05 ± 272,10 a	4076,43 ± 59,36 a	3365,14 ± 253,59 b	*	(ns)	(***)	(ns)

Tabla 4.5. Concentración de antocianos ($\mu\text{g/g}$ hollejo) en las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$); ns, no significativo.

4.3.2. ANTOCIANOS EN VINO

En la **Tabla 4.6** se muestran los resultados obtenidos para los antocianos totales y los diferentes grupos de antocianos presentes en los vinos elaborados a partir de las uvas control y aquellas tratadas con urea y con nano-urea. En los vinos, además de los antocianos que anteriormente se identificaron en las uvas, encontramos aductos de antocianos producidos durante la fermentación, concretamente la vitisina A y la vitisina B, ambas son derivados de la malvidina-3-O-glucosido de modo que la primera se forma por reacción con el ácido pirúvico y la segunda con el acetaldehído (Morata et al., 2003). Además, la vitisina A también se encontró en su forma acetilada (acetil-vitisina A).

En general, al igual que ocurría en las uvas, las cantidades de antocianos totales en los vinos fueron diferentes en función de la añada, así las mayores concentraciones se obtuvieron en el año 2019, seguido del año 2021 y por último del año 2020. También pudimos observar que las diferencias observadas en las uvas, en los vinos ya no estuvieron presentes. En general, solo se observaron pocas diferencias significativas entre los vinos control y los tratados y cuando las hubo, las mayores concentraciones se mostraban en los vinos control. Así, los valores de los antocianos totales para los vinos procedentes de ambos tratamientos no mostraron diferencias significativas con los vinos control en el año 2019, a pesar de que durante este año las uvas tratadas mostraron concentraciones de antocianos totales algo inferiores a los de las uvas control (**Tabla 4.5**). Durante el año 2020 los vinos control obtuvieron las concentraciones más altas de antocianos aunque las uvas tratadas y sin tratar presentaron valores similares de antocianos totales. Este hecho podría explicarse por los incrementos en el %CWM y en el contenido en ácidos urónicos (69% en urea y 76% en nano-urea) en las uvas tratadas, que pudo provocar un reforzamiento de la pared celular y con ello dificultar la extracción de antocianos durante el proceso de vinificación. Finalmente, en el año 2021 solo se detectó una tendencia al descenso en la cantidad de antocianos en los vinos procedentes de las uvas tratadas, siendo más acusada en el tratamiento con nano-urea, aunque en ningún caso llegó a ser significativa. En este caso pudimos observar que la mayor dificultad en la extracción de estos compuestos ocurrió en el caso del tratamiento con urea, achacable de nuevo a los aumentos producidos en el %CWM junto al de los

ácidos urónicos (47%) en las paredes celulares de las uvas correspondientes a este tratamiento respecto al control.

Los resultados aportados por otros autores son dispares, por un lado Portu et al. (2015a) en su estudio sobre vinos de Tempranillo procedentes de uvas tratadas con urea a dos concentraciones diferentes, detectaron un incremento en los antocianos totales aunque las vitisinas no se vieron afectadas. Por el contrario, Gutiérrez-Gamboa et al. (2017b) en vinos de Cabernet Sauvignon procedentes de uvas tratadas con urea observaron un descenso en los antocianos totales, incluyendo los no acilados, los acilados y los cumaratos, sin embargo la vitisina A se vio incrementada. Finalmente, Cheng et al. (2020) que también estudiaron la aplicación de urea sobre Cabernet Sauvignon a dos concentraciones diferentes registraron solo un incremento de los antocianos no acilados a la dosis baja de urea, en cambio los antocianos totales no se vieron modificados en ninguna de las dos dosis empleadas.

El análisis multifactorial realizado nos indicó que los tratamientos afectaron escasamente a la cantidad total de antocianos y a los diferentes grupos de antocianos analizados en los vinos, siendo solo significativo en el caso de los antocianos totales (4%), los no acilados (6%) y los Tri-OH (7%) pero con porcentajes muy bajos. La añada, como era de esperar, fue el factor determinante, llegando a explicar el 85% de la variabilidad de los resultados obtenidos en el caso de los antocianos totales y el 91% en el de las vitisinas. Finalmente, vimos que la interacción tratamiento-año apenas afectó a los resultados obtenidos y tan solo alcanzó un valor significativo para el caso de los antocianos Di-OH (13%).

						Análisis multifactorial		
	Añada	Control	Urea	Nano-urea	p-value	T (%)	A(%)	TxA(%)
Antocianos Totales	2019	608,03 ± 60,39	592,79 ± 21,82	588,65 ± 26,90	ns			
	2020	423,32 ± 15,99 a	339,48 ± 33,64 b	359,64 ± 8,08 b	**	4	85	2
	2021	554,12 ± 41,87	522,47 ± 42,69	503,21 ± 46,01	ns	(*)	(***)	(ns)
No acilados	2019	520,57 ± 54,43	496,83 ± 30,89	488,29 ± 19,06	ns			
	2020	364,06 ± 13,13 a	292,73 ± 29,62 b	310,48 ± 6,50 b	**	6	82	1
	2021	466,69 ± 39,68	442,32 ± 37,54	420,94 ± 34,55	ns	(*)	(***)	(ns)
Acilados	2019	78,99 ± 4,99	87,16 ± 8,19	89,98 ± 19,13	ns			
	2020	57,30 ± 3,64 a	45,38 ± 4,03 b	47,91 ± 1,45 b	**	1	78	5
	2021	82,61 ± 2,79	76,28 ± 6,66	78,80 ± 11,32	ns	(ns)	(***)	(ns)
Di-OH	2019	83,14 ± 14,02	81,65 ± 4,35	90,8 ± 14,72	ns			
	2020	61,1 ± 7,68 a	41,73 ± 7,83 b	48,07 ± 1,63 b	*	1	68	13
	2021	61,09 ± 10,05	73,03 ± 8,56	57,20 ± 6,18	ns	(ns)	(***)	(*)
Tri-OH	2019	437,43 ± 41,01	415,17 ± 26,58	397,49 ± 8,66	ns			
	2020	302,96 ± 11,27 a	251,00 ± 21,79 b	262,41 ± 8,02 b	*	7	83	1
	2021	405,60 ± 29,63	369,28 ± 29,19	363,74 ± 28,89	ns	(**)	(***)	(ns)
Acetatos	2019	31,23 ± 1,14	34,31 ± 5,52	37,91 ± 8,56	ns			
	2020	19,13 ± 1,05	16,87 ± 1,42	17,42 ± 0,43	ns	1	81	4
	2021	23,50 ± 0,31	21,62 ± 1,50	21,70 ± 1,93	ns	(ns)	(***)	(ns)
Cumaratos	2019	47,75 ± 3,86	52,43 ± 1,97	51,2 ± 9,84	ns			
	2020	38,17 ± 2,73 a	28,51 ± 2,63 b	30,49 ± 1,13 b	**	1	80	5
	2021	58,93 ± 2,89	54,66 ± 5,33	57,10 ± 9,45	ns	(ns)	(***)	(ns)
Vitisinas	2019	8,47 ± 1,19	8,81 ± 1,35	10,38 ± 1,79	ns			
	2020	1,97 ± 0,34 a	1,37 ± 0,15 b	1,24 ± 0,13 b	*	0	91	3
	2021	4,82 ± 1,17	3,87 ± 0,23	3,47 ± 0,28	ns	(ns)	(***)	(ns)

Tabla 4.6. Concentración de antocianos (mg/L) en vinos procedentes de las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Los datos representan las medias ± desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LDS. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05); ns, no significativo.

4.3.3. ESTILBENOS EN UVAS

La **Tabla 4.7** muestra las concentraciones encontradas en las pieles de las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea para los diferentes estilbenos analizados, así como para el total de estilbenos llevados a cabo en los tres años de estudio (2019-2021).

Considerando los resultados obtenidos para el total de estilbenos y teniendo en cuenta el caso más desfavorable que resultó ser la uva control en el año 2020 con un contenido de 53,79 $\mu\text{g/g}$ hollejo (equivalente a unos 3,8 mg/Kg uva), la variedad Monastrell puede clasificarse como “alta productora de estilbenos” siguiendo la clasificación propuesta por Gatto et al. (2008). Estos autores clasificaron las variedades de uva en función del rango de producción de estilbenos en altas productoras de estilbenos (estilbenos totales $> 2,3$ mg/kg uva) y bajas productoras de estilbenos (estilbenos totales 0,2-1,8 mg/kg uva).

Con respecto a los diferentes años de estudio pudimos observar como los resultados fueron variables en función de la añada estudiada. El año 2019 fue el año en el que mayor cantidad de estilbenos se detectaron en la uva, los valores que presentaron las muestras control duplicaron a las encontradas en los años 2020 y 2021. Durante el año 2019, antes del momento de vendimia se produjo un episodio de lluvias abundantes y quizá posibles indicios de aparición de focos de podredumbre, lo que pudo inducir una mayor síntesis de estilbenos. Diversas investigaciones proponen que los ataques fúngicos pueden provocar este efecto; así en estudios previos se detectó como en discos de hojas infectadas artificialmente por *oidio* se encontraron mayores cantidades de estilbenos en el lugar de infección, produciéndose una acumulación de viniferinas en la reacción de defensa de la vid (Schnee et al., 2008); por otro lado es conocida la fungotoxicidad de los estilbenos tanto en *mildiu* como en *Botrytis cinerea* (Langcake y Pryce, 1976). Además, pudimos observar que los valores obtenidos este año en compuestos como el *trans*-resveratrol y ϵ -viniferina fueron también muy superiores al resto de añadas, que por otra parte son los estilbenos que se ven más inducidos en casos de infecciones de *mildiu* (Jean-Denis et al., 2006).

Para el resto de añadas de estudio, a pesar de que el año 2020 registró más días con temperaturas superiores a 35°C que el año 2021, estas condiciones adversas no

afectaron al contenido de los diferentes estilbenos en las muestras control ni en los tratamientos, puesto que no encontramos diferencias significativas para ninguno de los parámetros medidos. Finalmente, los valores encontrados en el año 2021 fueron muy similares a los del año anterior.

El efecto de los tratamientos sobre la cantidad de estilbenos totales fue diferente en los tres años de estudio. En 2019 ninguno de los tratamientos produjo efecto alguno sobre la concentración de estilbenos totales. En los años, 2020 y 2021 el tratamiento con urea provocó un aumento en el contenido total de estos compuestos. En estos dos años, el tratamiento con nano-urea produjo resultados dispares, así en el año 2020 este tratamiento fue el que obtuvo las concentraciones más bajas de estilbenos totales, sin embargo en el año 2021 logró incrementar su concentración en comparación con las uvas control.

En relación a los diferentes estilbenos individuales analizados, durante la campaña 2019 las concentraciones de piceatanol y *cis*-piceido no se vieron afectadas por ninguno de los tratamientos, no encontrándose diferencias significativas con las concentraciones encontradas en las uvas control. Los compuestos *trans*-piceido y *trans*-resveratrol mostraron concentraciones más bajas en las uvas tratadas que en las uvas control, mientras que ϵ -viniferina aumentó su concentración con el tratamiento con urea pero sin llegar a ser significativo.

En el año 2020 los diferentes estilbenos analizados incrementaron su concentración con el tratamiento de urea, en contraposición de lo obtenido con el tratamiento con la nano-urea donde se pudo observar las concentraciones más bajas de los estilbenos mayoritarios ϵ -viniferina y *trans*-resveratrol, aunque este último sin llegar a ser significativo. Finalmente, en el año 2021 los resultados fueron diferentes a los de los años previos, puesto que todos los estilbenos analizados mostraron las concentraciones más altas en las uvas tratadas con nano-urea salvo en el caso del *trans*-resveratrol cuyos valores fueron superiores en el tratamiento con urea, seguido del tratamiento con nano-urea y finalmente del control.

Autores como Garde-Cerdán et al. (2015) mostraron incrementos en *trans*-resveratrol, *trans*-piceido y *cis*-piceido, además de en el total de los estilbenos en uvas de Tempranillo que habían sido tratadas con urea. Por otro lado, Portu et al. (2015b) en un estudio, también en Tempranillo, en el que se aplicó urea a dos concentraciones diferentes no fue capaz de detectar un gran efecto en el contenido en estilbenos de las uvas tratadas. Asimismo, de los estilbenos estudiados (*trans*-piceido, *cis*-piceido, *trans*-resveratrol y *cis*-resveratrol) solo registró un incremento en la cantidad de *cis*-piceido en la menor dosis de urea aplicada. El mismo autor, en uvas de Garnacha, Graciano y Tempranillo tratadas con urea obtuvo incrementos en algunos de los estilbenos analizados dependiendo de la variedad, concretamente se incrementaron el *trans*-piceido en Tempranillo, *cis*-piceido y ϵ -viniferina en Graciano y *trans*-resveratrol en Garnacha, aunque la cantidad total de estilbenos tan solo se vio incrementada en Tempranillo (Portu et al., 2018a).

Contrariamente a lo observado hasta ahora, el análisis multifactorial nos indicó una cierta influencia del factor tratamiento sobre el contenido de los diferentes estilbenos analizados, siendo el estilbeno más afectado por este factor el *trans*-piceido (22%) y el menor la ϵ -viniferina (9%). Por otro lado, la añada fue el factor determinante mostrando el mayor porcentaje obtenido de 68% para la ϵ -viniferina y el menor para el *trans*-piceido que solo alcanzó el 30%. En este caso pudimos ver que la interacción tratamiento-año tuvo un papel relevante en los resultados obtenidos (15-50%), destacando sobre todo en el caso de estilbenos como el piceatanol y *trans*-piceido.

						Análisis multifactorial		
	Añada	Control	Urea	Nano-urea	p-value	T (%)	A(%)	TxA(%)
<i>trans-piceido</i>	2019	0,17 ± 0,01 a	0,13 ± 0,01 c	0,15 ± 0,01 b	**			
	2020	1,75 ± 0,24 b	15,09 ± 0,55 a	1,17 ± 0,17 b	***	22	30	48
	2021	1,04 ± 0,54 b	1,73 ± 0,20 ab	3,11 ± 0,79 a	*	(***)	(***)	(***)
Piceatanol	2019	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	ns			
	2020	0,35 ± 0,05 b	2,10 ± 0,17 a	0,28 ± 0,04 b	***	17	32	50
	2021	0,36 ± 0,11 b	0,42 ± 0,04 b	0,90 ± 0,17 a	**	(***)	(***)	(***)
<i>cis-Piceido</i>	2019	0,77 ± 0,08	0,77 ± 0,14	0,66 ± 0,06	ns			
	2020	2,66 ± 0,59 b	15,31 ± 1,28 a	3,36 ± 1,85 b	***	17	41	41
	2021	1,14 ± 0,25 b	1,02 ± 0,02 b	2,63 ± 0,81 a	*	(***)	(***)	(***)
<i>trans-resveratrol</i>	2019	50,60 ± 4,08 a	44,71 ± 1,29 b	43,42 ± 0,53 b	*			
	2020	26,17 ± 7,70	31,71 ± 1,05	14,91 ± 0,34	ns	12	64	15
	2021	32,92 ± 3,52 b	50,96 ± 9,19 a	38,91 ± 4,82 ab	*	(***)	(***)	(***)
ϵ -viniferina	2019	67,35 ± 4,76	74,65 ± 2,82	68,49 ± 1,77	ns			
	2020	22,29 ± 3,88 b	48,44 ± 1,84 a	12,94 ± 3,71 c	**	9	68	21
	2021	21,24 ± 0,86 c	37,32 ± 2,74 b	55,74 ± 8,61 a	**	(***)	(***)	(***)
Totales	2019	118,95 ± 8,51	120,31 ± 4,04	112,78 ± 1,69	ns			
	2020	53,23 ± 8,37 b	112,66 ± 2,46 a	33,66 ± 5,43 c	***	19	46	32
	2021	56,70 ± 2,97 c	68,32 ± 6,00 b	99,58 ± 4,65 a	***	(***)	(***)	(***)

Tabla 4.7. Concentración de estilbenos ($\mu\text{g/g}$ hollejo) en las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$).

4.3.4. ESTILBENOS EN VINOS

En la **Tabla 4.8** se recogen las concentraciones de los diferentes estilbenos analizados así como el total de estilbenos encontrados en los vinos elaborados a partir de las uvas control y de las tratadas con urea y nano-urea al final de fermentación alcohólica.

De los resultados mostrados, pudimos observar que la extracción de estos compuestos en el vino fue dispar durante los tres años estudiados. En el año 2019, se observó que la extracción en el vino de estos compuestos fue limitada, dado que se encontró una gran cantidad de estilbenos en las uvas que posteriormente no fueron transferidos al vino. Tomando como referencia el vino control, se pudo observar que el valor obtenido de estilbenos totales en el 2019 fue similar al obtenido en el 2020, partiendo de uvas con la mitad de concentración de estos compuestos en este segundo año. Sin embargo, en el año 2021 ocurrió lo contrario, la cantidad de estilbenos obtenida en el vino control fue muy superior a la encontrada en 2020 partiendo de uvas con un contenido similar. Estos hechos se podrían explicar si nos fijamos en los datos obtenidos de rendimiento de pared celular aislada en las uvas control (%CWM) (**Tabla 4.3**). Durante el año 2019 se obtuvo el mayor porcentaje de pared celular, lo que indicaría un mayor grosor, además este mismo año la cantidad de celulosa también fue superior a la obtenida en los años posteriores lo que favorecería una mayor rigidez de la pared, pudiendo estos dos factores dificultar la extracción de los estilbenos en el proceso de elaboración del vino. Por otro lado, en 2021 el %CWM fue el menor, esto unido a una cantidad de proteínas bastante inferior a los dos años anteriores facilitaría la extracción de estos compuestos en el vino.

Como ya hemos comentado anteriormente, el efecto de los tratamientos fue escaso en los resultados obtenidos. Así, solo en 2021 se encontraron diferencias significativas, para el *trans*-piceido se observó cómo los vinos procedentes del nanotratamiento obtuvieron las concentraciones más bajas y en ambos tratamientos para el *cis*-piceido. Por otro lado, como ya se vio en el apartado 4.3.2, ambos tratamientos provocaron un aumento en la cantidad de estilbenos en las uvas durante los años 2020 y 2021 (salvo el tratamiento con nano-urea el 2020) pero esto no fue trasladado a los vinos.

Este hecho nos indicaría de nuevo una menor extracción de los estilbenos que se podría achacar a un incremento en la fortaleza de las paredes celulares de las uvas procedentes de los tratamientos, quizás debida por un lado al mayor grosor de pared (incremento del %CWM) y por otro al aumento en ácidos urónicos como ya hemos visto en el apartado 4.2.2.4. En consideración a la diferente extracción producida el año 2020 en el tratamiento con urea y el de nano-urea, esta diferencia podría deberse a que en este último tratamiento se produjeron descensos en la celulosa, los CFT y las proteínas, que aunque no fueron importantes se podría considerar que su acción conjunta pudo conseguir un debilitamiento de la pared, y con ello una mayor extracción de estos compuestos en el tratamiento con nano-urea.

Otro factor a tener en cuenta en los resultados obtenidos podrían ser los procesos de transformación que pueden experimentar los estilbenos en el vino, tales como la isomerización, lo que provocaría una variación de su composición (Sun et al., 2006). Por otro lado, debemos considerar que además de los estilbenos que se han cuantificado, en las uvas se pueden encontrar otros como pterostilbeno (Martínez-Márquez, 2016) y que no se han tenido en cuenta, por lo que podría ser posible que algunos de los cambios difíciles de explicar se pudieran deber también a no haber considerado la existencia de estos otros estilbenos, tanto en uvas como en vinos.

El escaso efecto encontrado en los vinos procedentes de las uvas tratadas también fue observado por autores como Portu et al. (2015a), que en tratamientos sobre Tempranillo con urea a dos concentraciones diferentes solo encontraron concentraciones inferiores de *cis*-resveratrol en los vinos procedentes de los tratamientos, quedando el resto de estilbenos sin cambios (*trans*-piceido, *cis*-piceido y *trans*-resveratrol) cuando se comparaban con los vinos control. Sin embargo, autores como Garde-Cerdán et al. (2015) mostraron incrementos en *trans*-resveratrol, *trans*-piceido y *cis*-piceido en vinos procedentes de uva Tempranillo tratadas con urea.

De nuevo el análisis multifactorial nos indicó que los tratamientos tuvieron escaso efecto en los resultados obtenidos en los vinos y que la añada fue el factor determinante en todos ellos. Por otro lado, la interacción tratamiento-año solo tuvo importancia en el caso del compuesto *trans*-piceido (21%)

						Análisis multifactorial		
	Añada	Control	Urea	Nano-urea	p-value	T (%)	A(%)	TxA(%)
<i>trans-piceido</i>	2019	0,77 ± 0,10	0,81 ± 0,08	0,96 ± 0,17	ns			
	2020	1,88 ± 0,30	1,45 ± 0,24	1,5 ± 0,12	ns	6	54	21
	2021	1,23 ± 0,21 a	1,02 ± 0,12 a	0,67 ± 0,16 b	*	(ns)	(***)	(*)
Piceatanol	2019	0,23 ± 0,04	0,24 ± 0,04	0,25 ± 0,07	ns			
	2020	0,14 ± 0,06	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01	ns	1	79	5
	2021	0,31 ± 0,02	0,36 ± 0,03	0,38 ± 0,07	ns	(ns)	(***)	(ns)
<i>cis-Piceido</i>	2019	0,73 ± 0,15	1,05 ± 0,33	1,11 ± 0,14	ns			
	2020	1,36 ± 0,17	1,03 ± 0,15	1,21 ± 0,01	ns	12	7	48
	2021	1,91 ± 0,14 a	1,07 ± 0,06 b	1,25 ± 0,18 b	***	(ns)	(ns)	(**)
<i>trans-Resveratrol</i>	2019	1,99 ± 0,69	1,87 ± 0,38	2,04 ± 0,35	ns			
	2020	1,35 ± 0,15	1,04 ± 0,20	1,18 ± 0,05	ns	2	86	2
	2021	6,15 ± 0,95	8,11 ± 0,28	7,59 ± 1,56	ns	(ns)	(***)	(ns)
ϵ -viniferina	2019	2,03 ± 0,25	1,85 ± 0,35	1,96 ± 0,25	ns			
	2020	1,13 ± 0,22	0,56 ± 0,21	0,76 ± 0,17	ns	2	87	2
	2021	3,91 ± 0,61	3,72 ± 0,37	4,59 ± 0,55	ns	(ns)	(***)	(ns)
Totales	2019	5,76 ± 0,92 b	5,81 ± 0,98	6,32 ± 0,71	ns			
	2020	5,87 ± 0,90	4,14 ± 0,77	4,74 ± 0,31	ns	0	84	2
	2021	13,49 ± 1,78	14,27 ± 0,70	14,48 ± 2,41	ns	(ns)	(***)	(ns)

Tabla 4.8. Concentración de estilbenos (mg/L) en vinos procedentes de uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Los datos representan las medias ± desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05); ns, no significativo.

4.3.5. PROANTOCIANIDINAS EN LOS HOLLEJOS Y SEMILLAS DE LAS UVAS

La **Tabla 4.9** muestra los valores encontrados para las PAs totales de hollejos y semillas obtenidas después del proceso de floroglucinolisis, así como para los valores de gMP y %Gal para las uvas tratadas y sin tratar.

Tal como podemos observar, los valores obtenidos en las PAs totales varían según el año de estudio, este hecho ha sido recogido por numerosos investigadores que muestran un amplio rango de variabilidad en la cuantificación de PAs debido a la influencia de diversos factores como la variedad, condiciones climáticas y prácticas de cultivo (Jordão y Ricardo-da-Silva, 2018). Además, los resultados encontrados en las uvas son acordes a lo mostrado por otros autores en la variedad Monastrell cultivadas en la Región de Murcia (Moreno-Olivares et al., 2023; Paladines-Quezada et al., 2021; Ruiz-García y Gómez-Plaza, 2013).

Como era de esperar, el contenido de PAs obtenidas en las semillas fue muy superior al encontrado en las pieles. En el caso de los hollejos, los valores más altos correspondieron al año 2020, este año coincide con el que obtuvimos una menor síntesis de antocianos, lo que estaría de acuerdo a lo apuntado por Ruíz-García y Gómez-Plaza (2013) quienes reportaron que una mayor activación en la síntesis de taninos da lugar a un mayor consumo de sustratos que son comunes a la síntesis de antocianos, lo que provocaría una menor síntesis de estos últimos. En el caso de las semillas, la mayor concentración de PAs fue obtenida en el año 2019, que correspondió al año en el que se vendimió la uva más tempranamente antes de alcanzar una adecuada madurez. Este hecho corresponde con lo aportado por otros autores, que indican que la cantidad de taninos desciende desde el envero durante el proceso de maduración hasta el momento de la vendimia, debido a procesos de oxidación de los propios taninos (Kennedy et al., 2000). En nuestro caso, al ser la uva vendimiada más tempranamente, ese descenso no fue tan acusado como el producido en los años posteriores.

A		Hollejo			
		Control	Urea	Nano-Urea	p-value
2019	PAs Total	8627,35 ± 872,42	8506,10 ± 1450,71	8898,94 ± 1100,88	ns
	gMP	14,36 ± 1,76	14,57 ± 1,82	17,17 ± 2,15	ns
	%Gal	3,49 ± 0,26	4,02 ± 1,05	2,58 ± 0,55	ns
2020	PAs Total	10294,75 ± 792,39	11189,94 ± 317,43	10426,48 ± 829,91	ns
	gMP	17,27 ± 0,78	16,07 ± 0,31	15,11 ± 2,28	ns
	%Gal	1,16 ± 0,14	1,04 ± 0,11	1,69 ± 0,33	ns
2021	PAs Total	6104,03 ± 763,55 b	8595,81 ± 581,98 a	5836,09 ± 640,49 b	*
	gMP	14,14 ± 0,80	14,50 ± 1,26	15,69 ± 1,37	ns
	%Gal	1,41 ± 0,28	1,42 ± 0,12	1,20 ± 0,24	ns

B		Semilla			
		Control	Urea	Nano-Urea	p-value
2019	PAs Total	42682,29 ± 3366,48	37374,36 ± 532,71	35464,27 ± 3735,71	ns
	gMP	5,69 ± 0,14	5,79 ± 0,14	6,05 ± 0,26	ns
	%Gal	14,12 ± 0,35	14,00 ± 0,59	15,01 ± 0,48	ns
2020	PAs Total	15169,41 ± 2122,90 b	23098,68 ± 3790,55 a	27649,02 ± 793,79 a	*
	gMP	7,74 ± 0,49	6,97 ± 0,08	7,03 ± 0,12	ns
	%Gal	14,78 ± 0,08 b	14,41 ± 0,14 c	15,87 ± 0,16 a	***
2021	PAs Total	27761,97 ± 1661,78	29986,88 ± 742,54	28153,4 ± 2852,15	ns
	gMP	6,62 ± 0,09 a	6,31 ± 0,25 a	5,92 ± 0,09 b	**
	%Gal	13,15 ± 0,63	12,84 ± 0,52	12,87 ± 0,41	ns

Tabla 4.9. Concentración de proantocianidinas (PAs) totales, grado medio de polimerización (gMP) y % de galoilación (%Gal), tras reacción de floroglucinosilosis en **(A)** hollejo ($\mu\text{g/g}$ hollejo) y en **(B)** semillas ($\mu\text{g/g}$ semilla) de las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$); ns, no significativo.

El gMP es inversamente proporcional a la cantidad de monómeros encontrados en la uva, siendo mayor en los hollejos que en las semillas (Jordão y Ricardo-da-Silva, 2018). Tal como podemos observar en la **Tabla 4.9(A)**, en los hollejos se obtuvo los valores más altos para este parámetro en el año 2020 en comparación con los otros dos años de estudio. Esto podría ser debido al mayor grado de maduración que mostraron las uvas (14 °Bé frente a los 13 °Bé de 2019 y 2021), ya que otros autores han detectado incrementos de gMP de las PAs de las pieles con el grado de maduración (Hanlin y Downey, 2009; Kennedy et al., 2000). Por otro lado, el mayor gMP en las semillas también se detectó en el año 2020.

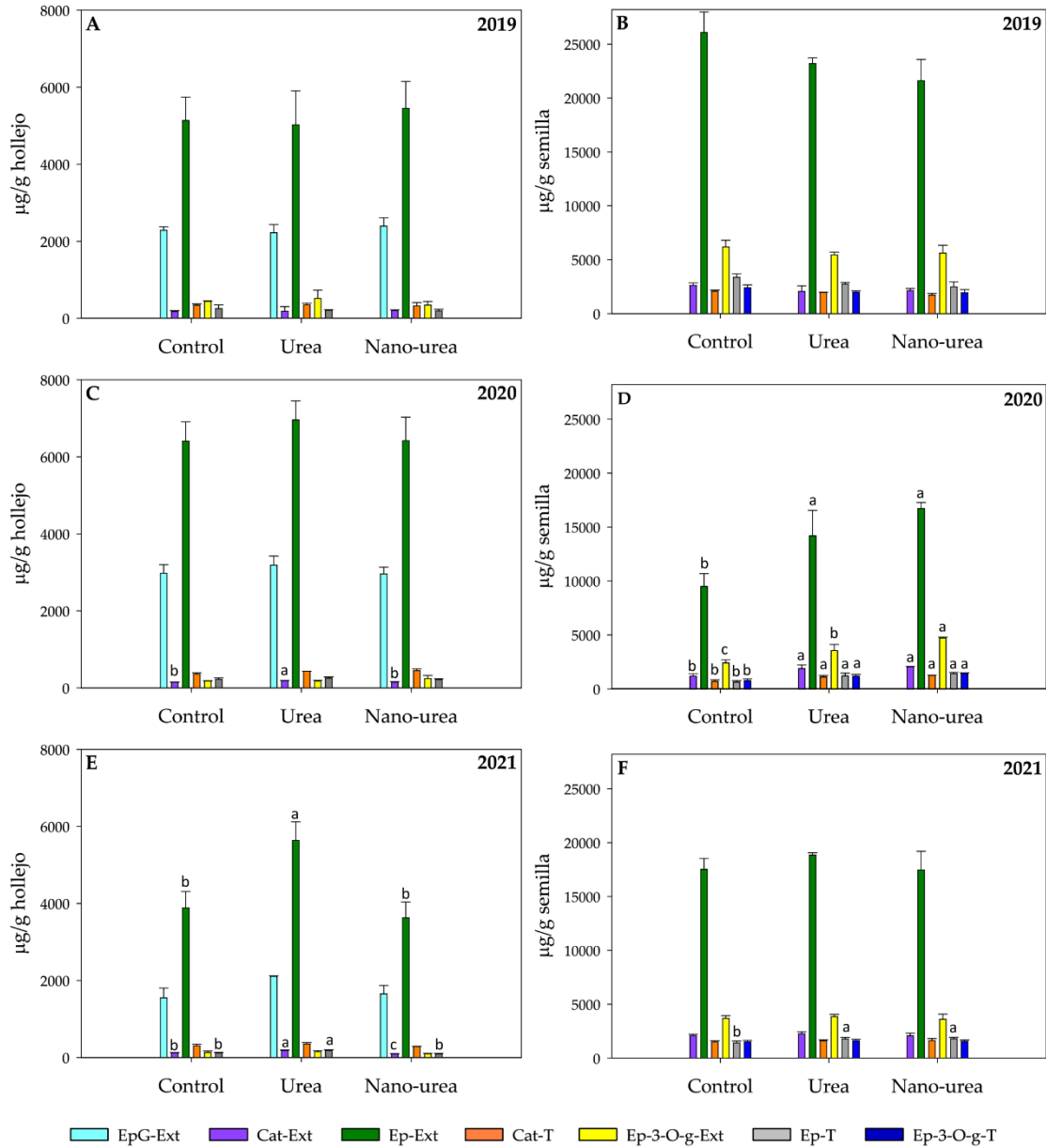


Figura 4.2. Concentración de las diferentes fracciones de proantocianidinas en (A, C, E) hollejo ($\mu\text{g/g}$ hollejo) y en (B, D, F) semillas ($\mu\text{g/g}$ semilla) en las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021. EpG-Ext,(-) epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+) catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-) epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)epicatequina-3-orto-galato terminal. Las barras representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en el mismo grupo de barras indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD 95%($p < 0,05$).

En cuanto al efecto de los tratamientos, en los hollejos (**Tabla 4.9(A)**) se detectó un incremento en las PAs totales en el tratamiento con urea en 2021. El gMP y %Gal no se vieron afectados por los tratamientos. Con respecto a las distintas fracciones analizadas en 2019 (**Figura 4.2(A)**), no observamos diferencias significativas entre los tratamientos y el control, en el año 2020 (**Figura 4.2(C)**) solo se vio incrementada la Cat-Ext en el tratamiento con urea. Finalmente el año 2021 (**Figura 4.2(E)**) fue en el que los tratamientos mostraron mayor efecto, con aumentos en los tratamientos con urea en , Ep-Ext y la Ep-T. Sin embargo, el tratamiento con nano-urea mostró las concentraciones más bajas en Cat-Ext y en la Ep-T.

En el caso de las semillas (**Tabla 4.9(B)**), sólo en el año 2020 se produjeron incrementos en las PAs totales en ambos tratamientos, respecto al gMP el tratamiento con nano-urea mostró los valores bajos en 2021. Por otro lado el %Gal fue inferior en el tratamiento con urea y aumentó en el de nano-urea en 2020. En relación a las fracciones de PAs individuales, durante el año 2019 (**Figura 4.2(B)**) no mostraron ninguna diferencia significativa entre las uvas control y las tratadas. Sin embargo en el año 2020 (**Figura 4.2(D)**) cada una de las fracciones analizadas mostraron incrementos en ambos tratamientos. Finalmente en el año 2021 (**Figura 4.2(F)**) tan solo se vio modificada la Ep-T con incrementos en ambos tratamientos.

Autores como Portu et al. (2015b) analizaron la cantidad de PAs en una masa homogénea de uvas de Tempranillo (incluido piel y semillas) tratada previamente con urea en dos dosis diferentes y encontraron variaciones en la concentración de PAs dependiendo de la dosis aplicada. Resultados similares fueron mostrados por Cheng et al. (2020) también en tratamientos a dos dosis diferentes de urea en uvas de Cabernet Sauvignon.

El análisis multifactorial (**Tabla 4.10**) nos mostró que en los hollejos el tratamiento no fue un factor significativo en ninguno de los parámetros analizados, siendo la añada el factor determinante en el caso del %Gal (80%) o en el de la EpG-3-O-g-Ext (67%). La interacción tratamiento-año solo fue significativa en el parámetro %Gal (11%). Por otro lado, en relación a las semillas, los resultados obtenidos estuvieron mucho más influenciados por la añada que en el caso de los hollejos, destacando

parámetros como la Cat-T (80%) y la Ep-T (78%). El factor tratamiento no tuvo apenas influencia sobre los resultados obtenidos, siendo solo significativo en el caso del %Gal, sin embargo la interacción tratamiento-año sí que tuvo cierta relevancia, destacando su significancia sobre la fracción Cat-Ext (31%).

	Hollejos			Semillas		
	T (%)	A(%)	TxA(%)	T (%)	A(%)	TxA(%)
Total	14	39**	1	1	74***	14**
EpG-Ext	12	46**	1	nd	nd	nd
Cat-Ext	17	35**	4	1	39***	31**
Ep-Ext	14	34**	2	1	75***	13**
Cat-T	14	27	17	2	80***	11**
Ep-3-O-g-Ext	4	67***	11	2	68***	14**
Ep-T	4	46**	6	0	78***	12**
Ep-3-O-g-T	nd	nd	nd	0	71***	15**
gMP	4	8	28	6**	74***	12**
%Gal	2	80***	11**	12**	69***	8*

Tabla 4.10. Análisis multifactorial de las distintas fracciones de proantocianidinas (EpG-Ext, (-)-epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-)-epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)-epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal), grado medio de polimerización (gMP) y % de galoilación (%Gal) en hollejo y en semillas con los factores tratamiento (T), añadida (A) y la interacción tratamiento y añadida (TxA). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$), 95%* ($p < 0,05$) y ns, no significativo.

4.3.6. PROANTOCIANIDINAS EN VINOS

La **Tabla 4.11**, muestra las concentraciones totales de PAs en los vinos control y en los elaborados a partir de uvas tratadas con urea y con nano-urea, así como los valores de gMP y el %Gal después de la fermentación alcohólica.

A pesar de las diferencias encontradas en las PAs en hollejos y semillas de las uvas control en los diferentes años de estudio, los valores encontrados en los correspondientes vinos no fueron tan dispares, no pudiéndose establecer una correlación entre el contenido en las uvas y el obtenido en los vinos. Estos resultados resultaron ser similares a lo detectado por otros autores (Bautista-Ortín et al., 2016); siendo además coherentes con lo encontrado por otros autores en vinos de Monastrell (Moreno-Olivares et al., 2023; Paladines-Quezada et al., 2019a).

		Control	Urea	Nano-urea	p-value
2019	PAs Total	428,01 ± 54,04	390,53 ± 9,63	427,79 ± 29,37	ns
	gMP	3,66 ± 0,13 a	3,47 ± 0,08 ab	3,32 ± 0,14 b	*
	%Gal	6,89 ± 2,43	7,06 ± 0,55	6,5 ± 0,66	ns
2020	PAs Total	498,92 ± 20,71 a	438,18 ± 17,31 b	375,55 ± 16,71 c	***
	gMP	4,73 ± 0,37 a	4,07 ± 0,16 b	4,02 ± 0,28 b	*
	%Gal	3,47 ± 0,23 a	2,96 ± 0,16 b	3,08 ± 0,14 b	*
2021	PAs Total	513,55 ± 82,12	530,18 ± 47,20	448,05 ± 52,21	ns
	gMP	5,52 ± 0,05 a	5,43 ± 0,11 a	5,21 ± 0,06b	**
	%Gal	3,34 ± 0,23	3,22 ± 0,08	3,39 ± 0,07	ns

Tabla 4.11. Concentración de proantocianidinas (PAs) totales (mg/L), grado medio de polimerización (gMP) y % de galoilación (%Gal), en vinos procedentes de las uvas control, tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$); ns, no significativo.

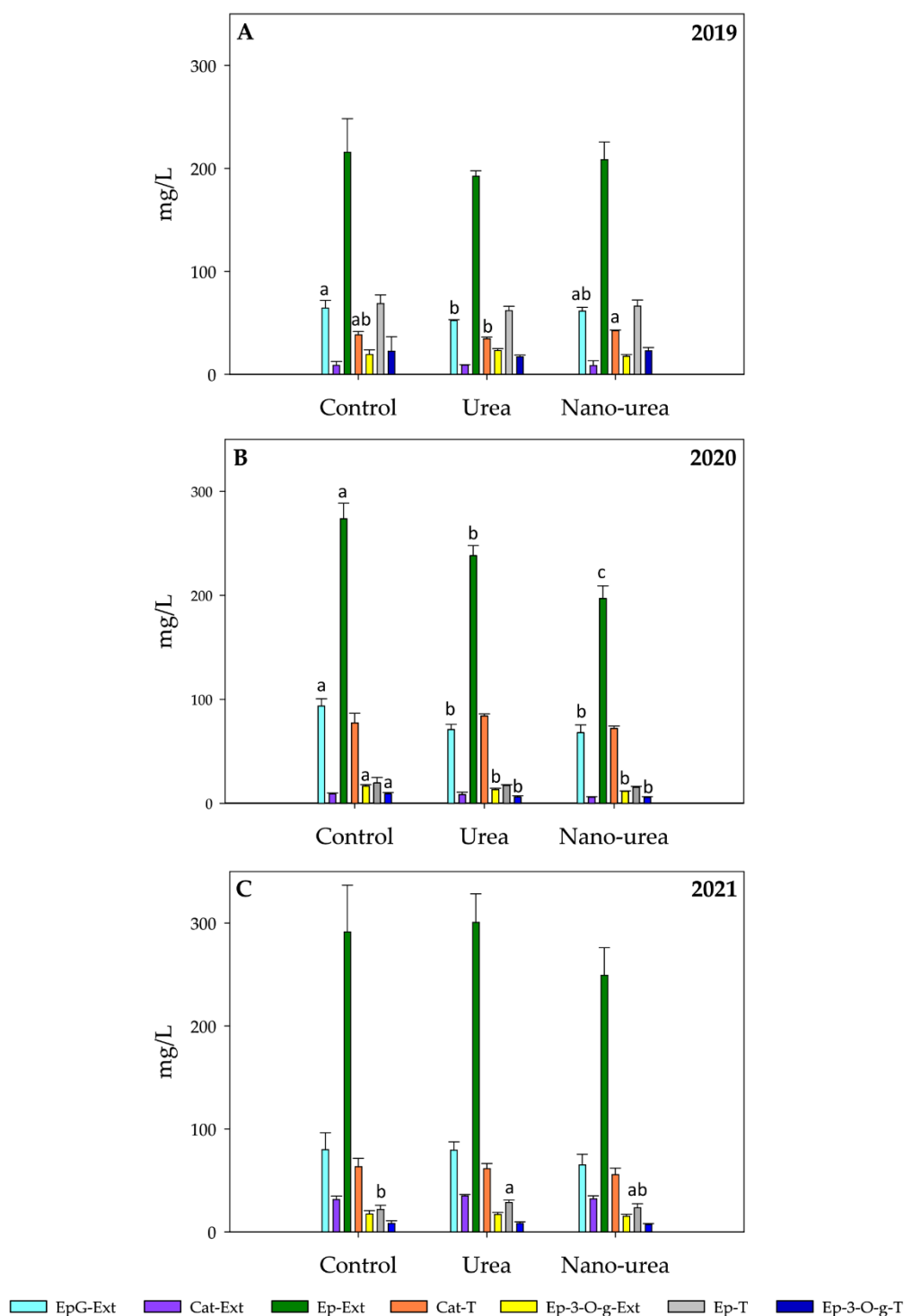


Figura 4.3. Concentración de las diferentes fracciones de proantocianidinas en vinos (mg/L) procedentes de uvas Monastrell control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas (A) 2019, (B) 2020 y (C) 2021. EpG-Ext,(-) epigalocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-) epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)epicatequina-3-orto-galato terminal. Las barras representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD, 95%* ($p < 0,05$).

Por otro lado la mayor cantidad de PAs fue detectada en el año 2021, además este año el gMP fue también mayor, lo que podría indicar una mayor proporción de PAs procedentes de los hollejos. Por otro lado, el %Gal del año 2019 fue prácticamente el doble que el obtenido en los dos años posteriores, siendo este hecho indicativo de la menor madurez de las uvas de este año, además también podría estar influenciado por la gran cantidad de PAs procedente de las semillas. Estas dos premisas podrían afectar a la percepción sensorial de estos vinos puesto que un mayor valor del %Gal da lugar a una mayor astringencia a los vinos (Chira et al., 2012; de Freitas y Mateus, 2001).

En cuanto al efecto de los tratamientos, las PAs totales solo se vieron afectadas en 2020, mostrando el vino control el mayor valor. Por otro lado, el gMP correspondiente al vino procedente del tratamiento con urea solo se vio afectado en 2020 presentando un valor inferior al control, sin embargo en el tratamiento con nano-urea este comportamiento se observó los tres años de estudio. Finalmente el %Gal solo se vio modificado en el año 2020, con valores inferiores para los vinos procedentes de los tratamientos con urea y nano-urea. En relación a las diferentes subunidades de las PAs (**Figura 4.3**), la EpG-Ext obtuvo las menores concentraciones en los tratamientos con urea y nano-urea durante los años 2019 y 2020 y en en el año 2021 solo en el caso del tratamiento con nano-urea, aunque sin llegar a ser significativas estas diferencias. Esta subunidad proviene de los hollejos y aporta suavidad a los vinos (Vidal et al., 2003). Otra fracción como la Cat-Ext no se vió afectada por los tratamientos en ninguna de las añadas estudiadas. El resto de subunidades mostraron diferente comportamiento frente a los tratamientos dependiendo del año, así Cat-T obtuvo los valores más bajos en el tratamiento con urea en el año 2019, la EpG-3-O-g-Ext también lo hizo para urea y nano-urea en el 2020, y lo contrario ocurrió con la Ep-T que incrementó para los dos tratamientos en 2021. Finalmente la EpG-3-O-g-T mostró las concentraciones más bajas para los dos tratamientos en 2020.

Otros autores encontraron resultados dispares en los vinos procedentes de uvas tratadas con urea, por un lado Portu et al. (2015a) no detectaron ninguna influencia sobre las PAs en vinos de Tempranillo. Gutiérrez-Gamboa et al. (2017b) en vinos de Cabernet Sauvignon observaron que la EpG-Ext no se veía afectada, pero que el resto de

subunidades fueron inferiores en los tratamientos con urea. Finalmente Cheng et al. (2020) constataron diferente comportamiento dependiendo de la dosis aplicada de urea en vinos de Cabernet Sauvignon.

El análisis multifactorial (**Tabla 4.12**) nos mostró que el factor tratamiento aunque no fue el determinante en los resultados obtenidos en los diferentes parámetros analizados fue significativo sobre dos de las fracciones estudiadas, la EpG-Ext (22%) y la Ep-Ext (16%). Por otro lado, la añada fue el factor que explicó mayoritariamente el porcentaje de variabilidad de las distintas fracciones, yendo su rango desde 35% sobre la EpG-Ext hasta 96% en la fracción de Cat; en el caso del gMP y el %Gal también fue la añada el factor determinante con un 90% y 84% respectivamente. Finalmente, la interacción tratamiento-año solo resultó ser significativa en el caso de la Cat-T pero con un escaso 4%.

	T(%)	A(%)	TxA(%)
Total	17*	20***	22
EpG-Ext	22**	35***	16
Cat-Ext	0	96***	1
Ep-Ext	16**	50***	12
Cat-T	1	89***	4*
Ep-3-O-g-Ext	15*	48***	12
Ep-T	0	91***	1
Ep-3-O-g-T	2	67***	3
gMP	5***	90***	2
%Gal	0	84***	1

Tabla 4.12. Análisis multifactorial de las distintas fracciones de proantocianidinas (EpG-Ext, (-)-epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-) epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)epicatequina-3-orto-galato terminal), grado medio de polimerización (gMP) y % de galoilación (%Gal) en vinos elaborados a partir de uvas control y las tratadas con urea y con nano-urea, con los factores tratamiento (T), añada(A) y interacción tratamiento-añada (TxA). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$)

4.3.7. PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE LOS VINOS

En la **Tabla 4.13** se recogen los principales parámetros espectrofotométricos de los vinos al final de la fermentación alcohólica obtenidos a partir de las uvas control y los procedentes de los tratamientos.

Respecto al IPT, el año 2019 mostró valores inferiores a los años 2020 y 2021. En el año 2021 se alcanzó una mayor IC, aunque durante el año 2019 se obtuvieron los mayores valores de antocianos, esto pudo ser debido a la mayor cantidad de taninos en el vino durante este año, que posiblemente ayudaron a una mayor estabilización del color mediante fenómenos de copigmentación y formación de otros compuestos entre los antocianos y los taninos (He et al., 2012; Lambert et al., 2011). El tono apenas se modificó de un año para otro aunque en el 2019 fue algo inferior, lo que indicaría una mayor proporción de tonalidades rojas frente a las amarillas.

	Añada	Control	Urea	Nano-urea	p-value
IPT	2019	39,11 ± 1,05	38,35 ± 1,52	40,74 ± 2,57	ns
	2020	47,88 ± 1,76 a	40,32 ± 2,88 b	40,93 ± 0,36 b	**
	2021	47,24 ± 2,45	47,19 ± 2,93	44,01 ± 1,77	ns
IC	2019	14,01 ± 1,03	14,05 ± 1,13	13,6 ± 0,82	ns
	2020	14,14 ± 0,85 a	12,25 ± 0,94 b	11,65 ± 0,68 b	*
	2021	16,36 ± 1,47	14,91 ± 0,83	15,13 ± 0,84	ns
Tono	2019	0,42 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,42 ± 0,02	ns
	2020	0,47 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,48 ± 0,02	ns
	2021	0,46 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,01	ns
ΔE*	2019		2,66 ± 2,86	3,08 ± 1,89	ns
	2020		5,57 ± 2,64	7,74 ± 1,04	ns
	2021		3,24 ± 1,40	4,3 ± 1,78	ns

Tabla 4.13 Parámetros espectrofotométricos de los vinos procedentes de las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante las campañas 2019,2020 y 2021. Abreviaturas: IPT, índice de polifenoles totales; IC, intensidad de color; ΔE*, medida de la diferencia de color calculada a partir de parámetros CIELab. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05); ns, no significativo.

Con respecto a los tratamientos, el IPT solo se vio afectado durante la añada de 2020, con un valor inferior al obtenido en los vinos control y similares entre sí en los tratamientos con urea y nano-urea. Otros autores en vinos procedentes de uvas tratadas con urea encontraron diferentes efectos sobre el valor de IPT, así Portu et al. (2015a) en

vinos de Tempranillo procedentes de uvas tratadas con dosis diferentes de urea observaron un incremento para este parámetro, aunque dependió de la concentración de urea aplicada. En contraste, Gutiérrez-Gamboa et al. (2017b) en vinos de Cabernet Sauvignon también procedente de uvas tratadas con urea detectaron un valor inferior en este parámetro aunque no significativo cuando lo compararon con los vinos control.

La IC no se vio afectada en 2019, pero ambos tratamientos dieron lugar a vinos con IC inferiores a la obtenida por los vinos control en 2020. Lo mismo pudimos observar en el año 2021 aunque en este caso sin obtener diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados corresponden a lo mostrado por Gutiérrez-Gamboa et al. (2017b) en vinos de Cabernet Sauvignon, aunque son contrarios al incremento encontrado para este parámetro en vinos de Tempranillo (Portu et al., 2015a).

El tono no se vio afectado por ninguno de los tratamientos en los tres años de estudio, al igual que detectaron Portu et al. (2015a) en sus estudios llevados a cabo con Tempranillo.

El parámetro ΔE^* nos indica si la diferencia entre el color de los vinos control y los procedentes de los tratamientos es detectable por el ojo humano, para ello debe de presentar un valor superior a 3 (Martínez et al., 2001). Tal como podemos observar en la **Tabla 4.13**, en todos los años y para todos los tratamientos excepto para la urea en el año 2019, este valor fue superior a 3. Por lo tanto y según el valor de ΔE^* , en el año 2019 el color del vino procedente del tratamiento con urea no mostraría diferencias perceptibles, en cambio el procedente del tratamiento con nano-urea si sería posible diferenciarlo del vino control aunque el descenso de color fue pequeño. En los años 2020 y 2021 las pérdidas de color detectadas en los vinos resultantes de los tratamientos serían perfectamente diferenciables por el ojo humano.

4.4. COMPOSICIÓN NITROGENADA DE LAS UVAS Y DE LOS VINOS

4.4.1. COMPOSICIÓN NITROGENADA EN UVAS

En la **Tabla 4.14** se muestran los valores obtenidos en el mosto de las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea durante los tres años estudiados. Como se puede observar, las concentraciones de cada uno de los aminoácidos y del ión NH_4^+ varían

según el año de estudio. El año en el que hubo una mayor síntesis de compuestos nitrogenados fue en el año 2020, seguido del año 2021 y del año 2019. La menor concentración obtenida en el 2019 pudo ser debido en parte a la falta de madurez de las uvas, ya que se vendimiaron prematuramente como ya se ha mencionado anteriormente. Autores como Garde-Cerdán et al. (2009) señalan que en la variedad Monastrell el máximo en la composición nitrogenada coincide con el máximo de madurez fenológica y tecnológica.

En las tres añadas estudiadas, los aminoácidos mayoritarios fueron Pro, seguido de Arg+GABA que coeluyeron y Glu. Por otro lado, los menos abundantes fueron Orn y Lys. En cuanto a la cantidad de N de los mostos procedente de los aminoácidos, como se puede observar, en el año 2019 el mosto control mostró la concentración más baja alcanzando tan solo 88,4 mg/L, además si descontamos lo aportado por la Pro, aminoácido que presenta mayor dificultad para ser asimilado por las levaduras, la concentración desciende a 64,2 mg/L, muy inferior al mínimo establecido de YAN de 140 mg/L de N para garantizar un desarrollo adecuado de la fermentación alcohólica (Bell y Henschke, 2005). Estos valores tan bajos podrían estar relacionados con el hecho de que este año encontramos algunos problemas en estos mostos para terminar de agotar los azúcares al final de la fermentación alcohólica. La concentración de N procedente de los aminoácidos obtenida en el año 2020 fue muy superior a la obtenida en el año 2019 situándose por encima de ese valor mínimo (140 mg/L). En el año 2021 de nuevo volvió a ser más ajustada aunque considerablemente mayor que en el 2019, aun así durante estos dos años el desarrollo de la fermentación alcohólica fue óptima.

El efecto de los tratamientos fue distinto según el año de estudio, así en el año 2019 el tratamiento con urea provocó un aumento del 47% en el total de compuestos nitrogenados y el tratamiento con nano-urea del 121%. En cambio en el año 2020, solo el tratamiento con nano-urea fue capaz de incrementarlos en un 18%. Finalmente, en el año 2021 el tratamiento con urea fue el más efectivo, de este modo el aumento de los compuestos nitrogenados fue del 85% con la urea y del 27% con la nano-urea. Esta diferencia de comportamiento en el año 2020 pudo ser debido al hecho de que este año los requerimientos de N del viñedo fueran menores, lo que se puede observar en el

contenido óptimo de N en el mosto control. Este mismo hecho fue reportado por Garde-Cerdán et al. (2017), mostrando que cuando el viñedo presentaba bajas necesidades de N, la aplicación de urea apenas afectaba al contenido de aminoácidos en el mosto.

Respecto a los aminoácidos individuales, en el año 2019 el tratamiento con urea provocó un aumento general de todos ellos salvo de Asp, Glu y Cys que obtuvieron concentraciones inferiores que en el mosto control y de α -Ala y Met que no se vieron afectados por este tratamiento. El tratamiento con nano-urea, de nuevo incrementó de manera general todos los aminoácidos a excepción de Cys que obtuvo concentraciones inferiores al control y de α -Ala que no se vio afectada por el tratamiento. En el año 2020, en el que en el tratamiento con urea mostró concentraciones inferiores al mosto control en los compuestos nitrogenados totales, fue debido a los bajos contenidos en Gln, Gly, Val, Cys, Iso y Trp. Por otro lado se produjo un aumento general en el tratamiento con nano-urea salvo en Cys e Iso donde se obtuvieron valores inferiores al mosto control y además Phe, Orn y Lys que no se vieron afectados por el tratamiento. En el año 2021 en el tratamiento con urea se produjo un incremento generalizado de los aminoácidos y en el ión NH_4^+ , salvo Cys que reportó un valor inferior al control, además Met y Orn no se vieron afectadas. Por otro lado, en el tratamiento con nano-urea se encontraron valores inferiores al mosto control en Thr, β -Ala, Val, Cys, Trp, Iso, Leu y Phe. En contraposición a Met y Orn que no se vieron afectadas y a los incrementos en Glu, ARg+GABA, α -Ala, NH_4^+ , Tyr y Lys.

Los valores que se obtuvieron tanto para N como para N-Pro (calculados según el contenido en N de cada compuesto) nos dan una idea del contenido de N en los mostos, de nuevo se puede apreciar el efecto de los tratamientos, con incrementos importantes en los años 2019 y 2021 en ambos tratamientos. En 2020, al igual que ocurría con el total de compuestos nitrogenados, solo se produjo un incremento en los mostos procedentes del tratamiento con nano-urea.

Los resultados encontrados por otros autores son dispares en función de la añada y de la variedad en estudio. Así Garde-Cerdán et al. (2014a) mostraron un incremento en la síntesis de la mayoría de aminoácidos en uvas de Tempranillo tratadas con urea. Por el contrario, en otro estudio llevado a cabo por el mismo autor en Tempranillo y

Monastrell durante dos añadas, se registró en uno de los años concentraciones inferiores a los controles para ambas variedades y sin embargo en la siguiente añada no se encontraron cambios ni en Tempranillo ni en Monastrell (Garde-Cerdán et al., 2017). Finalmente, en otro estudio llevado a cabo por Pérez-Álvarez et al. (2021) en el que se evaluaba la acción de urea a dos dosis diferentes y de nano-urea sobre Tempranillo se observó que el YAN se incrementó con todos los tratamientos, y también lo hicieron los diferentes aminoácidos estudiados con la concentración más alta de urea y con el nano-tratamiento.

	2019				2020				2021			
	Control	Urea	Nano-Urea	p	Control	Urea	Nano-Urea	p	Control	Urea	Nano-Urea	p
Asp	27,6 ± 0,3 b	19,4 ± 0,5 c	34,6 ± 1,1 a	***	10,2 ± 0,5 b	9,9 ± 0,2 b	11,6 ± 0,7 a	*	7,7 ± 0,1 b	11,0 ± 0,6 a	7,9 ± 1,0 b	**
Glu	33,3 ± 0,7 b	27,6 ± 0,7 c	44,2 ± 1,1 a	***	13,1 ± 0,6 b	14,4 ± 0,2 b	17,2 ± 1,0 a	***	10,7 ± 0,3 c	20,5 ± 0,9 a	12,5 ± 1,1 b	***
Asn+Ser	42,3 ± 3,5 c	63,8 ± 2,8 b	93,7 ± 3,8 a	***	91,0 ± 6,0	92,5 ± 2,4	104,4 ± 7,8	ns	55,1 ± 2,2 b	94,0 ± 1,9 a	56,8 ± 9,0 b	***
Gln	53,6 ± 4,9 c	88,3 ± 4,3 b	176,7 ± 7,3 a	***	198,5 ± 112,9 b	168,3 ± 6,8 c	239,2 ± 20,0 a	**	68,8 ± 3,2 b	160,2 ± 2,8 a	81,3 ± 112,2 b	
His	13,1 ± 0,6 c	19,8 ± 0,5 b	43,4 ± 1,5 a	***	69,7 ± 6,2 b	57,6 ± 3,2 b	81,4 ± 8,7 a	*	17,4 ± 1,0 b	38,1 ± 0,9 a	20,3 ± 3,6 b	***
Gly	6,0 ± 0,3 c	6,9 ± 0,1 b	9,5 ± 0,3 a	***	12,3 ± 0,6 a	10,9 ± 0,6 b	13,0 ± 0,8 a	*	6,9 ± 0,1 b	11,0 ± 0,2 a	7,1 ± 0,6 b	***
Thr	14,9 ± 1,2 c	21,7 ± 0,9 b	34,1 ± 1,1 a	***	43,1 ± 3,3	43,0 ± 3,6	49,7 ± 3,7	ns	19,6 ± 1,2 b	33,2 ± 0,5 a	16,1 ± 1,7 c	***
β-Ala	10,5 ± 0,8 c	15,4 ± 0,6 b	24,3 ± 0,8 a	***	28,9 ± 4,3	26,5 ± 0,8	34,5 ± 4,5	ns	13,9 ± 0,8 b	23,6 ± 0,3 a	11,4 ± 1,2 c	***
Arg+GABA	42,5 ± 3,9 c	93,8 ± 4,9 b	202,6 ± 10,7 a	***	213,8 ± 20,2 b	238,9 ± 11,2 b	280,4 ± 25,2 a	*	95,6 ± 4,5 c	268,0 ± 4,9 a	181,1 ± 34,7 b	***
α-Ala	21,5 ± 1,1	22,1 ± 1,8	22,2 ± 0,3	ns	23,8 ± 1,0 b	24,6 ± 1,1 b	27,0 ± 0,8 a	*	31,2 ± 0,8 c	47,9 ± 0,6 b	53,8 ± 1,6 a	***
Pro	199,3 ± 8,4 c	322,8 ± 9,6 b	386,4 ± 6,0 a	***	345,9 ± 14,5 b	357,2 ± 17,3 b	393,6 ± 11,4 a	*	216,2 ± 7,2 b	360,8 ± 7,8 a	291,3 ± 62,4 a	**
NH₄⁺	14,9 ± 0,8 c	25,3 ± 0,8 b	33,0 ± 0,4 a	***	21,6 ± 1,1 b	24,2 ± 1,5 b	33,2 ± 1,8 a	***	9,6 ± 0,3 b	14,1 ± 0,4 a	16,8 ± 3,2 a	**
Tyr	7,0 ± 0,5 c	8,6 ± 0,2 b	10,5 ± 0,3 a	***	26,1 ± 0,8 b	25,4 ± 1,0 b	37,3 ± 1,9 a	***	7,23 ± 0,4 c	16,2 ± 0,6 a	10,8 ± 0,8 b	***
Val	8,9 ± 0,4 c	12,5 ± 0,2 b	20,7 ± 1,3 a	***	33,6 ± 2,1 b	28,4 ± 0,7 c	39,4 ± 2,6 a	**	15,0 ± 0,3 b	26,5 ± 0,7 a	12,7 ± 0,6 c	***
Met	2,8 ± 0,3 b	2,9 ± 0,2 b	4,0 ± 0,6 a	*	4,8 ± 0,7 b	4,8 ± 0,4 b	6,1 ± 0,4 a	*	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,1	1,9 ± 0,12	ns
Cys	10,4 ± 1,8 a	6,5 ± 0,5 b	7,1 ± 0,9 b	*	13,2 ± 2,1 a	8,9 ± 0,9 b	9,2 ± 1,5 b	*	12,3 ± 1,0 a	7,4 ± 0,4 b	5,8 ± 0,7 c	***
Iso	6,5 ± 0,1 c	8,0 ± 0,0 b	10,8 ± 0,8 a	***	15,1 ± 1,1 ab	13,2 ± 0,6 b	17,0 ± 1,1 a	**	12,3 ± 0,7 b	14,0 ± 0,5 a	8,5 ± 0,7 c	***
Leu	8,1 ± 0,4 c	10,9 ± 0,2 b	16,1 ± 0,7 a	***	24,8 ± 1,7 a	20,6 ± 0,6 b	27,8 ± 2,3 a	**	14,3 ± 0,9 b	20,6 ± 0,6 a	11,3 ± 0,8 c	***
Trp	20,3 ± 1,4 c	23,6 ± 1,2 b	32,2 ± 1,8 a	***	59,3 ± 5,8 a	45,3 ± 2,5 b	52,8 ± 4,3 ab	*	29,7 ± 1,0 b	32,6 ± 0,9 a	18,5 ± 1,9 c	***
Phe	5,3 ± 0,2 c	9,1 ± 0,3 b	13,4 ± 1,0 a	***	17,3 ± 2,7	14,7 ± 0,6	17,7 ± 1,8	ns	9,2 ± 0,6 b	13,8 ± 0,6 a	6,4 ± 0,2 c	***
Orn	2,1 ± 0,1 c	2,3 ± 0,1 b	2,8 ± 0,1 a	***	2,6 ± 0,1	2,7 ± 0,1	2,6 ± 0,3	ns	2,2 ± 0,6	2,1 ± 0,1	1,8 ± 0,0	ns
Lys	2,66 ± 0,1 c	3,2 ± 0,3 b	3,8 ± 0,2 a	***	3,4 ± 0,1	3,9 ± 0,1	4,1 ± 0,8	ns	2,6 ± 0,2 b	3,0 ± 0,2 ab	3,5 ± 0,3 a	*
Total	553,6 ± 19,7 c	814,6 ± 23,9 b	1226,0 ± 38,8 a	***	1271,9 ± 64,1 b	1235,7 ± 28,8b	1499,1 ± 91,6 a	**	659,3 ± 23,1 c	1220,3 ± 23,7 a	837,7 ± 126,2 b	***
Total-Pro	354,3 ± 16,6 c	491,8 ± 14,3 b	839,6 ± 32,8 a	***	926,0 ± 60,0 b	878,4 ± 32,3 b	1105,6 ± 82,6 a	**	443,1 ± 16,1 c	859,6 ± 15,9 a	546,4 ± 66,5 b	***
N¹	88,5 ± 3,3 c	136,2 ± 3,4 b	210,9 ± 6,2 a	***	216,0 ± 11,1 b	211,4 ± 5,0 b	261,6 ± 16,2 a	**	105,8 ± 3,7 c	202,7 ± 3,9 a	141,1 ± 18,4 b	***
N-Pro	64,2 ± 2,8 c	96,9 ± 2,3 b	163,9 ± 5,5 a	***	174,0 ± 10,6 b	168,0 ± 5,3 b	213,7 ± 15,1 a	**	79,5 ± 2,9 c	158,8 ± 2,9 a	105,7 ± 11,0 b	***

Tabla 4.14. Contenido individual de aminoácidos y de NH₄⁺ (mg/L) en mostos de Monastrell procedentes de las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea, durante las campañas 2019, 2020 y 2021. ¹ Contenido en N calculado a partir de la concentración de cada compuesto nitrogenado. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05), ns: no significativo.

El análisis multifactorial (**Tabla 4.15**) nos mostró que de nuevo la añada fue en general el factor determinante en los resultados obtenidos, destacando su efecto sobre Asp, Glu, Tyr, Met y Trp que alcanzaron o superaron el 80% de la variabilidad explicada. En el lado opuesto encontramos aminoácidos como Pro (23%) y Cys (16%). El tratamiento tuvo relevancia en compuestos como Arg+GABA, Pro, NH₄⁺, Cys y Lys. Además, la interacción tratamiento-añada también fue importante, sobre todo en el caso de los aminoácidos Asn+Ser, Iso y Phe.

Análisis multifactorial			
	T (%)	A(%)	TxA(%)
Asp	4***	83***	12***
Glu	5***	80***	15***
Asn+Ser	22***	39***	36***
Gln	15***	54***	29***
His	7***	77***	14***
Gly	7***	63***	28***
Thr	7***	70***	20***
β-Ala	8***	60***	27***
Arg+GABA	31***	45***	21***
α-Ala	10***	75***	14***
Pro	45***	23***	24***
NH₄⁺	40***	51***	7***
Tyr	6***	85***	9***
Val	4***	72***	22***
Met	7***	85***	3*
Cys	65***	16**	5
Iso	1	65***	31***
Leu	3***	70***	25***
Trp	1	81***	16***
Phe	4**	57***	34***
Orn	1	42***	29**
Lys	45***	32***	3
Total	24***	47***	26***
Total-Pro	18***	53***	26***

Tabla 4.15. Análisis multifactorial de los compuestos nitrogenados en uvas con los factores tratamiento (T), añada (A) y la interacción tratamiento y añada (TxA), Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05).

4.4.2. COMPOSICIÓN NITROGENADA EN VINOS

En la **Tabla 4.16** se muestran los valores obtenidos en los vinos elaborados a partir de las uvas control y las tratadas con urea y nano-urea, durante los tres años estudiados al final de fermentación alcohólica.

El aminoácido mayoritario fue la Pro al igual que ocurría en las uvas, representando entre el 57 y 82% de los aminoácidos totales. El efecto de los tratamientos dependió de la añada estudiada, así en el año 2019 los vinos control y el procedente de las uvas tratadas con urea mostraron prácticamente el mismo contenido total de compuestos nitrogenados, sin embargo el vino procedente del tratamiento con nano-urea duplicaba esa cantidad. En el año 2020, el vino procedente del tratamiento con urea obtuvo concentraciones inferiores al vino control, sin embargo el vino procedente del tratamiento con de nano-urea las incrementó, aunque no llegaron a ser significativos estos cambios. Finalmente, en el año 2021 se obtuvo únicamente un incremento en el total de compuestos nitrogenados en el vino procedente del tratamiento con urea.

En relación a los distintos compuestos analizados individualmente, en el año 2019 en los vinos procedentes del tratamiento con nano-urea, pudimos observar como la mitad de los compuestos presentaron valores superiores a los obtenidos en el vino control, sin embargo la otra mitad no sufrió cambios. Solamente la Asp se vio aumentada con el tratamiento con urea. En el año 2020 solo se produjeron aumentos en algunos aminoácidos con el tratamiento con nano-urea, así se incrementaron Asn+Ser, Gln, Gly, Arg, GABA, α -Ala, Pro, Tyr y Val, pero el resto de aminoácidos no se vieron alterados. Finalmente, en el año 2021 los incrementos se observaron mayoritariamente en el tratamiento con urea, salvo en Asp que mostró contenidos inferiores a los vinos control y en Glu, Thr, β -Ala, NH_4^+ , Tyr, Val y Cys cuyos contenidos no se vieron afectados. Sin embargo en el tratamiento con nano-urea, la mayoría de los aminoácidos analizados no se vieron afectados, salvo Asp, Glu, His, NH_4^+ , Val, Met, Cys, Iso que mostraron concentraciones inferiores a los vinos control y GABA y Lys que incrementaron sus valores.

Tal como podemos observar, la concentración de la gran mayoría de compuestos nitrogenados analizados disminuyeron notablemente en todas las añadas en

comparación a lo mostrado en los mostos, debido al consumo de los aminoácidos por parte de las levaduras durante el proceso de fermentación alcohólica. Por otro lado, el comportamiento respecto a la Pro dependió de la cantidad de N fácilmente disponible que contenían los mostos. Así en los años 2019 y 2021 en los que el valor calculado para el parámetro N-Pro presentaba valores inferiores a 164 mg/L, se produjeron descensos en el contenido de Pro en el vino (respecto al que presentaban los mostos). Por otro lado en el año 2020, en el que el parámetro N-Pro era superior, el contenido en Pro de los vinos aumentó. Este comportamiento podría indicar que en los casos en los que hay menor disponibilidad de N en los mostos, las levaduras también son capaces de consumir Pro durante el proceso de fermentación. Este hecho ya fue reportado por Arias-Gil et al. (2007) al detectar un mayor consumo de Pro por parte de las levaduras cuando el mosto tenía una composición escasa en el resto de aminoácidos.

	2019				2020				2021			
	Control	Urea	Nano-Urea	p	Control	Urea	Nano-Urea	p	Control	Urea	Nano-Urea	p
Asp	2,06 ± 0,15 c	2,43 ± 0,11 b	3,06 ± 0,11 a	**	3,26 ± 0,13	3,23 ± 0,51	3,99 ± 0,26	ns	4,89 ± 0,27 a	3,78 ± 0,15 b	2,48 ± 0,08 c	***
Glu	4,12 ± 0,64 b	4,34 ± 0,29 b	7,68 ± 1,56 a	**	9,41 ± 2,83	8,48 ± 1,23	12,74 ± 1,56	ns	2,94 ± 0,21 a	3,07 ± 0,33 a	1,91 ± 0,18 b	**
Asn+Ser	1,26 ± 0,19 b	1,32 ± 0,18 b	2,80 ± 0,47 a	**	6,44 ± 1,43 b	6,66 ± 0,64 b	9,23 ± 1,23 a	*	7,28 ± 0,45 b	10,74 ± 0,60 a	6,91 ± 0,33 b	***
Gln	2,23 ± 0,17 b	2,53 ± 0,39 b	5,57 ± 2,14 a	*	5,68 ± 0,74 b	5,74 ± 0,28 b	7,69 ± 0,59 a	**	2,58 ± 0,50 b	5,98 ± 0,70 a	2,56 ± 0,17 b	***
His	3,37 ± 0,11	3,52 ± 0,21	4,02 ± 0,50	ns	5,64 ± 0,82	5,19 ± 0,38	6,51 ± 0,80	ns	4,25 ± 0,19 b	7,17 ± 0,42 a	3,41 ± 0,35 c	***
Gly	4,55 ± 0,08 b	4,69 ± 0,06 b	5,52 ± 0,22 a	**	7,66 ± 1,03 b	7,61 ± 0,51 b	9,68 ± 0,85 a	*	4,58 ± 0,16 b	6,08 ± 0,33 a	4,74 ± 0,18 b	***
Thr	3,40 ± 0,14	3,48 ± 0,03	3,66 ± 0,13	ns	4,19 ± 0,22	4,00 ± 0,15	4,57 ± 0,31	ns	2,91 ± 0,13 b	3,54 ± 0,12 a	2,95 ± 0,09 b	***
β-Ala	2,37 ± 0,03 b	2,42 ± 0,12 b	2,61 ± 0,08 a	*	3,64 ± 0,78	3,29 ± 0,21	3,73 ± 0,02	ns	2,04 ± 0,11 b	2,22 ± 0,08 a	1,89 ± 0,03 b	**
Arg	4,29 ± 0,29	4,67 ± 0,14	5,28 ± 0,64	ns	10,82 ± 2,68 b	10,87 ± 0,98 b	15,65 ± 1,73 a	*	2,90 ± 0,12 b	6,44 ± 0,85 a	3,43 ± 0,61 b	***
GABA	4,75 ± 0,21 b	4,75 ± 0,12 b	7,12 ± 1,45 a	*	15,42 ± 3,95 b	14,20 ± 1,31 b	20,86 ± 2,02 a	*	3,33 ± 0,43 c	9,54 ± 1,39 a	5,65 ± 0,66 b	***
α-Ala	2,18 ± 0,04 b	2,30 ± 0,07 b	3,03 ± 0,53 a	*	5,49 ± 0,93 b	5,33 ± 0,57 b	8,18 ± 1,70 a	*	1,30 ± 0,17 c	3,71 ± 0,54 a	2,20 ± 0,26 b	***
Pro	102,73±35,67 b	109,34±22,22 b	263,41±57,22 a	**	564,93±88,04 ab	449,66±59,60 b	679,66±48,61 a	*	94,82 ± 26,79 b	272,28±19,55 a	75,11 ± 23,36 b	***
NH₄⁺	2,52 ± 0,13	2,45 ± 0,07	5,73 ± 2,77	ns	4,08 ± 1,15	4,13 ± 0,65	6,33 ± 1,11	ns	3,17 ± 0,28 a	3,34 ± 0,61 a	2,31 ± 0,26 b	*
Tyr	3,18 ± 0,35 b	3,76 ± 0,08 b	4,57 ± 0,54 a	*	5,36 ± 0,30 b	4,46 ± 0,06 c	6,44 ± 0,68 a	**	2,64 ± 0,14	3,08 ± 0,43	2,82 ± 0,43	ns
Val	2,56 ± 0,07	2,46 ± 0,05	2,58 ± 0,09	ns	2,86 ± 0,13 b	2,92 ± 0,02 b	3,32 ± 0,19 a	*	2,40 ± 0,21 a	2,68 ± 0,14 a	2,08 ± 0,04 b	**
Met	2,67 ± 0,37	2,84 ± 0,14	2,84 ± 0,13	ns	3,12 ± 0,25	3,18 ± 0,09	3,47 ± 0,27	ns	2,19 ± 0,13 a	2,11 ± 0,10 a	1,56 ± 0,04 b	***
Cys	3,18 ± 0,06	3,05 ± 0,11	3,15 ± 0,34	ns	4,61 ± 0,62	4,14 ± 0,27	3,51 ± 0,42	ns	5,58 ± 0,20 a	5,14 ± 0,61 a	3,88 ± 0,16 b	**
Iso	3,62 ± 0,17	3,44 ± 0,34	3,96 ± 0,26	ns	4,72 ± 0,37	3,98 ± 0,37	4,47 ± 0,25	ns	2,61 ± 0,09 b	2,89 ± 0,12 a	2,40 ± 0,03 c	**
Leu	3,90 ± 0,10 b	4,06 ± 0,02 b	4,32 ± 0,17 a	*	5,25 ± 0,56	4,97 ± 0,26	5,80 ± 0,31	ns	3,73 ± 0,12 b	4,92 ± 0,25 a	4,03 ± 0,17 b	***
Trp	4,03 ± 0,09 b	4,13 ± 0,16 b	4,59 ± 0,17 a	**	4,97 ± 0,21	4,81 ± 0,32	5,40 ± 0,28	ns	3,54 ± 0,28 b	4,17 ± 0,16 a	3,36 ± 0,08 b	**
Phe	2,7 ± 0,28	3,10 ± 0,23	3,19 ± 0,17	ns	3,74 ± 0,24	3,80 ± 0,27	4,49 ± 0,57	ns	2,18 ± 0,22 b	3,24 ± 0,36 a	2,15 ± 0,10 b	**
Orn	1,97 ± 0,05	2,21 ± 0,10	2,34 ± 0,28	ns	3,11 ± 0,32	3,05 ± 0,15	3,62 ± 0,50	ns	1,48 ± 0,02 b	1,64 ± 0,04 a	1,52 ± 0,04 b	**
Lys	4,25 ± 1,29	3,77 ± 0,04	4,99 ± 0,55	ns	8,64 ± 2,71	8,13 ± 1,27	10,24 ± 0,90	ns	2,68 ± 0,35 c	6,77 ± 0,61 a	4,69 ± 0,66 b	***
Total	171,90±38,69 b	181,07±22,75 b	356,03 ± 57,68a	**	693,04 ± 108,50 ab	571,83±67,16b	839,58±58,68 a	*	166,03±27,28 b	374,54±26,75 a	144,00±27,34 b	**

Tabla 4.16. Contenido individual de aminoácidos y de NH₄⁺ (mg/L) en vinos de Monastrell procedentes de las uvas control y tratadas con urea y nano-urea, durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05), ns: no significativo.

Por otro lado, en los estudios realizados por Gutiérrez-Gamboa et al. (2017a) en vinos de Tempranillo procedentes de uvas tratadas con urea, se encontraron valores inferiores a los obtenidos en los vinos control en 10 de los aminoácidos estudiados, y un incremento solo en Met, el resto de aminoácidos analizados entre los que se encontraba la Pro no se vieron afectados.

El análisis multifactorial (**Tabla 4.17**) nos indicó que en líneas generales el factor fundamental que afectó a los resultados obtenidos fue la añada, seguido de la interacción tratamiento-año y finalmente del tratamiento. Aun así en el caso de Asp, His y NH_4^+ el factor más importante fue la interacción tratamiento-año con un 56%, 44% y 27% respectivamente. Además el factor tratamiento tuvo una influencia limitada, destacando su efecto solo en los aminoácidos Cys, Gln y Tyr.

	Análisis multifactorial		
	T (%)	A(%)	TxA(%)
Asp	2	37***	56***
Glu	7**	75***	9***
Asn+Ser	4**	80***	13***
Gln	13***	42***	33***
His	7**	40***	44***
Gly	6**	78***	11***
Thr	3*	76***	14***
β -Ala	0	85***	4
Arg	4**	80***	10***
GABA	6**	79***	10***
α -Ala	8**	72***	13***
Pro	3**	81***	13***
NH_4^+	19*	24**	27*
Tyr	11***	72***	11***
Val	1	63***	28***
Met	0	83***	10**
Cys	18***	60***	11*
Iso	1	83***	8**
Leu	7**	63***	20***
Trp	3*	74***	16***
Phe	8**	66***	16**
Orn	3*	88***	3
Lys	6*	67***	14*
Total	3**	80***	13***

Tabla 4.17. Análisis multifactorial de los compuestos nitrogenados en los vinos con los factores tratamiento (T), añada (A) y la interacción tratamiento-añada (TxA). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$).

4.5. ANÁLISIS DISCRIMINANTE

Se llevó a cabo un análisis discriminante para comprobar si con los valores obtenidos de los distintos compuestos fenólicos y nitrogenados tanto en uvas como en vinos era posible clasificar nuestras muestras según los tratamientos aplicados.

Se obtuvieron dos funciones discriminantes con un valor p inferior a 0,05 resultando estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%. Estas dos funciones discriminantes nos permitieron clasificar correctamente el 100% de las muestras analizadas (**Figura 4.4**). El porcentaje relativo para la función 1 fue de 79,26% y el de la función 2 de 20,74%.

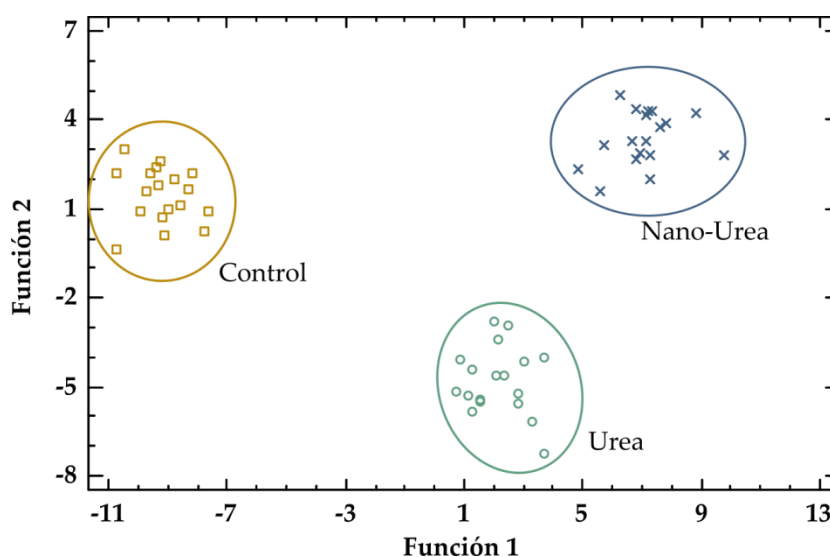


Figura 4.4. Gráfico de dispersión de análisis discriminante en uvas y vinos de las muestras control y de las procedentes de los tratamientos con urea y nano-urea.

Tal como se puede observar en la **Figura 4.4**, hay una clara separación entre el control y los distintos tratamientos. El control se sitúa en la parte central izquierda del gráfico, por otro lado el tratamiento con urea se encuentra próximo al centro y en la parte inferior y el tratamiento con nano-urea se posiciona en la parte derecha del gráfico.

Los coeficientes de discriminación estandarizados se encuentran en la **Tabla 4.18**. La dimensión de los coeficientes de discriminación permite determinar cómo se utilizan las variables para discriminar entre grupos. Las variables con mayor poder de discriminación para la función 1 fueron Leu, Asp+Ser, Val, Thr, Ep-Ext y β -Ala. Para la función 2 fueron Asn+Ser, Gln, Val, Leu y Trp.

	Función 1	Función 2
Asp	-18,6066	13,2725
Glu	6,31836	-0,331791
Asn+Ser	87,9512	-23,6795
Gln	6,41504	-33,0108
His	24,7713	2,85334
Gly	2,43584	2,84207
Thr	-58,4421	12,314
β-Ala	-51,1471	9,73121
Arg +GABA	-25,4477	16,0273
α-Ala	-23,7475	3,75468
Pro	1,04744	1,45646
NH₄⁺	-5,63815	11,3939
Tyr	29,0623	4,15394
Val	-73,828	22,7992
Met	7,17148	-7,03924
Cys	-3,99889	1,27158
Iso	-29,9288	11,1896
Leu	93,6378	-45,1167
Trp	-18,4945	19,3837
Phe	1,10298	3,11893
Orn	0,513449	-0,181724
Lys	-3,54436	-0,841348
EpG-Ext	-9,04379	-15,1491
Cat-Ext	3,22964	-0,738736
Ep-Ext	51,9908	2,91228
Cat-T	19,0478	-7,27534
Ep-3-O-g-Ext	-20,6929	4,42059
Ep-T	-33,5117	5,31148
Ep-3-O-g-T	-1,93545	1,25009
Di-OH	23,5554	-1,69486
Tri-OH	15,9134	-9,53105
Acetatos	12,9123	1,01844
Cumaratos	-23,4796	6,40816
Vitisinas	0,0650273	2,37305
trans-Piceido	-22,3658	-8,72216
Piceatanol	1,68903	11,5536
cis-Piceido	19,3046	-1,0457
trans-Resveratrol	3,84892	-2,45704
ϵ -viniferina	11,0795	-4,97765

Tabla 4.18. Coeficientes discriminantes estandarizados en uvas y vinos de las funciones discriminantes 1 y 2 para el factor tratamiento.

Como se puede apreciar la mayoría de los coeficientes con mayor poder de discriminación corresponden a los aminoácidos, siendo estos los responsables de la buena separación mostrada en la **Figura 4.4**. Esto es debido a que como ya hemos visto en los apartados 4.4.1 y 4.4.2 son los aminoácidos los compuestos en los que se han encontrado mayores diferencias en las uvas y vinos procedentes de los tratamientos con respecto a los controles.

4.6. ANÁLISIS SENSORIAL

Se llevaron a cabo catas triangulares en los vinos correspondientes a las añadas 2020 y 2021 para determinar si a nivel organoléptico se podía detectar alguna diferencia entre los vinos elaborados con las uvas control y los elaborados con las uvas tratadas con urea y con nano-urea. La cata de los vinos de la cosecha 2019 no se realizó debido a problemas organizativos debidos a la pandemia de la COVID-19. Los resultados de las catas de los dos años de estudio que fueron evaluadas por 12 catadores se muestran en la **Tabla 4.19**.

Año	Cata	n	x	p-value
2020	Control vs. Urea	12	6	ns
	Control vs. Nano-urea	12	6	ns
2021	Control vs. Urea	12	3	ns
	Control vs. Nano-urea	12	7	ns

Tabla 4.19. Resultados obtenidos en las catas triangulares realizadas para los tratamientos de urea y nano-urea. n: nº de catadores, x: nº de catadores capaces de diferenciar entre los distintos tratamientos. ns, no significativo.

En el año 2020, cuando comparamos el vino control frente al del tratamiento con urea pudimos observar que de los 12 catadores (n=12), 6 catadores fueron capaces de distinguir correctamente las muestras (x=6), de ellos 2 catadores mostraron preferencia por el vino control y 4 por el vino procedente de uvas tratadas con urea. Cuando comparamos el vino control frente al procedente de uvas tratadas con nano-urea, los resultados fueron algo diferentes, en este caso 6 catadores de los 12 fueron capaces de identificar correctamente las muestras (x=6), además todos ellos mostraron preferencia por el vino control (**Figura 4.5**). A pesar de las preferencias mostradas, los resultados no fueron significativos dado el alto número de personas que no fueron capaces de distinguir entre los vinos procedentes de la uva control y del tratamiento con urea,

puesto que para un panel $n=12$ catadores el número mínimo de catadores capaces de diferenciar entre los dos vinos ha de ser de $x=8$ para un nivel de significación del 5% (UNE-EN-ISO 4120:2021).

En el año 2021, al comparar el vino control frente al del tratamiento con urea tan solo 3 catadores fueron capaces de diferenciar entre los distintos tratamientos ($x=3$), de ellos un catador prefirió el vino control y 2 catadores el procedente del tratamiento con urea. En la comparativa entre los vinos control y los procedentes de nano-urea, 7 catadores diferenciaron los tratamientos ($x=7$) y de ellos tan solo 1 mostró preferencia por el tratamiento con nano-urea. De nuevo, en esta ocasión los resultados no fueron estadísticamente significativos puesto que en ningún caso se alcanzó el mínimo de catadores (8) capaces de distinguir entre los dos vinos para considerar el resultado significativo.

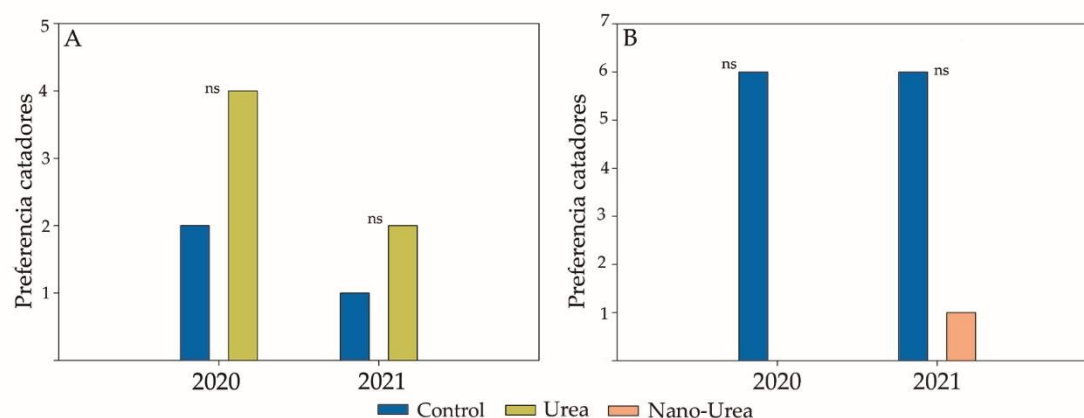


Figura. 4.5. Preferencia mostrada por los catadores en las catas triangulares realizadas: **A**, Control vs. urea. **B**, Control vs. nano-urea.

En resumen y a la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que ambos tratamientos urea y nano-urea, no fueron capaces de producir diferencias significativas a nivel organoléptico entre los vinos elaborados con uvas control y los elaborados a partir de las uvas tratadas para un nivel de confianza del 95%.

5. EFECTO DE METIL JASMONATO Y NANO-METIL JASMONATO SOBRE LA CALIDAD DE UVAS Y VINOS

5.1. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE LAS UVAS Y VINOS

En la **Tabla 5.1** se recogen los parámetros físico-químicos obtenidos en las uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante los tres años de estudio.

Como se puede observar, en nuestros ensayos el °Bé no se vio modificado por ninguno de los tratamientos aplicados durante las tres añadas. En contraste, parámetros como la AT se incrementaron con el tratamiento con MeJ en los años 2020 y 2021, sin embargo este efecto no se produjo con la aplicación de los nano-tratamientos. Si nos fijamos en los valores obtenidos para el ratio °Bé/AT podemos observar que ambos tratamientos mostraron una tendencia a disminuirlo siendo de forma más acusada en el tratamiento de MeJ; esto podría indicar una tendencia a un retraso en el grado de madurez tecnológica como ya mostraron D'Onofrio et al. (2018), en uvas de Sangiovese tratadas con MeJ. Otros investigadores encontraron comportamientos diversos dependiendo de la añada, así Marín-San Román et al. (2023) en la variedad Tempranillo observaron una disminución de °Brix y un aumento en la AT en tratamientos con MeJ en una de las añadas estudiadas pero no en la otra, sin embargo en el caso del tratamiento con nano-MeJ no encontraron este efecto. Martínez-Lapuente et al. (2023) también sobre uva Tempranillo detectaron un comportamiento variable dependiendo de la añada, en el año 2019 ambos tratamientos dieron lugar a un °Brix inferior y aumentaron la AT pero no se repitió este mismo resultado durante la añada siguiente. Sin embargo Pérez-Álvarez et al. (2022a) en tratamientos con MeJ y nano-MeJ sobre Monastrell no mostraron efecto alguno sobre ninguno de los parámetros mencionados.

En referencia al pH, solo el año 2021 mostró valores inferiores al control en ambos tratamientos. Otros autores en uvas tratadas de Tempranillo y Monastrell no encontraron cambio alguno en ninguna de las añadas estudiadas (Marín-San Román et al., 2023; Martínez-Lapuente et al., 2023; Pérez-Álvarez et al., 2021).

El contenido en ácido tartárico tampoco fue modificado por ninguno de los tratamientos aplicados. Autores como Pérez-Álvarez et al. (2021) mostraron el mismo comportamiento que el obtenido en nuestros estudios, al igual que Paladines-Quezada et al. (2019a) en tratamientos con MeJ.

En cuanto al contenido en ácido málico sí que se vio incrementado en el tratamiento con MeJ pero no en el tratamiento con nano-MeJ. Sin embargo, otros autores como Marín-San Román et al. (2023) y Pérez-Álvarez et al. (2021) no observaron cambio alguno en este parámetro en tratamientos similares sobre Tempranillo y Monastrell.

El peso de baya en líneas generales no se vio afectado por los tratamientos, este comportamiento es el que generalmente se ha encontrado en uvas procedentes de tratamientos con MeJ por otros autores tanto en Monastrell como en otras variedades como Tempranillo o Graciano (Marín-San Román et al., 2023; Pérez-Álvarez et al., 2021; Paladines-Quezada et al., 2019a; Portu et al., 2018a) Tan solo en el año 2021 se registró un incremento en las uvas tratadas con MeJ y nano-MeJ que fue significativo.

En relación a los datos aportados por el análisis multifactorial pudimos observar que la añada fue el factor que mostró una mayor influencia en los resultados obtenidos en los parámetros °Bé, AT, °Bé /AT, pH y ácido tartárico. Los tratamientos mostraron una importancia relativa en el contenido en ácido málico (40,2%) atribuible al tratamiento con MeJ que produjo un aumento de forma generalizada. Por otro lado el tamaño de baya tan solo dependió de la añada en un 17,7 % y fue el más afectado por la interacción tratamiento-añada (20,2%).

						Análisis multifactorial		
	Añada	Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value	T (%)	A(%)	TxA(%)
°Baumé	2019	12,92 ± 0,41	12,78 ± 0,22	12,94 ± 0,42	ns			
	2020	14,19 ± 0,31	14,32 ± 0,36	13,92 ± 0,39	ns	0	99	0
	2021	13,14 ± 0,21	13,29 ± 0,15	13,30 ± 0,19	ns	(ns)	(***)	(ns)
AT *	2019	2,85 ± 0,21	3,19 ± 0,16	2,91 ± 0,06	ns			
	2020	2,34 ± 0,09 b	2,68 ± 0,19 a	2,39 ± 0,11 b	*	16	76	0
	2021	1,92 ± 0,13 b	2,39 ± 0,11 a	2,03 ± 0,05 b	**	(***)	(***)	(ns)
°Bé/AT	2019	4,56 ± 0,47	4,01 ± 0,25	4,45 ± 0,24	ns			
	2020	6,06 ± 0,34	5,37 ± 0,42	5,85 ± 0,42	ns	3	94	1
	2021	6,86 ± 0,52 b	5,56 ± 0,21 b	6,55 ± 0,05 a	**	(***)	(***)	(ns)
pH	2019	3,88 ± 0,03	3,84 ± 0,03	3,86 ± 0,05	ns			
	2020	4,09 ± 0,02	4,09 ± 0,04	4,14 ± 0,02	ns	4	86	4
	2021	4,11 ± 0,06 a	4,00 ± 0,04 b	4,05 ± 0,02 ab	*	(*)	(***)	(ns)
Ácido tartárico (g/L)	2019	3,90 ± 0,13	3,80 ± 0,07	3,89 ± 0,08	ns			
	2020	4,49 ± 0,15	4,41 ± 0,15	4,21 ± 0,04	ns	5	79	5
	2021	3,97 ± 0,08	3,91 ± 0,05	3,86 ± 0,16	ns	(ns)	(***)	(ns)
Ácido málico (g/L)	2019	1,41 ± 0,35	1,66 ± 0,19	1,44 ± 0,10	ns			
	2020	1,44 ± 0,06b	1,89 ± 0,04 a	1,45 ± 0,04 b	***	36	40	3
	2021	1,04 ± 0,07 b	1,41 ± 0,12 a	1,16 ± 0,02 b	**	(***)	(***)	(ns)
Peso 100 bayas (g)	2019	155,0 ± 5,7	154,6 ± 11,0	158,9 ± 5,2	ns			
	2020	162,8 ± 3,69	165,3 ± 9,5	170,87 ± 4,83	ns	26	18	20
	2021	143,7 ± 11,0 b	165,8 ± 8,0 a	168,7 ± 0,6 a	*	(**)	(*)	(ns)

Tabla 5.1. Características físico-químicas y rendimiento de las uvas control y de las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021. *Acidez total (AT) expresada en g/L de ácido tartárico. Los datos expresan las medias ± desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05), ns: no significativo.

Los parámetros enológicos de los vinos obtenidos al final de fermentación alcohólica se presentan en la **Tabla 5.2**. En ella podemos observar como el porcentaje de alcohol de los vinos procedentes de las uvas tratadas no mostraron diferencias con respecto al vino control en ninguna de las añadas estudiadas. Esto es algo que era esperable, puesto que tampoco observamos diferencias en los °Bé de las uvas en el momento de la vendimia. Sin embargo, si pudimos observar como de todos los tratamientos, el vino elaborado con uvas tratadas con nano-MeJ mostró siempre una acidez volátil más baja. Autores como Martínez-Lapuente et al. (2023) en vinos de Tempranillo mostraron como la acidez volátil en 2019 fue incrementada solo en el tratamiento con MeJ pero al año siguiente su valor fue inferior.

Con respecto al resto de parámetros medidos, tanto la AT como el pH mostraron algunas diferencias obteniendo siempre los valores más altos los vinos control, pero debido a que los mostos se corrigieron con ácido tartárico en el momento del encubado, estas variaciones no se pueden atribuir a los tratamientos aplicados. Finalmente, el contenido en ácido málico fue superior en los vinos procedentes de las uvas tratadas con MeJ siendo estadísticamente significativos estos valores los años 2020 y 2021.

Otros autores, como Portu et al. (2015c) no observaron diferencias en los parámetros físico-químicos cuando compararon un vino control y un vino procedente de uvas Tempranillo tratadas con MeJ en el año 2013, aunque este mismo autor encontró que el pH descendió en vinos procedentes de uva tratada con MeJ en el año 2014 (Portu et al., 2016). Por otro lado, Martínez-Lapuente et al. (2023) también mostraron diferente comportamiento en los vinos de Tempranillo obtenidos dependiendo de la añada, así en 2019 observaron un contenido inferior en el grado alcohólico de los vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ y nano-MeJ, pero este comportamiento no se repitió en el 2020; así mismo la AT sufrió un ligero descenso en los vinos procedentes de ambos tratamientos en 2019, pero en el 2020 no se vio afectada.

En relación al análisis multifactorial, el factor añada tuvo gran importancia en los resultados obtenidos para el contenido alcohólico (78%), el ácido málico (48%) y el pH (28%). El factor tratamiento parece que afectó más al parámetro acidez volátil (40%) en los vinos elaborados con uvas tratadas con nano-MeJ. Respecto a la AT pudimos

observar que la añada apenas influyó y que fue el factor tratamiento quien mostró un valor de 39%. Como ya se ha comentado previamente este resultado no debemos achacarlo al tratamiento en sí, puesto que los valores obtenidos para este parámetro están justificados por las correcciones que se llevaron a cabo en el encubado.

						Análisis multifactorial		
	Añada	Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value	T (%)	A(%)	TxA(%)
Alcohol % (v/v)	2019	12,94 ± 0,16	12,95 ± 0,37	13,37 ± 0,45	ns			
	2020	14,72 ± 0,34	14,45 ± 0,09	14,40 ± 0,52	ns	2	78	5
	2021	13,44 ± 0,15	13,56 ± 0,33	13,86 ± 0,10	ns	(ns)	(***)	(ns)
Acidez volátil ¹	2019	0,40 ± 0,04	0,41 ± 0,06	0,38 ± 0,02	ns			
	2020	0,41 ± 0,04 ab	0,44 ± 0,03 a	0,36 ± 0,01 b	*	40	16	14
	2021	0,40 ± 0,02 a	0,40 ± 0,05 a	0,28 ± 0,01 b	**	(***)	(*)	(ns)
AT ²	2019	7,44 ± 0,11 a	6,62 ± 0,15 b	6,75 ± 0,07 b	**			
	2020	7,04 ± 0,16	6,45 ± 1,12	6,41 ± 0,13	ns	39	7	3
	2021	7,05 ± 0,06 a	6,49 ± 0,11 c	6,77 ± 0,20 b	**	(*)	(ns)	(ns)
pH	2019	3,33 ± 0,08	3,38 ± 0,02	3,41 ± 0,02	ns			
	2020	3,43 ± 0,02	3,59 ± 0,24	3,48 ± 0,02	ns	17	28	8
	2021	3,38 ± 0,03 b	3,46 ± 0,04 a	3,39 ± 0,02 b	*	(ns)	(*)	(ns)
Ácido málico (g/L)	2019	1,69 ± 0,32	1,89 ± 0,17	1,73 ± 0,02	ns			
	2020	1,44 ± 0,04 b	1,69 ± 0,10 a	1,51 ± 0,03 b	**	24	48	1
	2021	1,35 ± 0,07 b	1,56 ± 0,07 a	1,44 ± 0,05 ab	*	(**)	(*)	(ns)

Tabla 5.2. Características físico-químicas para los vinos obtenidos de las uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021. ¹Acidez volátil expresada como g/L de ácido acético. ²Acidez total (AT) expresada en g/L de ácido tartárico. Los datos representan las medias ± desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05), ns: no significativo.

5.2. COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR DE LAS UVAS

5.2.1. PARED CELULAR AISLADA

La **Tabla 5.3** muestra el porcentaje de piel seca en las uvas y el porcentaje de pared celular aislada en la piel seca de las muestras control y tratadas durante los tres años de estudio. Tal como podemos observar, el mayor porcentaje de piel seca lo encontramos en las uvas tratadas con MeJ siendo estadísticamente significativo este valor en los años 2019 y 2021. Estos valores podrían ser interesantes desde el punto de vista enológico, puesto que los hollejos son la mayor fuente de compuestos de color y aroma (Ortega-Regules et al., 2008a). Sin embargo, autores como Paladines-Quezada et al. (2019b, 2022) en dos estudios diferentes realizados en 2015 y 2017 en uvas Monastrell no encontraron diferencias en la cantidad de piel aislada cuando comparó uvas control y uvas tratadas con MeJ. Las diferencias encontradas entre nuestro estudio y los de este autor podría deberse a la forma de expresar los resultados, ya que en sus estudios se mostraron los resultados referidos a hollejos frescos y en el nuestro son referidos a hollejos secos con el fin de eliminar posibles errores que se puedan derivar de las diferentes cantidades de agua remanente en la piel de la uva. Por el contrario, cuando las uvas fueron tratadas con nano-MeJ, éstas mostraron una tendencia a la disminución en el porcentaje de hollejo, como se observa en los valores obtenidos respecto a las uvas control en las añadas 2019 y 2020. Esta menor cantidad de hollejo podría indicar inicialmente una menor liberación de compuestos de interés en el vino.

En cuanto al % de CWM, las uvas tratadas obtuvieron valores superiores a los obtenidos en las uvas control. En 2019 los porcentajes más altos se mostraron en las uvas tratadas con MeJ y nano-MeJ. En 2020 fueron las tratadas con nano-MeJ, y en la última añada, de nuevo las uvas tratadas con MeJ seguidas de las uvas tratadas con nano-MeJ mostraron los porcentajes más altos. Este incremento general del %CWM en las uvas tratadas podría denotar una pared celular más gruesa. Diferentes investigadores sugieren que la aplicación de elicitores en viñedo provoca un refuerzo de la pared celular dificultando la extracción de compuestos de interés durante el proceso de vinificación (Apolinar-Valiente et al., 2018; Ortega-Regules et al., 2008b).

		% Hollejo ¹	% CWM ²
		(peso seco)	(en piel seca)
2019	Control	3,02b	25,66b
	MeJ	3,17a	28,55a
	Nano-MeJ	2,88c	28,30a
	p-value	***	***
2020	Control	3,26	24,94b
	MeJ	3,32	24,79b
	Nano-MeJ	2,98	27,76a
	p-value	ns	***
2021	Control	3,08b	22,62c
	MeJ	3,33a	24,66a
	Nano-MeJ	3,15b	23,54b
	p-value	*	***

Tabla 5.3. Cantidad de hollejo y rendimiento del aislamiento de las paredes celulares de las uvas control y de las tratadas con MeJ y con nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Abreviaturas: ¹ Porcentaje de hollejo en peso seco respecto al peso de las uvas. ² Pared celular aislada respecto al peso en seco de los hollejos. Diferentes letras indican diferencias significativas según el test LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$); ns, no significativo.

5.2.2. ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR

La **Figura 5.1(A, B y C)** muestra la composición de la pared celular de la uva para el control y los dos tratamientos (MeJ y nano-MeJ) durante los tres años de estudio (2019, 2020 y 2021) respectivamente. Los diferentes componentes analizados fueron proteínas, compuestos fenólicos, azúcares neutros y ácidos urónicos.

5.2.2.1. Proteínas

Como se puede ver en la **Figura 5.1**, las proteínas experimentaron un aumento considerable en los dos tratamientos MeJ y nano-MeJ respecto al control en los años 2019 y 2021, pero en cambio estas diferencias no se evidenciaron durante el año 2020. Otros autores encontraron resultados similares, así Paladines-Quezada et al. (2019b; 2022) en dos estudios llevados a cabo en dos años consecutivos en uvas de Monastrell tratadas con MeJ, detectaron un incremento en el contenido en proteínas aunque con distinta significancia dependiendo de la añada.

Con respecto a los resultados mostrados en 2020, con un comportamiento diferente a los otros dos años podría ser debido a que en este año las uvas se recolectaron más maduras. Esto sugeriría que a un mayor nivel de maduración la síntesis de proteínas en la pared celular podría verse menos afectada por los tratamientos, estando esta hipótesis soportada por los resultados encontrados por diferentes autores. Así Hernández-Hierro et al. (2014) observó un incremento en el contenido en proteínas durante la maduración de uvas Tempranillo que parece verse detenido en uvas sobremaduras. Por otro lado Ortega-Regules et al. (2008a) encontraron una correlación positiva entre el °Brix y las proteínas de la pared celular en un estudio llevado a cabo en diferentes variedades (Monastrell, Syrah, Merlot y Cabernet Sauvignon) y Huang et al. (2005) mostraron como las proteínas estructurales se incrementaban con el grado de maduración en uvas de Golden Muscat. Por último, Nunan et al. (1997) observaron un gran cambio en el perfil de aminoácidos de las paredes celulares de las bayas de Muscat Gordo Blanco y además que las proteínas (principalmente las extensinas) se depositaban en las paredes a medida que las bayas se desarrollaban.

Por lo tanto, a la vista de los resultados mostrados, es razonable creer que el mayor contenido de proteínas en los hollejos de las uvas tratadas en comparación con las uvas control podría representar una mayor rigidez estructural, dificultando así la degradación de la pared celular de estas pieles de uva durante el proceso de vinificación así como la extracción de los compuestos de interés.

5.2.2.2. Compuestos fenólicos totales

Como puede verse en la **Figura 5.1**, en general, los resultados mostraron que la cantidad de compuestos fenólicos en las uvas tratadas tanto con MeJ como con nano-MeJ no fueron diferentes a los obtenidos en las uvas control. De los tres años de estudio llevados a cabo solo se pudo observar una notable disminución del 31% en la cantidad de CFT en uvas tratadas con nano-MeJ durante la añada 2020. Por el contrario, en dos estudios de Paladines-Quezada et al. (2019b, 2022) se mostraron aumentos de CFT en uvas Monastrell tratadas con MeJ en varias campañas, aunque los incrementos fueron diferentes dependiendo del año estudiado. Diferentes investigadores han estudiado la influencia del grado de maduración sobre la evolución de los CFT, lo que podría influir

también en el efecto sobre ellos de los tratamientos. Así, Ortega-Regules et al. (2008a) en uva Monastrell observaron una pequeña disminución en estos compuestos a lo largo del proceso de maduración y Hernández-Hierro et al. (2014) registraron en una primera fase un aumento de CFT y luego una ligera disminución durante el proceso de maduración en uvas Tempranillo.

5.2.2.3. Azúcares neutros

Dentro de este grupo de compuestos analizamos la glucosa celulósica (celulosa) y la glucosa no celulósica (hemicelulosa).

En cuanto a la celulosa, pudimos observar que en todos los tratamientos, este compuesto obtuvo valores inferiores al control, en contraste con la hemicelulosa, que aumentó durante los tres años de estudio en ambos tratamientos, aunque en el año 2020 solo se detectó hemicelulosa en las uvas tratadas con nano-MeJ. Un aumento de la hemicelulosa, que actúa fijando las microfibrillas de celulosa (Ortega-Regules et al., 2008b), indicaría un refuerzo de la pared celular con los tratamientos. Diferentes resultados han sido mostrados por autores en los que se le ha aplicado MeJ en diferentes cultivares. Así autores como Paladines-Quezada et al. (2022), en un estudio realizado en uvas tratadas con MeJ durante dos campañas, encontraron una disminución de la glucosa celulósica en la primera campaña, pero no así en la segunda. Otro estudio del mismo autor no encontró ningún efecto sobre la glucosa celulósica y sí una disminución de la glucosa no celulósica (2019). Otros informes sobre un estudio en *Bachypodium distachyon* (una gramínea modelo) detectó un incremento de la celulosa en respuesta al tratamiento con MeJ (Napoleão et al., 2017). Sin embargo, en un tratamiento post-cosecha y durante el almacenamiento en frío de frutos de níspero, se observó una disminución de la celulosa y la hemicelulosa (Cao et al., 2010).

5.2.2.4. Ácidos urónicos

Con respecto a los ácidos urónicos, durante el primer año los valores más altos se mostraron en las uvas control y en las uvas tratadas con nano-MeJ. En cambio en 2020 y 2021 ambos tratamientos aumentaron notablemente los ácidos urónicos, para el tratamiento con MeJ en un 74% y 49% respectivamente y para el tratamiento con nano-

MeJ en un 85% y 41%. Dado que las pectinas actúan como sustancias cementantes entre los componentes de la pared celular (Jarvis, 1984), los aumentos observados en pectinas en los tratamientos durante los años 2020 y 2021 podrían indicar un fortalecimiento de la pared celular en estas uvas. Por el contrario, Paladines-Quezada et al. (2019b) encontraron que los ácidos urónicos no se vieron afectados por el tratamiento con MeJ durante dos campañas consecutivas en la variedad Monastrell, pero si observaron un aumento en las uvas Merlot y una disminución en las uvas Cabernet Sauvignon durante la misma temporada. Estos mismos autores en otro estudio sobre Monastrell tratada con MeJ encontraron comportamientos diferentes según la añada, en una de ellas no se vieron afectados y en la siguiente se pudo observar concentraciones inferiores a las obtenidas en las uvas control (Paladines-Quezada et al., 2022).

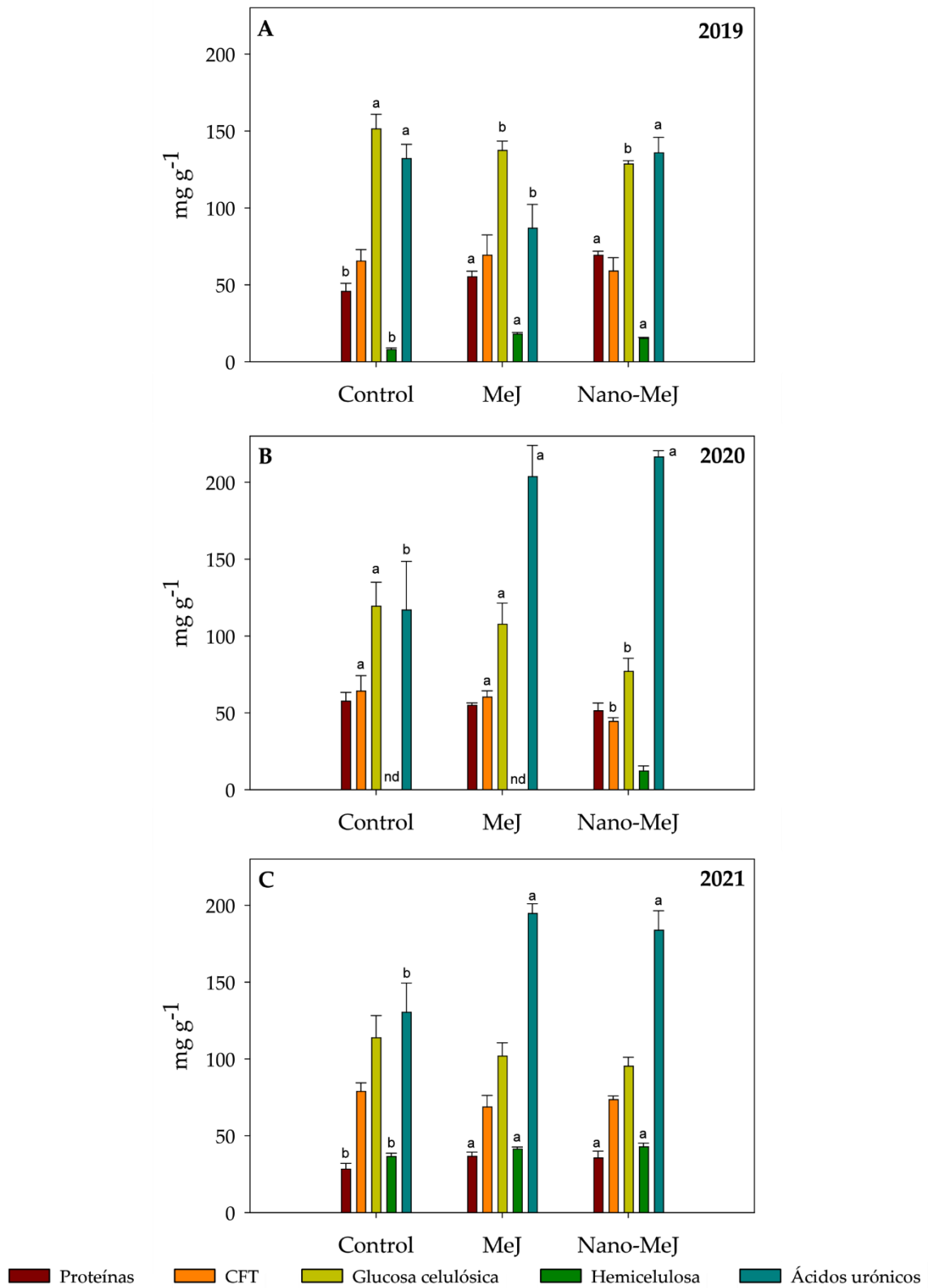


Figura 5.1. Composición de la pared celular en uvas Monastrell control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas (A) 2019, (B) 2020 y (C) 2021. Diferentes letras en las barras del mismo color indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (95% ($p < 0,05$)), nd, no detectado.

5.2.2.5. Análisis multifactorial

Se realizó un análisis multifactorial para definir como afectaban los factores tratamiento, añada y la interacción entre ambos a cada uno de la familia de compuestos analizados en la pared celular.

La **Tabla 5.4** muestra el porcentaje de varianza atribuible a cada uno de los factores analizados. Como puede observarse, la añada fue el factor que más afectó a los distintos componentes medidos en la pared celular aunque cuantitativamente de modo diferente, siendo el parámetro más afectado la hemicelulosa (88%). La variabilidad obtenida en los ácidos urónicos se vio influida de forma bastante similar por el tratamiento, la añada y por la interacción entre ambos. Sin embargo el efecto que los tratamientos tuvieron sobre todos estos parámetros fue limitado, destacando la influencia que tuvieron sobre la variabilidad obtenida en la glucosa celulósica (25%) y en los ácidos urónicos (24%). Por otro lado, la interacción entre ambos factores fue significativa en todos los parámetros medidos excepto en la glucosa celulósica.

Otras investigaciones también mostraron resultados similares en los que la influencia de la estacionalidad fue evidente cuando estudiaron los diferentes componentes de la pared celular. Así autores como Paladines-Quezada et al. (2019b) en un estudio sobre el efecto de MeJ y BHT sobre la composición de la pared celular en diferentes variedades de uva, encontraron diferencias para algunos componentes de los mismos debidos al efecto añada.

	T(%)	A (%)	TxA (%)
Proteínas	7 ***	69 ***	17 ***
CFT	15 **	40 ***	13 *
Glucosa celulósica	25 ***	57 ***	5 ns
Hemicelulosa	4 ***	88 ***	2 *
Ácido urónicos	24 ***	37***	31 ***

Tabla 5.4. Análisis multifactorial de los componentes de la pared celular con los factores tratamiento (T), añada (A) y la interacción tratamiento-añada (TxA). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$); ns, no significativo.

5.3. COMPUESTOS FENÓLICOS DE UVAS Y VINOS

5.3.1. ANTOCIANOS EN UVAS

La **Tabla 5.5** muestra el contenido de antocianos totales y los sumatorios de los distintos tipos de antocianos analizados. Respecto a los diferentes años estudiados podemos observar que la concentración antociánica de las uvas varió notablemente entre ellos, obteniéndose las mayores concentraciones en el año 2019, seguido del año 2021 y finalmente del año 2020. Esto pudo ser debido a las diferencias climatológicas experimentadas, como ya se comentó en el apartado 4.3.1.

Respecto a los tratamientos, el comportamiento fue diferente en cada una de las añadas estudiadas. En el año 2019 los tratamientos apenas tuvieron influencia en el contenido de antocianos de las uvas, el tratamiento con MeJ tan solo mostró una pequeña tendencia a aumentar los antocianos totales y el tratamiento con nano-MeJ una tendencia a disminuir su síntesis. Por otro lado, en los años 2020 y 2021 el tratamiento con MeJ tuvo un importante efecto sobre el contenido total de antocianos, con un aumento del 33% y 21% respectivamente. El escaso efecto de la elicitación con MeJ en 2019 pudo deberse a la recolección de las uvas antes de haber alcanzado la madurez adecuada, dado que los otros dos años de estudio en los que la uva se vendimió más madura, si que se detectaron incrementos en los antocianos. Sin embargo otros autores reportaron que sería posible detectar una mayor diferencia en los resultados tras la aplicación de elicitores, si la vendimia se realizaba con anterioridad (Gómez-Plaza et al., 2017), cosa que parece no concordar con nuestros resultados.

Para el grupo de antocianos no acilados, pudimos observar como en el año 2019 se mantuvo la tendencia encontrada en los antocianos totales; en los años 2020 y 2021 el tratamiento con MeJ produjo un aumento de los mismos, sin embargo el tratamiento con nano-MeJ no fue capaz de mostrar ese incremento. Respecto a los antocianos Di-OH y Tri-OH, de nuevo se reflejaron incrementos en las uvas tratadas con MeJ pero no con el tratamiento con nanopartículas, en este último caso tan solo en el año 2020 se incrementó el contenido en antocianos Di-OH aunque no de forma significativa. Este incremento de los compuestos Tri-OH por parte del MeJ es importante desde el punto de vista

tecnológico puesto que estos compuestos tienen importancia en la estabilidad del color de los vinos (Koyama et al., 2018).

Los antocianos acilados solo aumentaron en el año 2020 de manera destacada cuando las uvas fueron tratadas con MeJ y con un ligero incremento cuando aplicamos nano-MeJ, aunque con este último tratamiento no llegó a ser significativo. Respecto a los acetatos, se observó como el tratamiento con MeJ desencadenó incrementos en los años 2020 y 2021, pero además el tratamiento nano-MeJ también mostró cierta tendencia a incrementarlos el año 2020. Los acetatos también resultan importantes desde el punto enológico porque proporcionan una mayor estabilidad de color en el vino final debido al impedimento estérico del grupo acético que dificulta las reacciones de hidratación (Moreno-Pérez, 2013). Por otro lado, los cumaratos solo aumentaron el año 2020 cuando las uvas fueron tratadas con MeJ.

Con los resultados obtenidos hemos de remarcar, que aunque de modo general el efecto del nano-MeJ parece ser muy escaso, sí que mostró cierta tendencia a incrementar los antocianos el año en el que la síntesis de ellos fue menor (2020). Por lo que se podría intuir un efecto beneficioso sobre la síntesis de antocianos cuando las condiciones climatológicas son adversas como lo fue el año 2020. Si bien es cierto que este año el efecto del tratamiento con MeJ fue mucho mayor, hemos de considerar que la dosis aportada con el Nano-MeJ fue 10 veces inferior.

En relación a lo encontrado por otros autores, los resultados han sido dispares dependiendo de la variedad y la añada estudiada. Existen numerosos estudios en los que se ha investigado el efecto del MeJ sobre la síntesis de antocianos, así Ruiz-García et al. (2012) detectaron incrementos sobre todas las fracciones de antocianos en la variedad Monastrell, pero estos mismos autores en otro estudio en el que su investigación la llevaron a cabo sobre diferentes clones de Monastrell, observaron que solo en algunos de ellos se producía un aumento de antocianos totales pero en otros no se detectó variación o incluso la concentración resultó ser inferior al control (Ruiz-García et al., 2013). Más recientemente, Paladines-Quezada et al. (2019a) en un estudio sobre la misma variedad durante dos años consecutivos y con el mismo tratamiento, encontraron diferente comportamiento según el año de estudio, así en el año 2016 todos los grupos

de antocianos estudiados se incrementaron, tanto los acilados como no acilados; sin embargo en el año 2017 hubo un descenso significativo de los antocianos acilados, tanto de los acetatos como de los cumaratos, en cambio la suma total de antocianos aunque descendió no resultó ser significativa. Finalmente, en otras variedades como Tempranillo (Portu et al., 2015c) y Garnacha (Portu et al., 2017) también se encontraron efectos positivos sobre la cantidad de antocianos totales en las uvas al ser tratadas con MeJ.

Investigaciones que engloben el efecto producido por nanopartículas que contienen MeJ sobre la síntesis de antocianos son más escasas, solo Garde-Cerdán et al. (2023a) han realizado un estudio sobre viñedos de Tempranillo durante dos añadas, empleando tratamientos foliares con MeJ en forma convencional y en forma de nanopartícula, obteniendo el primer año de estudio un aumento tanto en los antocianos acilados como en los no acilados en el tratamiento con MeJ. Sin embargo, el tratamiento con nano-MeJ solo fue capaz de incrementar de modo significativo los antocianos acilados. En la siguiente añada no se obtuvo cambio significativo en ninguno de los tratamientos, a excepción de en los antocianos Di-OH (la cianidina 3-glucosido y peonidina 3-glucosido) que si se vieron incrementados en el tratamiento con MeJ.

El análisis multifactorial nos mostró que el factor añada fue el más importante para los resultados obtenidos en las diferentes clases de antocianos analizados, siendo los antocianos no acilados los que se vieron más afectados por este factor (63%) y dentro de estos a su vez las formas Tri-OH (62%). El factor tratamiento como se puede ver, tuvo un efecto limitado en los resultados obtenidos, con una influencia tan solo del 14% para los antocianos totales. Por otro lado aunque este factor parece que no influyó de manera significativa sobre el total de los antocianos acilados, sí que se pudo apreciar una mayor influencia del mismo en el caso de los acetatos (29%). Finalmente, la interacción tratamiento-año resultó ser no significativa para todos los grupos de antocianos analizados.

						Análisis multifactorial		
	Añada	Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value	T(%)	A(%)	TxA(%)
Antocianos Totales	2019	35944,54 ± 8541,29	36339,07 ± 4092,46	32040,52 ± 4962,47	ns			
	2020	19975,09 ± 1293,97 b	26704,92 ± 1467,72 a	22185,58 ± 258,55 b	***	14	58	5
	2021	26887,99 ± 771,54 b	32629,13 ± 2470,91 a	24962,16 ± 509,12 b	**	(*)	(***)	(ns)
No acilados	2019	31248,14 ± 7560,91	31996,52 ± 3531,84	28282,95 ± 4086,89	ns			
	2020	16447,92 ± 133,54 b	22335,86 ± 1371,92 a	18351,13 ± 14,86 b	**	14	63	4
	2021	21789,88 ± 472,18 b	27648,35 ± 2206,74 a	20177,49 ± 542,52 b	**	(**)	(***)	(ns)
Acilados	2019	4696,4 ± 991,77	4342,55 ± 678,93	3757,57 ± 888,51	ns			
	2020	3527,17 ± 90,20 b	4369,06 ± 176,59 a	3834,45 ± 270,58 b	**	7	40	13
	2021	5098,11 ± 319,27	4980,78 ± 272,19	4784,67 ± 211,36	ns	(ns)	(**)	(ns)
Di-OH	2019	8500,17 ± 1216,15	9578,7 ± 2598,90	9089,48 ± 741,24	ns			
	2020	5355,93 ± 778,15 b	7841,27 ± 847,75 a	6316,78 ± 318,64 b	*	22	41	8
	2021	6713,45 ± 376,69 b	8560,32 ± 854,20 a	5635,59 ± 852,43 b	**	(**)	(***)	(ns)
Tri-OH	2019	22747,97 ± 6373,46	22417,82 ± 1594,85	19193,48 ± 4804,68	ns			
	2020	11091,98 ± 575,69 b	14494,59 ± 1159,45 a	12034,35 ± 309,82 b	**	9	62	4
	2021	15076,42 ± 612,52 b	19088,03 ± 1353,27 a	14541,90 ± 698,68 b	**	(ns)	(***)	(ns)
Acetatos	2019	892,3 ± 184,51	966,88 ± 219,20	774,38 ± 148,76	ns			
	2020	812,02 ± 22,85 c	1163,71 ± 53,44 a	921,53 ± 59,51 b	***	29	37	7
	2021	1088,57 ± 61,64 b	1290,26 ± 69,82 a	1069,34 ± 75,29 b	*	(**)	(***)	(ns)
Cumaratos	2019	3754,47 ± 825,98	3316,53 ± 460,85	2940 ± 726,71	ns			
	2020	2701,64 ± 95,84 b	3190,61 ± 161,35 a	2898,27 ± 210,17 ab	*	5	39	14
	2021	3933,05 ± 272,10	3663,03 ± 210,95	3670,87 ± 180,99	ns	(ns)	(**)	(ns)

Tabla 5.5. Concentración de antocianos ($\mu\text{g/g}$ hollejo) en las uvas control y las procedentes de los tratamientos MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD ($p < 0.05$). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$); ns, no significativo.

5.3.2. ANTOCIANOS EN VINOS

En la **Tabla 5.6** se puede observar los resultados obtenidos para todos estos compuestos analizados durante los tres años consecutivos de estudio.

Al igual que sucedió con las uvas, en el año 2019 los tratamientos no produjeron efecto alguno sobre el total de los antocianos, tampoco sobre los diferentes grupos analizados (acilados, no acilados, Tri-OH, Di-OH, acetatos, cumaratos o vitisinas).

En el año 2020 el tratamiento con MeJ produjo un aumento del 25% sobre el total de antocianos, reflejando incrementos tanto en los antocianos no acilados como en los acilados. Sin embargo el tratamiento con nano-MeJ no fue capaz de conseguir vinos con mayor cantidad de antocianos, obteniéndose concentraciones inferiores de antocianos acilados y dentro de éstos especialmente de los cumaratos en comparación al vino control. Las vitisinas lograron un aumento en el tratamiento con MeJ, sin embargo su aporte al total de antocianos es muy pequeño, aunque siempre es interesante su incremento dado que poseen una mayor estabilidad en el color que otros antocianos (Morata et al., 2003); por otro lado con el tratamiento con nano-MeJ estos compuestos no llegaron a superar las concentraciones obtenidas en el vino control.

En el año 2021 ambos tratamientos produjeron un incremento en el total de los antocianos, con un 22% en el caso del MeJ y de un 8% en el del nano-MeJ. En el caso del tratamiento con nano-MeJ el aumento se debió principalmente al incremento experimentado en los antocianos acilados y especialmente en los cumaratos.

Entre los resultados mostrados por otros autores, Portú et al. (2015c y 2016) encontraron un aumento en los antocianos totales vinos de Tempranillo procedentes de uvas tratadas foliarmente con MeJ. Gil-Muñoz et al. (2017b) mostraron diferentes resultados en función de la variedad estudiada, así en vinos de Syrah se observó un ligero incremento de los antocianos totales, en los de Monastrell este aumento fue considerable, y finalmente en los vinos de Merlot no se detectó incremento alguno.

Comparando los resultados obtenidos en las uvas (**Tabla 5.5**) con los obtenidos en los vinos (**Tabla 5.6**) podemos observar que la relación entre ambos depende de la añada y del tratamiento aplicado. Así en el caso de MeJ, en los años en los que se registró

un aumento de antocianos en las uvas (2020 y 2021) sí que se pudo observar un mayor contenido de antocianos en los vinos procedentes de las uvas tratadas. Por otro lado, en el caso del tratamiento con nano-MeJ aunque en el año 2020 se registró un incremento de antocianos en las uvas, éste luego no se reflejó en el vino. Esta dificultad que en ocasiones se encuentra en la extracción de los compuestos de interés desde la uva al vino también ha sido mostrada por otros autores. Así Portu et al. (2018b) en un estudio en el que se aplicó MeJ sobre viñedos de Tempranillo y Graciano, registraron aumentos en el contenido de antocianos en las uvas de Tempranillo pero este incremento no se trasladó de modo significativo al vino; en el caso de Graciano tampoco se obtuvo una relación entre el incremento encontrado en uvas y el registrado finalmente en los vinos. Lo mismo observó Gil-Muñoz et al. (2017b) en uvas y vinos de la variedad Merlot cuando las primeras fueron tratadas con MeJ. Por otro lado Paladines-Quezada et al. (2019a) en su estudio sobre viñedos de Monastrell tratados con MeJ encontró una buena correlación entre los antocianos encontrados en las uvas y después en sus vinos, de modo que se mostró en el año 2016 un aumento en el contenido en antocianos y en el año 2017 concentraciones inferiores respecto al control. Finalmente un estudio más reciente en el que se aplicaron tanto un tratamiento con MeJ como con nano-MeJ sobre vides de Tempranillo durante los años 2019 y 2020, mostró que ninguno de los tratamientos aplicados fueron capaces de incrementar el total de antocianos en vinos, tan solo en el año 2019 se detectó cierta tendencia a aumentar la concentración de estos compuestos aunque no de forma significativa (Pérez-Álvarez et al., 2022b).

Respecto al análisis multifactorial, pudimos observar que tal como ocurría en la uva, el factor añada fue el que más influyó en la variabilidad obtenida en los resultados respecto a los diferentes tipos de antocianos medidos. Por otra parte, los tratamientos influyeron de forma limitada, siendo los antocianos Tri-OH los que más se vieron afectados por este factor (21%) seguido de los antocianos totales (17%). La interacción entre ambos factores apenas tuvo importancia quedando por debajo del 10% para todos los grupos de antocianos analizados.

						Análisis multifactorial		
	Añada	Control	Mej	Nano-Mej	p-value	T (%)	A(%)	TxA(%)
Antocianos Totales	2019	608,03 ± 60,39	602,82 ± 41,76	559,58 ± 55,55	ns			
	2020	423,32 ± 15,99 b	525,85 ± 28,48 a	394,99 ± 41,21 b	**	17	61	8
	2021	554,12 ± 41,87 b	675,73 ± 60,32 a	596,02 ± 13,36 ab	*	(**)	(***)	(ns)
No acilados	2019	520,57 ± 54,43	514,5 ± 34,43	475,1 ± 49,75	ns			
	2020	364,06 ± 13,13 b	454,49 ± 26,92 a	342,67 ± 37,88 b	**	19	55	8
	2021	466,69 ± 39,68 b	578,83 ± 53,78 a	496,86 ± 12,11 b	*	(***)	(***)	(ns)
Acilados	2019	78,99 ± 4,99	78,78 ± 6,70	76,03 ± 4,80	ns			
	2020	57,30 ± 3,64 b	69,05 ± 1,90 a	50,84 ± 3,59 c	**	4,66	79,39	9,57
	2021	82,61 ± 2,79 b	91,90 ± 5,86 a	94,99 ± 3,08 a	*	(**)	(***)	(**)
Di-OH	2019	83,14 ± 14,02	81,92 ± 7,28	85,2 ± 15,54	ns			
	2020	61,1 ± 7,68	74,37 ± 25,57	61,01 ± 11,45	ns	8	25	8
	2021	61,09 ± 10,05	80,56 ± 16,11	74 ± 3,78	ns	(ns)	(*)	(ns)
Tri-OH	2019	437,43 ± 41,01	432,58 ± 30,86	389,9 ± 34,34	ns			
	2020	302,96 ± 11,27 b	380,12 ± 5,54 a	281,66 ± 26,63 b	***	21	60	7
	2021	405,60 ± 29,63 b	498,27 ± 37,73 a	422,87 ± 9,33 b	*	(***)	(***)	(ns)
Acetatos	2019	31,23 ± 1,14	31,77 ± 1,42	29,94 ± 1,90	ns			
	2020	19,13 ± 1,05 b	23,79 ± 1,17 a	18,37 ± 1,14 b	**	11	79	5
	2021	23,50 ± 0,31 b	28,92 ± 2,60 a	26,59 ± 0,74 ab	*	(***)	(***)	(**)
Cumaratos	2019	47,75 ± 3,86	47,01 ± 5,30	46,1 ± 3,14	ns			
	2020	38,17 ± 2,73 b	45,26 ± 0,97 a	32,48 ± 2,76 c	**	2	83	9
	2021	58,93 ± 2,89 b	62,96 ± 3,52 ab	68,30 ± 2,46 a	*	(ns)	(***)	(***)
Vitisinas	2019	8,47 ± 1,19	9,53 ± 0,71	8,45 ± 1,36	ns			
	2020	1,97 ± 0,34 ab	2,31 ± 0,36 a	1,48 ± 0,13 b	*	2	93	0
	2021	4,82 ± 1,17	5 ± 0,81	4,17 ± 0,17	ns	(ns)	(***)	(ns)

Tabla 5.6. Concentración de antocianos (mg/L) en vinos procedentes de uvas control y las tratadas con Mej y nano-Mej durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Los datos representan las medias ± desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD (p<0.05). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p< 0,01) y 95%* (p< 0,05), ns: no significativo.

5.3.3. ESTILBENOS EN UVAS

La **Tabla 5.7** muestra las concentraciones encontradas en las pieles de las uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ para los diferentes estilbenos analizados, así como para el total de estilbenos llevados a cabo en los tres años de estudio (2019-2021).

Con respecto a los diferentes años de estudio podemos observar como los resultados fueron variables en función de la añada estudiada. El año 2019 fue el año en el que mayor cantidad de estilbenos se detectaron en la uva, los valores que presentaron las muestras control duplicaron a las encontradas en los años 2020 y 2021. En el año 2019, como ya se comentó en el apartado 4.3.3, antes del momento de vendimia se produjo un episodio de lluvias abundantes y quizá posibles indicios de aparición de focos de podredumbre, lo que pudo inducir una mayor síntesis de estilbenos.

Respecto a la influencia de los tratamientos en los resultados obtenidos, en el año 2019 el tratamiento con MeJ no tuvo demasiada influencia en la concentración de estilbenos analizados, provocando un incremento en el total de los estilbenos estudiados del 7,4% aunque sin llegar a ser significativo. Sin embargo el tratamiento con nano-MeJ tuvo mayor incidencia llegando a incrementar el total de estilbenos en un 19% con respecto a las uvas control, e incrementando individualmente los contenidos en *trans*-piceido, piceatanol y *trans*-resveratrol. Durante el año 2020 se mostró cierta tendencia a aumentar la cantidad de *cis*-piceido y sobre todo *trans*-resveratrol con el tratamiento de MeJ, por otro lado el tratamiento con nanopartículas mostró incluso una pequeña tendencia a disminuir *trans*-resveratrol y ϵ -Viniferina pero en ningún caso fue significativo. Este escaso efecto de los tratamientos durante este año pudo deberse al mayor impacto que tuvieron las temperaturas por encima de 35°C, las cuales se ha descrito que tienen incidencia en la expresión de los genes de la estilbeno-sintetasa, suprimiendo su expresión cuando esto ocurre (Kim et al., 2018). Finalmente, en el año 2021 se encontró un comportamiento similar al encontrado en 2019 pero con mayor efecto por parte de los tratamientos, así en el tratamiento con MeJ se registró un incremento del 20% en el contenido total de estilbenos con respecto a la uva control, pero sin llegar a ser significativo, por otro lado el nano-MeJ sí que aumentó de manera

destacada todos los estilbenos estudiados, llegando a incrementar la suma de todos ellos en un 75% respecto a las uvas control.

Comparando los resultados obtenidos en nuestro estudio con los encontrados por otros autores podemos encontrar similitudes y disparidades. Así, Gil-Muñoz et al. (2017a) en un estudio sobre viñedos de Monastrell y Tempranillo tratados con MeJ durante dos años, detectaron un incremento importante de estilbenos en uvas Monastrell en el año 2015 pero un descenso en uvas Tempranillo en el año 2014, por lo que los resultados dependieron tanto del año como de la variedad. Por otro lado, Portu et al. (2018a) en tratamientos con MeJ sobre uva Tempranillo y Graciano durante dos años, registraron aumentos en los estilbenos en ambas variedades y en los dos años de estudio.

En relación a estudios que incluyen el empleo de nanopartículas que contienen MeJ, Parra-Torrejón et al. (2021) mostraron en viñedos de Monastrell un incremento similar tanto cuando se aplicó MeJ en forma convencional o en forma de nanopartículas, este último con una dosis de aplicación 10 veces inferior en MeJ. Otro estudio más reciente que incluye tratamientos sobre viñedos de Tempranillo durante los años 2019 y 2020, mostró que los tratamientos no tuvieron efecto en el año 2019 aunque sí que se encontró un incremento en el total de estilbenos en el tratamiento con nano-MeJ en el año 2020 (Garde-Cerdán et al., 2023a).

Por último y fijándonos en el análisis multifactorial, pudimos observar que el factor añadida fue el que más influyó en la variabilidad de los resultados obtenidos, siendo remarcable en el caso de la ϵ -viniferina (92%) seguido por el *trans*-resveratrol (67%). Por otro lado, los compuestos más afectados por los tratamientos fueron *trans*-piceido (21%), piceatanol (21%) y *cis*-piceido (23%). La interacción entre ambos factores fue significativa para todos los compuestos medidos.

Como conclusión final y atendiendo a nuestros resultados podemos decir que el tratamiento con nano-MeJ mostró una mayor eficacia en el proceso de elicitación de estilbenos que el tratamiento convencional con MeJ, con la ventaja de que el nano-MeJ es aplicado con un contenido en MeJ 10 veces inferior al tratamiento convencional y actúa de manera más eficiente y controlada.

	Añada	Control	Mej	Nano-Mej	p-value	Análisis multifactorial		
						T (%)	A(%)	TxA(%)
<i>trans-piceido</i>	2019	0,17 ± 0,01 b	0,13 ± 0,01 b	0,47 ± 0,03a	***			
	2020	1,75 ± 0,35	1,85 ± 0,61	1,79 ± 0,40	ns	21	40	35
	2021	1,04 ± 0,54 b	1,35 ± 0,47 b	5,42 ± 0,68 a	***	(***)	(***)	(***)
Piceatanol	2019	0,06 ± 0,01 b	0,07 ± 0,01 b	0,13 ± 0,00 a	***			
	2020	0,35 ± 0,05	0,37 ± 0,06	0,36 ± 0,09	ns	21	41	37
	2021	0,36 ± 0,11 b	0,38 ± 0,13 b	1,62 ± 0,03 a	***	(***)	(***)	(***)
<i>cis-piceido</i>	2019	0,77 ± 0,08	0,5 ± 0,05	0,77 ± 0,18	ns			
	2020	2,66 ± 0,59	3,87 ± 1,06	4,13 ± 1,69	ns	23	43	27
	2021	1,14 ± 0,25 b	1,13 ± 0,30 b	5,67 ± 0,62 a	***	(***)	(***)	(***)
<i>trans-resveratrol</i>	2019	50,60 ± 4,08 b	54,47 ± 1,98 b	64,95 ± 1,59 a	**			
	2020	26,17 ± 7,70	41,2 ± 10,76	20,75 ± 1,18	ns	8	67	16
	2021	32,92 ± 3,52	40,4 ± 3,90	44,58 ± 7,46	ns	(**)	(***)	(***)
ϵ -viniferina	2019	67,35 ± 4,76	72,58 ± 3,44	75,28 ± 1,23	ns			
	2020	22,29 ± 3,88	15,27 ± 1,16	20,69 ± 7,13	ns	3	92	3
	2021	21,24 ± 0,86 b	25,06 ± 4,22 b	42,30 ± 1,65 a	***	(***)	(***)	(***)
Totales	2019	118,95 ± 8,51 b	127,76 ± 5,47 b	141,60 ± 2,56 a	*			
	2020	53,23 ± 8,37	62,56 ± 10,18	47,71 ± 6,13	ns	6	85	7
	2021	56,70 ± 2,97 c	68,32 ± 6,00 b	99,58 ± 4,65 a	***	(***)	(***)	(***)

Tabla 5.7. Concentración de estilbenos ($\mu\text{g/g}$ hollejo) en las uvas control y las procedentes de los tratamientos Mej y nano-Mej durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD ($p < 0,05$). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$), ns: no significativo.

5.3.4. ESTILBENOS EN VINOS

La cantidad de estilbenos encontrada en el vino dependerá en primer lugar de la que se encuentra en la piel de las uvas y posteriormente del proceso tecnológico durante el proceso de vinificación que se lleve a cabo mediante el cual son extraídos. De los resultados mostrados en la **Tabla 5.8** pudimos observar que la extracción de estos compuestos en el vino fue dispar durante los tres años estudiados, como ya comentamos en el apartado 4.3.4.

Los resultados del año 2019 mostraron que los vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ consiguieron una concentración en estilbenos que duplicó a la obtenida en el vino control, principalmente debido al incremento observado en el *trans*-resveratrol. Sin embargo, el tratamiento con nano-MeJ que en las uvas consiguió un mayor aumento que el tratamiento con MeJ, solo mostró su efecto en el vino de manera parcial, ya que consiguió incrementar un 16% los estilbenos totales, pero sin llegar a ser éste valor significativo. Este aumento se debió sobre todo al incremento observado en el *trans*-resveratrol. En el año 2020 pudimos observar una mayor concordancia entre los estilbenos encontrados en las uvas y los que finalmente fueron trasladados al vino, ya que ningún tratamiento obtuvo un efecto significativo, ni en las uvas, ni en los vinos. Finalmente el año 2021 los vinos procedentes de uvas tratadas con nano-MeJ consiguieron unos valores totales superiores al control y al tratamiento con MeJ, al igual que sucedió en las uvas. Este incremento se debió a la mayor concentración encontrada en piceatanol, *trans*-resveratrol y ϵ -viniferina.

Esta variabilidad en la extracción final de los estilbenos en el vino debe tener una relación, al igual que ocurre con otros compuestos fenólicos, con la estructura y composición de la pared celular de la piel de las uvas, que como anteriormente hemos visto se ve afectada tanto por los tratamientos como por la añada. Además, los estilbenos extraídos en el vino sufren procesos de hidrólisis enzimática de las formas glicosiladas y a su vez procesos de *trans*-*cis* isomerización (Bavaresco et al., 2012).

Autores como Portu et al. (2015c) observaron un incremento en el total de estilbenos, sobre todo debido al aumento en *trans*-piceido, en vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ. Por otro lado Gil-Muñoz et al. (2017a) en su estudio sobre la aplicación

foliar de MeJ sobre uva Monastrell y Tempranillo, encontraron también diferencias en la extracción de estilbenos al vino dependiendo de la añada y de la variedad; en vinos de Monastrell detectaron incrementos en los estilbenos totales ambos años de estudio mientras que en los de Tempranillo solo se consiguió aumentarlos en una de las añadas estudiadas. Otro estudio más reciente de Pérez-Álvarez et al. (2022b) sobre vinos obtenidos de uvas de Tempranillo que habían sido tratadas foliarmente con MeJ y nano-MeJ, describieron comportamientos diferentes dependiendo de la añada, en 2019 solo en el tratamiento con MeJ se consiguió incrementar el contenido en *trans*-resveratrol, sin embargo en el año 2020 ambos tratamientos consiguieron aumentos en *trans*-piceido, y *trans* y *cis*-resveratrol aunque la suma total de estilbenos solo mostró cierto aumento que no llegó a ser significativo para ninguno de los dos tratamientos.

En relación al análisis multifactorial, de nuevo la añada fue el factor determinante en los resultados obtenidos, sobre todo en el caso de ϵ -viniferina (84%). El tratamiento por si solo tuvo poca influencia alcanzando valores significativos solo en *cis*-piceido, *trans*-resveratrol y en los estilbenos totales, pero con unos valores muy pequeños. En cambio la interacción tratamiento-añada mostró tener cierta importancia en parámetros como el *trans*-piceido, piceatanol, *cis*-piceido, *trans*-resveratrol y en el sumatorio total.

						Análisis multifactorial		
	Añada	Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value	T (%)	A(%)	TxA(%)
<i>trans-piceido</i>	2019	0,77 ± 0,10 b	1,20 ± 0,22 a	0,74 ± 0,14 b	*			
	2020	1,88 ± 0,30	1,34 ± 0,20	1,38 ± 0,06	ns	4	55	29
	2021	1,23 ± 0,21	1,04 ± 0,22	1,24 ± 0,14	ns	(ns)	(***)	(**)
Piceatanol	2019	0,23 ± 0,04	0,21 ± 0,05	0,15 ± 0,01	ns			
	2020	0,14 ± 0,06	0,08 ± 0,01	0,09 ± 0,01	ns	1	74	17
	2021	0,31 ± 0,02 b	0,34 ± 0,05 b	0,52 ± 0,04a	***	(ns)	(***)	(***)
<i>cis-piceido</i>	2019	0,73 ± 0,15	0,75 ± 0,11	0,68 ± 0,07	ns			
	2020	1,36 ± 0,17	1,39 ± 0,06	1,18 ± 0,05	ns	8	66	19
	2021	1,91 ± 0,14 a	1,07 ± 0,09 c	1,51 ± 0,09 b	***	(***)	(***)	(***)
<i>trans-resveratrol</i>	2019	1,99 ± 0,69c	6,35 ± 0,19 a	3,30 ± 0,14 b	***			
	2020	1,35 ± 0,15	1,2 ± 0,11	1,08 ± 0,06	ns	8	69	16
	2021	6,15 ± 0,95 b	8,20 ± 1,32 b	13,11 ± 1,36 a	**	(***)	(***)	(***)
ϵ -viniferina	2019	2,03 ± 0,25	2,42 ± 0,22	1,8 ± 0,64	ns			
	2020	1,13 ± 0,22 a	0,69 ± 0,20 ab	0,44 ± 0,03 b	*	1	84	9
	2021	3,91 ± 0,61 b	3,82 ± 0,54 b	5,64 ± 0,10 a	**	(ns)	(***)	(***)
Totales	2019	5,76 ± 0,92 b	10,93 ± 0,76 a	6,68 ± 0,43 b	**			
	2020	5,87 ± 0,90	4,7 ± 0,37	4,17 ± 0,06	ns	3	74	16
	2021	13,49 ± 1,78 b	14,47 ± 2,19 b	22,01 ± 1,56 a	**	(**)	(***)	(***)

Tabla 5.8. Concentración de estilbenos (mg/L) en vinos procedentes de uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. T: tratamiento; A: añada; TxA: interacción tratamiento-añada. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD ($p < 0,05$). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$), ns: no significativo.

5.3.5. PROANTOCIANIDINAS EN LOS HOLLEJOS Y SEMILLAS DE LAS UVAS

La **Tabla 5.9** muestra los valores encontrados para las PAs totales de hollejos y semillas obtenidas después del proceso de floroglucinosilisis, así como para los valores de gMP y el %Gal.

Como ya se comentó en el apartado 4.3.5, relativo al efecto de la urea en sus dos formas de aplicación, los valores obtenidos para PAs totales de las uvas control variaron notablemente según el año de estudio. Por otro lado el mayor gMP tanto en hollejos como en semillas se detectó en 2020 (**Tabla 5.9(A) y (B)**), debido al mayor grado de maduración obtenida ese año en la uva.

A		Hollejo			p-value
		Control	MeJ	Nano-MeJ	
2019	PAs Total	8627,35 ± 872,42	7841,29 ± 245,73	8311,03 ± 426,28	ns
	gMP	14,36 ± 1,76	11,78 ± 1,31	13,64 ± 0,77	ns
	%Gal	3,49 ± 0,26	2,78 ± 0,56	2,8 ± 0,18	ns
2020	PAs Total	10294,75 ± 792,39	9104,74 ± 892,06	9541,54 ± 443,67	ns
	gMP	17,27 ± 0,78 a	13,92 ± 0,72 b	13,98 ± 0,81 b	*
	%Gal	1,16 ± 0,14	1,23 ± 0,10	1,35 ± 0,16	ns
2021	PAs Total	6104,03 ± 763,55	7890,29 ± 1289,43	5707,59 ± 1396,39	ns
	gMP	14,14 ± 0,80	15,14 ± 1,42	16,29 ± 0,34	ns
	%Gal	1,41 ± 0,28	1,35 ± 0,15	1,44 ± 0,21	ns

B		Semilla			p-value
		Control	MeJ	Nano-MeJ	
2019	PAs Total	42682,29 ± 3366,48 a	37026,95 ± 684,43 a	30090,50 ± 2489,24 b	**
	gMP	5,69 ± 0,14 b	5,82 ± 0,17 b	6,74 ± 0,04 a	***
	%Gal	14,12 ± 0,35 b	14,93 ± 0,42 ab	15,72 ± 0,37 a	**
2020	PAs Total	15169,41 ± 2122,90	22078,12 ± 6223,07	23127,46 ± 4481,46	ns
	gMP	7,74 ± 0,49	7,64 ± 0,31	7,28 ± 0,25	ns
	%Gal	14,78 ± 0,08	14,8 ± 0,53	15,11 ± 0,25	ns
2021	PAs Total	27761,97 ± 1661,78 a	29332,08 ± 4394,04 a	21819,90 ± 1329,98 b	*
	gMP	6,62 ± 0,09	6,71 ± 0,15	6,96 ± 0,32	ns
	%Gal	13,15 ± 0,63	12,58 ± 0,34	12,96 ± 0,36	ns

Tabla 5.9. Concentración de proantocianidinas (PAs) totales, grado medio de polimerización (gMP) y % de galoilación (%Gal) tras reacción de floroglucinosilisis en (A) hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$ hollejo) y en (B) semillas ($\mu\text{g/g}$ semilla) de las uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$), ns: no significativo.

El porcentaje de galoilación (%Gal) en pieles (**Tabla 5.9(A)**) fue bastante mayor en 2019 que en las siguientes añadas, pudiendo deberse en parte al menor grado de maduración de este año, sin embargo aunque el %Gal correspondiente a las semillas (**Tabla 5.9(B)**) siempre es mayor que en pieles, apenas se vio modificado de una añada a otra.

Respecto al efecto de los tratamientos sobre el sumatorio total de PAs, observamos que el encontrado en los hollejos no fue significativo, aunque si pudimos observar cierta tendencia a obtener concentraciones inferiores con ambos tratamientos en los años 2019 y 2020. Sin embargo en el año 2021 se detectó un aumento en el tratamiento con MeJ y una disminución en el tratamiento con nano-MeJ pero sin llegar a ser ninguno de los dos significativos. En cuanto al efecto de los tratamientos sobre gMP de las PAs de las pieles (**Tabla 5.9(A)**), pudimos observar un descenso de este parámetro en los años 2019 y 2020 cuando se aplicaron tanto el MeJ como el nano-MeJ, siendo significativo solo en el segundo año, al contrario de lo que ocurrió en 2021, donde la tendencia fue a incrementarlo cuando se aplicaron ambos tratamientos. El %Gal de las PAs de la piel solo descendió en el año 2019 en ambos tratamientos sin llegar a ser significativo.

En las diferentes fracciones obtenidas tras la floroglucinolisis (**Figura 5.2(A)**), el efecto general encontrado en los hollejos, con poca afectación por parte de los tratamientos, se mantuvo. Así las únicas fracciones que vieron modificada su concentración fueron el aducto Cat-Ext en el año 2021, que mostró un incremento en el tratamiento con MeJ y una disminución en el de nano-MeJ. Por otro lado la Cat-T se vio incrementada el año 2020 por ambos tratamientos y finalmente el aducto Ep-3-O-g-Ext se vio disminuido el año 2019 por ambos tratamientos.

Por otro lado, en las semillas se encontraron diversos comportamientos dependiendo de la añada, así en el año 2019 se siguió la tendencia marcada en los hollejos con concentraciones inferiores en las PAs totales en las pepitas de las uvas tratadas con MeJ (aunque no llegaron a ser significativas) siendo este hecho más acusado en el tratamiento con nano-MeJ. En contraste, en el año 2020 se detectaron aumentos en ambos tratamientos pero de nuevo sin ser significativos. Finalmente en el año 2021 los valores encontrados en las semillas de las uvas tratadas siguieron un comportamiento similar al encontrado en las pieles, es decir un aumento no significativo en el tratamiento con MeJ y una menor

concentración en el tratamiento con nano-MeJ en comparación con las uvas control. El efecto encontrado sobre el gMP en las semillas (**Tabla 5.9(B)**) fue menor, tan solo en el año 2019 se registró un aumento en el tratamiento con nano-MeJ. Por otro lado, el %Gal solo se vio incrementado de forma importante en el nano-tratamiento en el año 2019.

En relación a los resultados encontrados para las distintas fracciones en las semillas (**Figura 5.2(B)**), pudimos observar que en el año 2020 cada una de las fracciones de PAs de las uvas procedentes de ambos tratamientos mostró un aumento, aunque ninguno de ellos de un modo significativo. Por otro lado, en los años 2019 y 2021 los resultados mostraron un comportamiento diferente, así en el año 2019 se detectaron concentraciones inferiores generalizadas en los tratamientos con MeJ y mucho más acusadas en los tratamientos con nano-MeJ cuando las comparamos con las obtenidas en el control, aunque en ocasiones no llegaron a ser significativos. Sin embargo en el año 2021 el tratamiento con MeJ apenas tuvo incidencia y el nano-MeJ siguió mostrando valores inferiores generalizados en todas las fracciones analizadas.

Similar a lo mostrado en nuestro estudio, los resultados encontrados por otros autores en tratamientos con MeJ son dispares, así Ruíz-García et al. (2012) en hollejos de Monastrell detectaron un incremento en la suma total de todas las fracciones de PAs durante dos años consecutivos de estudio, sin embargo el resultado encontrado en semillas fue distinto cada año, tan solo en una de las añadas se observaron esos incrementos. Por otro lado, los mismos autores en otro estudio sobre diferentes clones de Monastrell observaron que el comportamiento era diferente dependiendo del clon, detectando tanto incrementos como disminuciones en las PAs totales en los hollejos y semillas de las uvas tratadas (Ruíz-García et al., 2013). Otros autores como Gil-Muñoz et al. (2017c) en uvas de Monastrell y Tempranillo y tras tratamientos foliares con MeJ, detectaron diversos comportamientos dependiendo de la añada estudiada, de este modo en el año 2014 en Monastrell se encontró un incremento en el total de PAs en hollejos pero el contenido en las pepitas no se vio afectado, sin embargo en Tempranillo se detectó un menor valor respecto a las uvas control tanto en las PAs de la piel como de las de las semillas. En la siguiente añada, en Monastrell no se produjo modificación en la PAs procedente de las pieles, pero sí de las semillas que aumentaron; sin embargo en Tempranillo incrementaron tanto las procedentes de las pieles como de las semillas. Finalmente, Paladines-Quezada (2021) vio

que en general el tratamiento con MeJ no afectó a la cantidad de PAs totales ni en hollejos ni en semillas en su estudio durante dos añadas. En relación al gMP y %Gal, los resultados de otros autores mostraron una dependencia tanto de la añada como de la variedad en los valores obtenidos. De este modo Ruíz-García et al. (2012), en uvas de Monastrell tratadas con MeJ, solo registraron un incremento en el gMP de las pieles en una de las dos añadas estudiadas, por otro lado no encontraron cambio alguno en el valor correspondiente en las semillas, además los %Gal de pieles y semillas tampoco se vieron afectados. Gil-Muñoz et al. (2017c) en uvas de Tempranillo y Monastrell detectaron un comportamiento variado para el gMP y el %Gal de las PAs durante los dos años de estudio, tanto en el caso de los hollejos como de las semillas. Paladines-Quezada (2021) solo halló un descenso en una de las añadas estudiadas para el gMP de las pieles y para el %Gal los resultados fueron diferentes dependiendo de la añada y si se trataba de pieles o semillas.

Los estudios llevados a cabo con nanopartículas que contengan MeJ son mucho más escasos, tan solo está referenciado el estudio de Gil-Muñoz et al. (2023) que estudiaron el efecto de los tratamientos MeJ y nano-MeJ en la evolución en el contenido de diversos compuestos fenólicos durante la maduración de Monastrell, en este caso en los diferentes momentos de maduración se encontraron variaciones en la suma total de PAs de la piel dependiendo del tratamiento aplicado, aunque en el momento de vendimia no se hallaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con MeJ y nano-MeJ. Además, el gMP y el %Gal tampoco se vieron afectados por ninguno de los tratamientos aplicados en el momento de la vendimia.

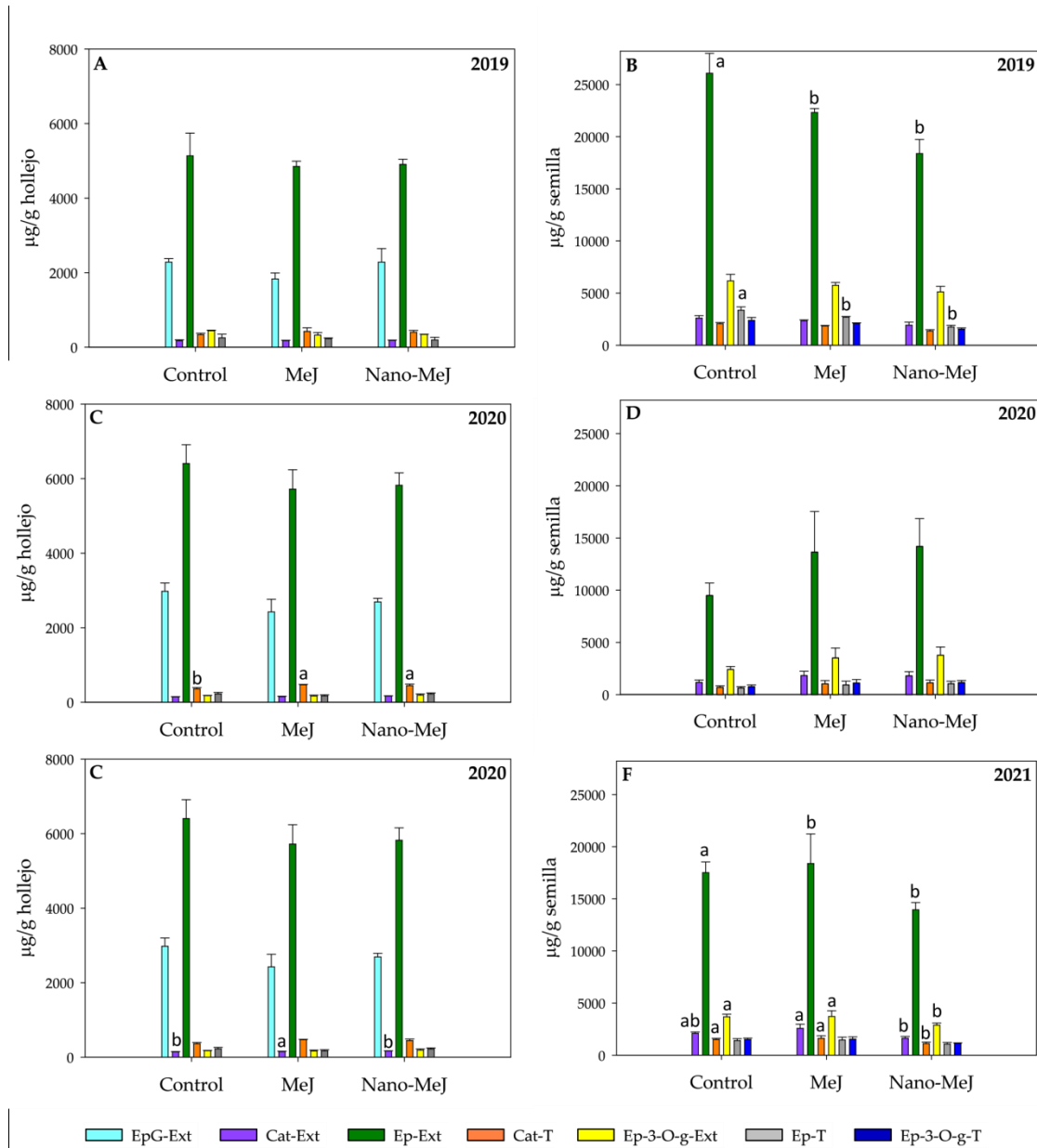


Figura 5.2. Concentración de las diferentes fracciones de proantocianidinas en (A, C, E) hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$ hollejo) y en (B, D, F) semillas ($\mu\text{g/g}$ semilla) en las uvas control y las tratadas con Mej y nano-Mej durante las campañas 2019, 2020 y 2021. EpG-Ext, (-)- epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-)-epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)-epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal. Las barras representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en el mismo grupo de barras indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD 95% ($p < 0,05$).

El análisis multifactorial mostrado en la **Tabla 5.10**, nos indicó la escasa influencia de los tratamientos tanto en las PAs de los hollejos como de las semillas, siendo la Cat-T de los hollejos junto con la Cat-Ext de las semillas las más afectadas por éstos con un 16% y 14% respectivamente. En cualquier caso la añada fue el factor determinante para los resultados de todas las fracciones analizadas. La interacción tratamiento-año tuvo algo de mayor incidencia en las semillas, llegando a alcanzar el 29% en el caso de la Cat-Ext. El gMP y el %Gal tampoco se vieron apenas afectados por los tratamientos, siendo de nuevo la añada el factor determinante

	Hollejos			Semillas		
	T (%)	A(%)	TxA(%)	T (%)	A(%)	TxA(%)
Total	0 ns	60***	16 ns	5*	64***	19**
EpG-Ext	3 ns	59***	14 ns	nd	nd	nd
Cat-Ext	3 ns	22***	13***	14*	35***	29**
Ep-Ext	0 ns	100***	0 ns	5*	63***	20**
Cat-T	16*	46***	9 ns	8*	56***	23**
Ep-3-O-g-Ext	2 ns	84***	7 ns	0 ns	100***	0 ns
Ep-T	2 ns	50***	15 ns	0 ns	100***	0 ns
Ep-3-O-g-T	nd	nd	nd	7*	64***	18**
gMP	12*	38***	25*	3 ns	71***	14**
%Gal	2 ns	83***	8**	6*	72***	9*

Tabla 5.10. Análisis multifactorial de las distintas fracciones de proantocianidinas (EpG-Ext, (-)-epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)-epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-)-epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)-epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal), grado medio de polimerización (gMP) y % de galoilación (%Gal) en hollejo y en semillas con los factores tratamiento (T), añada (A) y la interacción tratamiento y añada (TxA). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$), 95%* ($p < 0,05$) y ns, no significativo.

5.3.6. PROANTOCIANIDINAS EN VINOS

La **Tabla 5.11** muestra las concentraciones totales de PAs en los vinos control y en los elaborados a partir de uvas tratadas con MeJ y con nano-MeJ, así como los valores de gMP y el %Gal después de la fermentación alcohólica.

Como ya se comentó en el apartado 4.3.6, a pesar de las diferencias encontradas en las PAs en hollejos y semillas de las uvas control en los diferentes años de estudio, los valores encontrados en los correspondientes vinos no son tan dispares, no pudiéndose establecer una correlación entre el contenido en las uvas y el obtenido en los vinos.

De modo general las PAs totales no se vieron modificadas por los tratamientos, aunque en el año 2019 se observó una tendencia a incrementar en ambos tratamientos, aunque sin llegar a ser significativo. Respecto al gMP solo se observó un ligero descenso para el tratamiento con nano-MeJ en el año 2021. Por otro lado, el %Gal no se vio modificado en ningún caso. Un mayor %Gal provoca mayor amargor y astringencia en los vinos (Lesschaeve y Noble, 2005) por tanto nuestros vinos no se vieron afectados sensorialmente en ese aspecto, como luego se comprobó en la cata.

Añada		Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value
2019	PAs Total	428,01 ± 54,04	462,08 ± 19,63	463,87 ± 57,92	ns
	gMP	3,66 ± 0,13	3,45 ± 0,14	3,59 ± 0,09	ns
	%Gal	6,89 ± 2,43	6,37 ± 0,36	5,94 ± 0,25	ns
2020	PAs Total	498,92 ± 20,71	513,21 ± 65,41	462,56 ± 22,21	ns
	gMP	4,73 ± 0,37	4,39 ± 0,34	4,34 ± 0,07	ns
	%Gal	3,47 ± 0,23	3,24 ± 0,61	3,01 ± 0,08	ns
2021	PAs Total	513,55 ± 82,12	561,59 ± 31,32	503,25 ± 34,99	ns
	gMP	5,52 ± 0,05 b	5,78 ± 0,08 a	5,39 ± 0,11 b	**
	%Gal	3,34 ± 0,23	2,97 ± 0,19	3,17 ± 0,23	ns

Tabla 5.11. Concentración de proantocianidinas (PAs) totales (mg/L), grado medio de polimerización (gMP) y % de galoilación (%Gal) en vinos procedentes de las uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD ($p < 0.05$). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$), 95%* ($p < 0,05$), ns: no significativo.

En relación a las diferentes subunidades de las PAs (**Figura 5.3**) los tratamientos tuvieron un escaso impacto en las distintas fracciones de las PAs obtenidas en los vinos, tan solo se vio afectada la fracción de Ep-3-O-g-Ext con un incremento en el tratamiento con MeJ y solo en la añada de 2019.

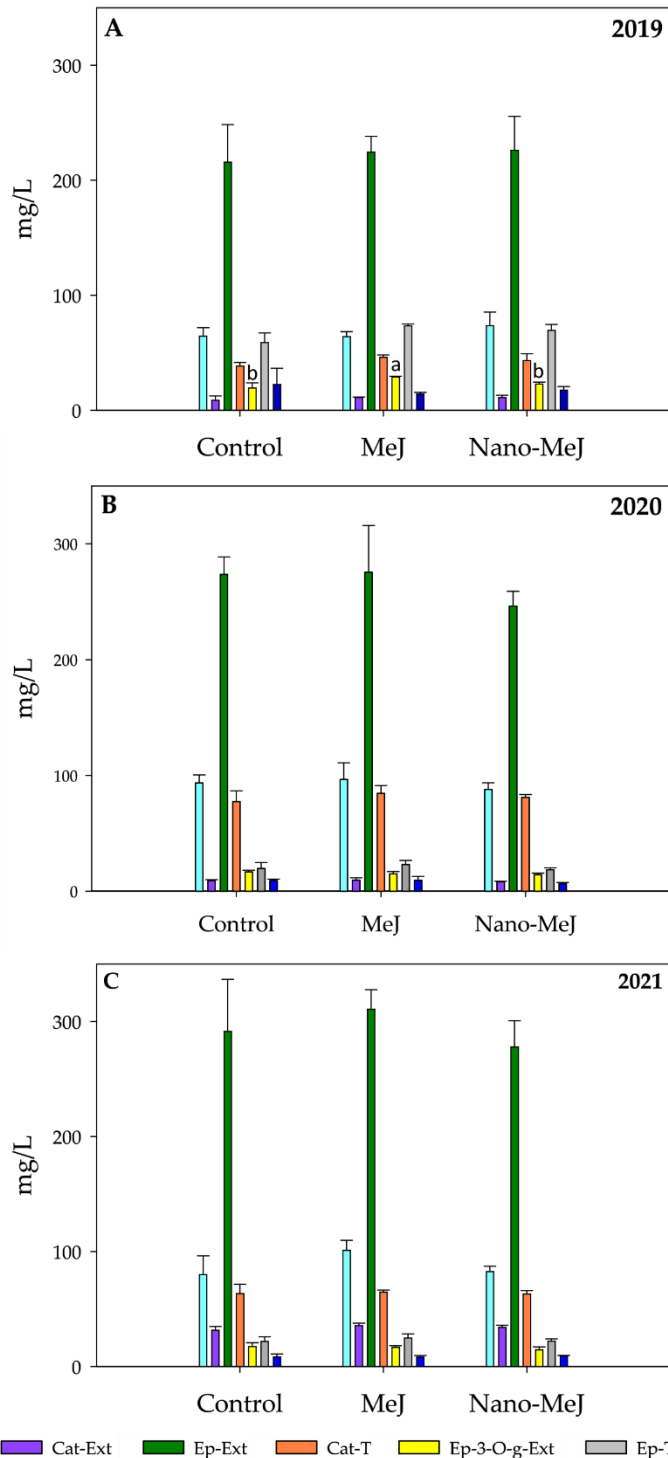


Figura 5.3. Concentración de las diferentes fracciones de proantocianidinas en vinos (mg/L) procedentes de uvas Monastrell control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas (A) 2019, (B) 2020 y (C) 2021 al final de la fermentación alcohólica. EpG-Ext, (-) epigalocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+) catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-) epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+) catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-) epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-) epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-) epicatequina-3-orto-galato terminal. Las barras representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD, 95%* ($p < 0,05$).

Los resultados encontrados por otros autores en vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ, al igual que en las uvas, son dispares, Ruiz-García et al. (2012) en su estudio en dos añadas consecutivas solo encontraron un incremento en una de ellas, Gil-Muñoz et al. (2017c) detectaron, dependiendo de la variedad y de la añada, efectos no significativos pero también incrementos y descensos en el contenido total de PAs. Finalmente, Paladines-Quezada (2021) encontró en vinos de Monastrell un aumento en el año 2016 y un descenso no significativo en la añada siguiente. En relación al gMP y el %Gal, diversos autores también han encontrado disparidad de comportamientos en estos dos parámetros dependiendo de la añada y también de la variedad (Paladines-Quezada, 2021; Gil-Muñoz et al. 2017c; Ruiz-García et al., 2012).

El análisis multifactorial (**Tabla 5.12**) llevado a cabo nos confirmó el escaso efecto de los tratamientos sobre el total y cada una de las fracciones de las PAs analizadas, aunque fue en el parámetro de PAs totales donde el % de la varianza explicada por el factor año fue menor (32%). Por otro lado, el factor determinante fue la añada en todos los casos estudiados, siendo los parámetros más afectados la Cat-Ext (97%), Ep-T (91%), Cat-T (90%). La interacción año-tratamiento tampoco mostró relevancia alguna. Finalmente en el caso de gMP y el %Gal fue la añada también el factor determinante explicando un % de varianza del 94% y 80% respectivamente.

Vino	Análisis multifactorial		
	T (%)	A(%)	TxA(%)
Total	9 ns	32*	7 ns
EpG-Ext	5 ns	54***	13 ns
Cat-Ext	1 ns	97***	0 ns
Ep-Ext	4 ns	57***	4 ns
Cat	2 ns	90***	1 ns
Ep-3-O-g-Ext	7*	59***	18**
Ep-T	1 ns	91***	1 ns
Ep-3-O-g	3 ns	49***	7 ns
gMP	1 ns	94***	2 ns
%Gal	2 ns	80***	1 ns

Tabla 5.12. Análisis multifactorial de las distintas fracciones de proantocianidinas (EpG-Ext, (-)-epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)-epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-)-epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)-epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal), grado medio de polimerización (gMP) y % de galoilación (%Gal) en vinos elaborados a partir de uvas control y las tratadas con MeJ y con nano-MeJ, T: tratamiento, A: añada y TxA: interacción tratamiento y añada. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$).

5.3.7. PARÁMETROS ESPECTROFOTOMÉTRICOS DE LOS VINOS

En la **Tabla 5.13** se recogen los principales parámetros espectrofotométricos de los vinos obtenidos a partir de las uvas control y las procedentes de los tratamientos al final de fermentación alcohólica.

Los parámetros espectrofotométricos de los vinos control mostraron diferencias en los distintos años estudiados, como ya se vio en el apartado 4.3.7. Respecto al IPT, el año 2019 mostró valores inferiores a 2020 y 2021. En cuanto a la IC, en el año 2021 se alcanzó la mayor intensidad. El tono apenas se modificó de un año para otro, aunque el año 2019 resultó algo inferior a las otras dos añadas.

En cuanto al efecto de los tratamientos, el IPT en el 2019 mostró un pequeño incremento en ambos tratamientos con MeJ (tanto en forma convencional como con las nanopartículas) aunque sin llegar a ser significativo. Sin embargo, en el año 2020 el tratamiento con MeJ mostró un aumento estadísticamente significativo en este parámetro, aunque éste no se alcanzó en los vinos elaborados con uvas tratadas con nano-MeJ. Finalmente, en el año 2021 solo observamos un pequeño descenso en el tratamiento con MeJ aunque no fue significativo. Otros autores mostraron resultados diferentes a los nuestros, así Ruiz-García et al. (2012) y Paladines-Quezada (2021) encontraron incrementos en el valor de IPT en vinos procedentes de uvas Monastrell tratadas con MeJ, al igual que Portú et al. (2015c) lo hizo en los vinos de la variedad Tempranillo, aunque en este último caso no de un modo significativo. Por otro lado Pérez-Álvarez et al. (2022a) en tratamientos con MeJ y nano-MeJ sobre Monastrell durante dos años consecutivos no detectó cambios en el IPT de sus vinos.

La IC se vio incrementada los años 2020 y 2021 en el tratamiento con MeJ aunque no de manera significativa. Esto coincide con el incremento en los antocianos observado en los vinos de estas añadas. Estos resultados son similares a los mostrados por Ruiz-García et al. (2012) y Portú et al. (2015) en vinos de uvas tratadas con MeJ de las variedades Monastrell y Tempranillo respectivamente. También Paladines-Quezada (2021) mostró resultados similares aunque este último solo encontró un incremento de la IC en una de las añadas estudiadas. Por otro lado, Pérez-Álvarez et al. (2022b) no observó cambios en vinos de Tempranillo procedentes de uvas tratadas con MeJ.

Respecto a los vinos obtenidos con las uvas tratadas con nano-MeJ, su comportamiento fue diferente al de los vinos elaborados con uvas tratadas con MeJ. Pudimos observar como en los años 2019 y 2020, el valor de IC fue inferior al obtenido en los vinos control y en el año 2021 no observamos ninguna diferencia con respecto al vino control. Este resultado coincide con lo mostrado por Pérez-Álvarez et al. (2022a) que observó un descenso para este parámetro en un estudio llevado a cabo durante dos añadas en uvas de Monastrell tratadas con nano-MeJ.

El tono no se vio modificado por ninguno de los tratamientos durante las tres añadas estudiadas, obteniendo valores muy similares en todos los casos. Estos resultados se corresponden con lo encontrado en los vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ por Portu et al. (2015c) en la variedad Tempranillo y por Paladines-Quezada (2021) en la variedad Monastrell, aunque este último autor solo para una de las añadas estudiadas, ya que en la otra detectó un descenso en este parámetro.

Atendiendo a los valores obtenidos de ΔE^* , pudimos observar que en el año 2019 ninguno de los vinos resultantes de los tratamientos mostraba un color diferenciable con respecto al vino control, puesto que los valores obtenidos estaban muy alejados de 3. Por lo tanto aunque en el vino procedente de uvas tratadas con nano-MeJ mostrara un valor inferior de IC en comparación con el vino procedente del tratamiento con MeJ, esta diferencia no era detectable para el ojo humano. En el año 2020, ambos tratamientos mostraron para este parámetro valores superiores a 3, por lo tanto si comparamos ambos vinos con el vino control seríamos capaces de diferenciar el color de los vinos tratados con respecto a éste, aunque de forma más notoria en el caso del vino procedente del tratamiento con MeJ. Sin embargo en el año 2021 solo se alcanzó un valor diferenciador para el tratamiento con MeJ.

Parámetros espectrofotométricos					
	Añada	Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value
IPT	2019	39,11 ± 1,05	41,85 ± 0,97	41,32 ± 2,71	ns
	2020	47,88 ± 1,76 b	53,75 ± 0,96 a	44,89 ± 2,91 b	**
	2021	47,24 ± 2,45	45,52 ± 3,81	47,81 ± 0,71	ns
IC	2019	14,01 ± 1,03	14,01 ± 0,81	12,94 ± 0,67	ns
	2020	14,14 ± 0,85	15,55 ± 3,52	12,43 ± 0,90	ns
	2021	16,36 ± 1,47	18,29 ± 0,88	16,59 ± 0,48	ns
Tono	2019	0,42 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,44 ± 0,01	ns
	2020	0,47 ± 0,01	0,49 ± 0,06	0,49 ± 0,01	ns
	2021	0,46 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,44 ± 0,01	ns
ΔE^*	2019		2,08 ± 1,57	1,93 ± 1,85	ns
	2020		5,45 ± 2,46	4,02 ± 1,96	ns
	2021		4,25 ± 2,53	1,34 ± 0,58	ns

Tabla 5.13. Parámetros espectrofotométricos de los vinos procedentes de las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019,2020 y 2021. Abreviaturas: IPT, índice de polifenoles totales; IC, intensidad de color; ΔE^* , medida de la diferencia de color calculada a partir de parámetros CIELab. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$); ns, no significativo.

5.4. COMPOSICIÓN NITROGENADA DE LAS UVAS Y DE LOS VINOS

5.4.1. COMPOSICIÓN NITROGENADA EN UVAS

En la **Tabla 5.14** se muestran los valores obtenidos en el mosto de las uvas control y las tratadas con MeJ y nano-MeJ, durante los tres años estudiados.

Como puede observarse, las concentraciones de cada uno de los aminoácidos y del ión NH_4^+ variaron según el año de estudio. El año en el que hubo una mayor síntesis de compuestos nitrogenados fue en el año 2020, seguido del año 2021 y del 2019, al igual como ocurrió con los tratamientos con urea (apartado 4.4.1).

En relación al efecto de los tratamientos, se mostró una tendencia general al incremento del contenido de compuestos nitrogenados con ambos tratamientos, siendo más acusado en los tratamientos con MeJ. Particularmente en el año 2019 el efecto de ambos fue mayor, con un incremento en el total de compuestos nitrogenados del 172% en el caso de las uvas tratadas con MeJ y del 88% para las tratadas con nano-MeJ. Este año solo la α -Ala y la Tyr en el tratamiento con nano-MeJ no se vieron afectadas, en cambio la Cys mostró valores inferiores en ambos tratamientos al ser comparadas con las uvas control.

La siguiente añada fue un poco más dispar, durante este año pudimos observar un aumento en el total de aminoácidos, del 35% en las uvas tratadas con MeJ y del 20% en las tratadas con nano-MeJ. Sin embargo algunos de los aminoácidos no se vieron modificados por ninguno de los tratamientos: Asp, Gly, Thr, Val, Leu y Phe. Por otro lado se vieron incrementados con MeJ pero no con nano-MeJ los siguientes aminoácidos: Gln, His, Trp, Orn y Lys, estos dos últimos incluso mostraron concentraciones inferiores en el tratamiento con nano-MeJ en comparación con las uvas control. Finalmente la Iso no se vio afectada por el MeJ pero si aumentó su concentración con el tratamiento con nano-MeJ; además la concentración en Cys también fue inferior en ambos tratamientos al igual que ocurrió en 2019 al compararlas con la uva control.

En el año 2021 se mostró mucha mayor incidencia del tratamiento con MeJ, con un ascenso del 121% en el total de los compuestos nitrogenados frente al 24% en los mostos procedentes de las uvas tratadas con nano-MeJ. Todos los compuestos se vieron incrementados por MeJ salvo Met. Con respecto al tratamiento nano-MeJ solo observamos un incremento en los siguientes aminoácidos: Gly, Arg+GABA, α -Ala, Tyr y Lys y en el NH_4^+ . Finalmente ninguno de los tratamientos afectó a la Met y la Cys que volvió a mostrar concentraciones inferiores tanto con el MeJ como con el nano-MeJ, tal como habíamos observado en las añadas anteriores.

Los resultados obtenidos por otros investigadores no siempre mostraron un incremento en la concentración de aminoácidos, así en uvas de Tempranillo tratadas con MeJ Gutiérrez-Gamboa et al. (2017a) solo detectaron aumentos en Met y Phe. En otro estudio de los mismos autores en la variedad Garnacha todos los aminoácidos mostraron concentraciones inferiores al control en las uvas tratadas con MeJ (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018b). Por otro lado, Garde-Cerdán et al. (2022) sobre uvas de Monastrell y Tempranillo estudiadas durante dos añadas detectaron diversos comportamientos, así en la variedad Tempranillo incrementaron las concentraciones de Met, Phe y Pro una de las añadas y en la siguiente solo Hys, en Monastrell solo en una de las añadas estudiadas se aumentaron Cys y Trp. Otro estudio más reciente en el que se aplicaron tratamientos foliares de nano-MeJ sobre Monastrell y en diferentes condiciones de riego llevado a cabo por Pérez-Álvarez et al., (2022a) obtuvo un escaso efecto sobre la cantidad de compuestos nitrogenados analizados, encontrando que las variables más determinantes

fueron el año y el régimen de riego. Además, el estudio de la aplicación foliar de MeJ y nano-MeJ sobre Tempranillo llevado a cabo por Garde-Cerdán et al. (2023b) obtuvo un ascenso general de los aminoácidos en ambos tratamientos en el año 2019, sin embargo en el año 2020 se detectó un descenso también en ambos aunque sin llegar a ser significativo. Finalmente, los resultados aquí mostrados complementan y reafirman los ya publicados por nuestro grupo en el año 2021 (Gil-Muñoz et al., 2021).

Con los resultados obtenidos podemos concluir que la aplicación de tratamientos con MeJ y nano-MeJ podría ayudar a un incremento en la cantidad de N de los mostos, lo que podría facilitar un adecuado desarrollo de las fermentaciones alcohólicas. A pesar de los buenos resultados obtenidos en el caso del mosto procedente de uvas tratadas con MeJ, cabe destacar el hecho de que los resultados obtenidos con nano-MeJ, aun siendo algo inferiores a los obtenidos con MeJ son adecuados para mejorar la cantidad de N de los mostos y para optimizar esas fermentaciones, empleando para ello una concentración 10 veces inferior al tratamiento convencional cuando se aplica en el campo.

	2019				2020				2021			
	Control	MeJ	Nano-MeJ	p	Control	MeJ	Nano-MeJ	p	Control	MeJ	Nano-MeJ	p
Asp	27,6 ± 0,3 c	38,7 ± 1,0 a	33,3 ± 1,6 b	***	10,2 ± 0,5	11,3 ± 0,5	10,7 ± 0,6	ns	7,7 ± 0,1 b	11,2 ± 0,0 a	6,5 ± 0,2 c	***
Glu	33,3 ± 0,7 b	43,4 ± 1,3 a	45,4 ± 2,6 a	***	13,1 ± 0,6 c	21,8 ± 0,8 a	16,6 ± 0,4 b	***	10,7 ± 0,3 b	21,8 ± 0,2 a	11,1 ± 0,5 b	***
Asn+Ser	42,3 ± 3,5 c	106,7 ± 3,1 a	77,5 ± 4,2 b	***	91,0 ± 6,0 b	114,1 ± 6,8 a	114,1 ± 5,9 a	**	55,1 ± 2,2 b	100,6 ± 4,1 a	55,7 ± 4,3 b	***
Gln	53,6 ± 4,9 c	148,3 ± 7,1 a	127,8 ± 7,2 b	***	198,5 ± 112,9 b	280,9 ± 19,2 a	213,0 ± 14,0 b	**	68,8 ± 3,2 b	151,8 ± 12,0 a	78,1 ± 6,5 b	***
His	13,1 ± 0,6 c	46,3 ± 2,4 a	32,0 ± 2,3 b	***	69,7 ± 6,2 b	95,1 ± 8,6 a	75,3 ± 6,3 b	*	17,4 ± 1,0 c	47,4 ± 2,9 a	23,0 ± 1,6 b	***
Gly	6,0 ± 0,3 c	10,3 ± 0,7 a	7,5 ± 0,2 b	***	12,3 ± 0,6	13,8 ± 0,4	13,8 ± 1,0	ns	6,9 ± 0,1 c	11,8 ± 0,2 a	7,6 ± 0,2 b	***
Thr	14,9 ± 1,2 c	42,5 ± 2,0 a	27,7 ± 1,8 b	***	43,1 ± 3,3	47,9 ± 2,8	44,4 ± 3,7	ns	19,6 ± 1,2 b	41,7 ± 2,0 a	20,0 ± 1,6 b	***
β-Ala	10,5 ± 0,8 c	30,3 ± 1,4 a	19,7 ± 1,3 b	***	28,9 ± 4,3 b	39,6 ± 3,3 a	37,7 ± 2,4 a	*	13,9 ± 0,8 b	29,8 ± 1,4 a	14,2 ± 1,1 b	***
Arg+GABA	42,5 ± 3,9 c	275,4 ± 11,4 a	188,4 ± 11,5 b	***	213,8 ± 20,2 c	354,4 ± 26,2 a	301,5 ± 21,1 b	***	95,6 ± 4,5 c	387,3 ± 19,7 a	186,3 ± 18,1 b	***
α-Ala	21,5 ± 1,1 b	27,6 ± 3,7 a	20,4 ± 1,0 b	*	23,8 ± 1,0 b	30,7 ± 1,6 a	30,0 ± 1,0 a	***	31,2 ± 0,8 c	63,1 ± 2,2 b	69,0 ± 2,7 a	***
Pro	199,3 ± 8,4 c	564,2 ± 10,2 a	335,0 ± 16,7 b	***	345,9 ± 14,5 b	449,6 ± 23,8 a	439,2 ± 15,3 a	***	216,2 ± 7,2 b	397,3 ± 108,0 a	234,6 ± 22,3 b	*
NH₄⁺	14,9 ± 0,8 c	33,0 ± 3,0 a	23,9 ± 2,0 b	***	21,6 ± 1,1 b	27,3 ± 0,6 a	25,1 ± 1,8 a	**	9,6 ± 0,3 c	17,6 ± 0,5 b	19,9 ± 1,4 a	***
Tyr	7,0 ± 0,5 b	11,9 ± 2,0 a	9,2 ± 0,6 b	**	26,1 ± 0,8 b	37,8 ± 2,0 a	37,1 ± 3,1 a	***	7,23 ± 0,4 c	20,7 ± 0,6 a	10,5 ± 1,0 b	***
Val	8,9 ± 0,4 c	20,4 ± 0,9 a	14,6 ± 0,7 b	***	33,6 ± 2,1	34,4 ± 1,9	37,1 ± 2,1	ns	15,0 ± 0,3 b	27,2 ± 0,9 a	15,6 ± 1,3 b	***
Met	2,8 ± 0,3 b	4,1 ± 0,1 a	3,4 ± 0,5 b	*	4,8 ± 0,7 b	5,5 ± 0,3 ab	6,3 ± 0,4 a	*	1,9 ± 0,1	2,0 ± 0,0	1,9 ± 0,1	ns
Cys	10,4 ± 1,8 a	7,8 ± 0,7 ab	6,8 ± 1,3 b	*	13,2 ± 2,1 a	9,9 ± 0,2 b	9,0 ± 0,3 b	*	12,3 ± 1,0 a	5,6 ± 0,1 b	4,7 ± 0,3 b	***
Iso	6,5 ± 0,1 c	11,0 ± 0,3 a	8,4 ± 0,6 b	***	15,1 ± 1,1 b	15,0 ± 0,8 b	17,5 ± 0,9 a	*	12,3 ± 0,7 b	14,6 ± 0,7 a	9,6 ± 0,4 c	***
Leu	8,1 ± 0,4 c	16,6 ± 0,9 a	12,1 ± 0,8 b	***	24,8 ± 1,7	25,1 ± 1,0	27,2 ± 1,6	ns	14,3 ± 0,9 b	21,0 ± 1,1 a	14,2 ± 0,6 b	***
Trp	20,3 ± 1,4 c	47,8 ± 1,4 a	35,2 ± 1,8 b	***	59,3 ± 5,8 b	80,1 ± 7,0a	54,4 ± 4,0 b	**	29,7 ± 1,0 b	60,6 ± 4,1 a	21,9 ± 1,6 c	***
Phe	5,3 ± 0,2 c	13,2 ± 0,6 a	9,8 ± 0,7 b	***	17,3 ± 2,7	17,2 ± 1,3	18,9 ± 1,3	ns	9,2 ± 0,6 b	15,2 ± 1,2 a	7,7 ± 0,5 b	***
Orn	2,1 ± 0,1 c	2,9 ± 0,1 a	2,6 ± 0,1 b	***	2,6 ± 0,1 b	3,3 ± 0,1 a	2,1 ± 0,1 c	***	2,2 ± 0,6	2,9 ± 0,1	1,9 ± 0,0	ns
Lys	2,66 ± 0,1 c	4,4 ± 0,4 a	3,2 ± 0,1 b	***	3,4 ± 0,1 b	4,2 ± 0,0 a	2,9 ± 0,3 c	***	2,6 ± 0,2 b	4,2 ± 0,2 a	4,0 ± 0,3 a	***
Total	553,6 ± 19,7 c	1506,7 ± 25,2 a	1043,6 ± 54,3 b	***	1271,9 ± 64,1 c	1718,8 ± 106,6 a	1533,9 ± 69,7 b	**	659,3 ± 23,1 c	1455,2 ± 54,3 a	818,1 ± 10,6 b	***
Total-Pro	354,3 ± 16,6 c	942,5 ± 24,1 a	708,6 ± 38,6 b	***	926,0 ± 60,0 c	1269,2 ± 84,4 a	1094,8 ± 66,8 b	**	443,1 ± 16,1 c	1058,0 ± 53,8 a	583,4 ± 32,9 b	***
N¹	88,5 ± 3,3 c	250,7 ± 2,9 a	175,51 ± 8,66 b	***	216,0 ± 11,1 c	296,6 ± 18,5 a	260,1 ± 11,4 b	**	105,8 ± 3,7 c	245,3 ± 3,1 a	142,0 ± 2,7 b	***
N (sin Pro)	64,3 ± 2,8 c	182,1 ± 2,8 a	134,8 ± 6,7 b	***	174 ± 10,6 c	242,0 ± 15,9 a	206,7 ± 11,1 b	**	79,5 ± 2,9 c	197,0 ± 10,0 a	113,5 ± 5,4 b	***

Tabla 5.14. Contenido individual de aminoácidos y de NH₄⁺ (mg/L) en los mostos de Monastrell procedentes de las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ, durante las campañas 2019, 2020 y 2021. ¹ Contenido en N calculado a partir de la concentración de cada compuesto nitrogenado. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05), ns: no significativo.

El análisis multifactorial (**Tabla 5.15**) mostró que los tratamientos tuvieron diferente incidencia en la variabilidad experimentada en los resultados dependiendo del compuesto analizado. El efecto de los tratamientos fue bastante importante, en algunos casos superior al efecto de la añada como en el caso de los siguientes aminoácidos: Arg+GABA, Pro, Orn, Cys y Lys. Es destacable que el efecto del tratamiento sobre Arg+GABA (70%) fue superior al efecto sobre la Pro (53%). Por otro lado Asp, Glu, Tyr, Val, Met, Iso y Leu apenas se vieron afectados por los tratamientos, siendo en estos casos la añada el factor determinante. En cuanto a la interacción tratamiento-añada, en algunos casos apenas tuvo peso (Asp, Glu, Gln, Gly, β -Ala, Arg+GABA, Tyr, Val, Met, Cys, Leu, Trp) sin embargo para otros compuestos tuvo una cierta relevancia, destacando Lys (24%), α -Ala (19%) y Pro (18%).

Análisis multifactorial			
	T (%)	A (%)	TxA (%)
Asp	3***	92***	3***
Glu	10***	83***	3***
Asn+Ser	45***	36***	13***
Gln	23***	68***	3***
His	19***	75***	1
Gly	24***	65***	7***
Thr	36***	44***	13***
β-Ala	35***	51***	6***
Arg+GABA	70***	23***	8***
α-Ala	18***	66***	19***
Pro	53***	19***	18***
NH₄⁺	43***	34***	14***
Tyr	11***	82***	3***
Val	11***	79***	7***
Met	4**	85***	5**
Cys	63***	21***	8*
Iso	7***	74***	17***
Leu	10***	79***	8***
Trp	38***	50***	7***
Phe	16***	62***	16***
Orn	55***	9*	17**
Lys	66***	1	24***
Total	53***	35***	7***
Total-Pro	49***	45***	5***

Tabla 5.15. Análisis multifactorial de los compuestos nitrogenados en uvas con los factores tratamiento (T), añada (A) y la interacción tratamiento-añada (TxA). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$).

5.4.2. COMPOSICIÓN NITROGENADA EN VINOS

La **Tabla 5.16**, muestra la composición nitrogenada de los vinos procedentes de las uvas control y de las tratadas con MeJ y nano-MeJ. En todos los caso la Pro fue el aminoácido mayoritario, representando el 59% en 2019, el 82% en el 2020 y el 57% en el 2021 en los vinos control, lo que significa un incremento importante del porcentaje en Pro respecto al encontrado en sus mostos, que en ningún caso excedió del 37%.

En general el contenido en compuestos nitrogenados presentes en el mosto desciende en el vino, debido al consumo de los mismos por parte de las levaduras durante la fermentación alcohólica. Sin embargo, en nuestros resultados pudimos observar que los aminoácidos Met, Gly y Orn apenas cambiaron en su concentración durante los diferentes años de estudio, así en el caso de la Orn incluso la incrementó ligeramente en el 2020. Otros en cambio como la Lys mostraron una tendencia a incrementar en el vino. En el caso de la Pro su variación en el vino respecto al contenido en el mosto dependió del YAN disponible, así en 2020 cuando los mostos presentaron niveles altos de YAN el contenido en Pro en los vinos incrementó debido a que la Pro es uno de los principales aminoácidos producidos durante la fermentación alcohólica, probablemente relacionado con la autólisis de las levaduras (Garde-Cerdán et al., 2011). Por otro lado, cuando el YAN de los mostos fue bajo se produjeron disminuciones en la cantidad de Pro en el vino respecto a la presente en los mostos, en el control los años 2019 (48%) y 2021 (56%) por lo que es posible que las levaduras tuvieran que recurrir a utilizar parte de la Pro para poder completar la fermentación alcohólica. Este hecho ya fue reportado por Arias-Gil et al. (2007) al detectar un mayor consumo de Pro por parte de las levaduras cuando el mosto tenía una composición escasa en el resto de aminoácidos. Finalmente, el año 2020 destacó por tener un mayor contenido de compuestos nitrogenados en los vinos, lo que corresponde al mayor contenido encontrado en las uvas de ese año. En líneas generales podemos decir que en los incrementos encontrados en las uvas se mantuvieron e incluso se potenciaron en los vinos control.

	2019				2020				2021			
	Control	Urea	Nano-Urea	p	Control	Urea	Nano-Urea	p	Control	Urea	Nano-Urea	p
Asp	2,06 ± 0,15 b	3,99 ± 0,25 a	3,55 ± 0,37 a	***	3,26 ± 0,13	5,21 ± 0,40 a	4,11 ± 0,28 b	**	4,89 ± 0,27 a	3,80 ± 0,39 b	2,46 ± 0,03 c	***
Glu	4,12 ± 0,64 b	9,78 ± 1,12 a	8,34 ± 0,67 a	***	9,41 ± 2,83	18,79 ± 1,54 a	12,42 ± 2,41 b	*	2,94 ± 0,21 a	2,94 ± 0,12 a	2,28 ± 0,18 b	**
Asn+Ser	1,26 ± 0,19 c	5,90 ± 0,43 a	3,77 ± 0,66 b	***	6,44 ± 1,43 b	10,73 ± 0,98 a	8,68 ± 0,94 ab	*	7,28 ± 0,45 b	11,69 ± 0,91 a	8,32 ± 0,33 b	***
Gln	2,23 ± 0,17 b	7,15 ± 1,29 a	5,77 ± 1,00 a	**	5,68 ± 0,74 b	8,35 ± 0,05 a	7,35 ± 0,41 a	**	2,58 ± 0,50 c	5,67 ± 1,07 a	4,20 ± 0,43 b	**
His	3,37 ± 0,11 b	4,82 ± 0,52 a	4,58 ± 0,31 a	**	5,64 ± 0,82	7,90 ± 1,42	5,90 ± 0,56	ns	4,25 ± 0,19 b	10,41 ± 1,78 a	5,10 ± 0,42 b	***
Gly	4,55 ± 0,08 b	6,64 ± 0,34 a	6,10 ± 0,35 a	***	7,66 ± 1,03 b	11,14 ± 0,63 a	9,30 ± 0,76 ab	*	4,58 ± 0,16 c	6,81 ± 0,62 a	5,37 ± 0,13 b	**
Thr	3,40 ± 0,14 b	3,77 ± 0,11 a	3,77 ± 0,19 a	*	4,19 ± 0,22 b	5,16 ± 0,03 a	4,42 ± 0,22 b	**	2,91 ± 0,13 b	3,83 ± 0,15 a	3,18 ± 0,18 b	***
β-Ala	2,37 ± 0,03 b	2,81 ± 0,19 a	2,78 ± 0,08 a	**	3,64 ± 0,78	4,53 ± 0,16	3,56 ± 0,35	ns	2,04 ± 0,11 b	2,37 ± 0,16 a	1,99 ± 0,08 b	*
Arg	4,29 ± 0,29 c	7,43 ± 0,17 a	6,34 ± 0,81 b	***	10,82 ± 2,68 b	21,67 ± 1,70 a	15,34 ± 1,34 b	**	2,90 ± 0,12 b	7,40 ± 1,49 a	4,49 ± 0,33 b	**
GABA	4,75 ± 0,21 c	10,78 ± 0,63 a	8,807 ± 1,43 b	***	15,42 ± 3,95 b	27,21 ± 2,48 a	19,80 ± 2,32 b	*	3,33 ± 0,43 c	11,37 ± 2,17 a	7,34 ± 0,39 b	***
α-Ala	2,18 ± 0,04 c	4,28 ± 0,24 a	3,40 ± 0,42 b	***	5,49 ± 0,93 c	9,88 ± 0,81 a	7,15 ± 0,58 b	**	1,30 ± 0,17 c	4,42 ± 0,84 a	2,86 ± 0,15 b	***
Pro	102,73±35,67b	466,05±55,34a	358,23±94,56a	**	564,93±88,04ab	1109,85±156,96a	893,12±130,45a	*	94,8 ±26,79b	599,45±112,49a	239,95±46,13b	***
NH₄⁺	2,52 ± 0,13	2,72 ± 0,13	2,91 ± 0,24	ns	4,08 ± 1,15 b	8,47 ± 0,10 a	5,56 ± 0,74 b	**	3,17 ± 0,28 a	3,81 ± 0,18 a	2,97 ± 0,20 b	**
Tyr	3,18 ± 0,35 b	4,71 ± 0,55 a	4,77 ± 0,14 a	**	5,36 ± 0,30 c	9,27 ± 0,03 a	6,03 ± 0,40 b	***	2,64 ± 0,14	3,02 ± 0,18	3,10 ± 0,25	ns
Val	2,56 ± 0,07	2,91 ± 0,22	2,74 ± 0,14	ns	2,86 ± 0,13 b	3,82 ± 0,50 a	3,26 ± 0,07 ab	*	2,40 ± 0,21 b	2,78 ± 0,12 a	2,12 ± 0,21 b	*
Met	2,67 ± 0,37	3,07 ± 0,19	3,09 ± 0,20	ns	3,12 ± 0,25	3,66 ± 0,47	3,34 ± 0,13	ns	2,19 ± 0,13 a	1,90 ± 0,03 b	1,56 ± 0,04 c	***
Cys	3,18 ± 0,06	3,19 ± 0,40	3,33 ± 0,24	ns	4,61 ± 0,62	4,2 ± 0,6	4,0 ± 0,4	ns	5,58 ± 0,20 a	4,65 ± 0,48 b	3,87 ± 0,39 c	**
Iso	3,62 ± 0,17 b	4,38 ± 0,20 a	4,11 ± 0,32 a	*	4,72 ± 0,37	5,46 ± 0,46	4,71 ± 0,47	ns	2,61 ± 0,09 b	2,92 ± 0,11 a	2,49 ± 0,04 b	**
Leu	3,90 ± 0,10 b	4,93 ± 0,05 a	4,81 ± 0,28 a	***	5,25 ± 0,56 b	7,63 ± 0,43 a	5,74 ± 0,32 b	**	3,73 ± 0,12 c	4,83 ± 0,07 a	4,19 ± 0,02 b	***
Trp	4,03 ± 0,09 b	4,77 ± 0,22 a	4,69 ± 0,40 a	*	4,97 ± 0,21 c	6,52 ± 0,16 a	5,81 ± 0,14 b	***	3,54 ± 0,28 b	4,42 ± 0,15 a	3,51 ± 0,04 b	**
Phe	2,7 ± 0,28 b	3,89 ± 0,06 a	3,69 ± 0,30 a	**	3,74 ± 0,24 b	6,07 ± 0,70 a	4,22 ± 0,25 b	**	2,18 ± 0,22 b	3,07 ± 0,09 a	2,28 ± 0,07 b	***
Orn	1,97 ± 0,05 b	2,47 ± 0,08 a	2,27 ± 0,19 a	**	3,11 ± 0,32 b	4,61 ± 0,13 a	3,54 ± 0,29 b	**	1,48 ± 0,02 b	1,69 ± 0,09a	1,50 ± 0,03b	**
Lys	4,25 ± 1,29 b	7,58 ± 0,49 a	6,23 ± 1,00 a	*	8,64 ± 2,71 b	16,04 ± 3,03 a	9,30 ± 0,89 b	*	2,68 ± 0,35 c	7,07 ± 0,83 a	5,14 ± 0,53 b	***
Total	171,90±38,69b	578,02±58,36a	458,04±102,38a	**	693,04±108,50ab	1316,18±172,23a	1046,71±142,22a	*	166,03±27,28b	710,31±121,11a	320,26±47,70b	***

Tabla 5.16. Contenido individual de aminoácidos y de NH₄⁺ (mg/L) en los vinos de Monastrell procedentes de las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ, durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test de LSD. Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** (p < 0,001), 99%** (p < 0,01) y 95%* (p < 0,05), ns: no significativo.

Con respecto a los vinos procedentes de uvas tratadas, tal como ocurría en las uvas, pudimos detectar un incremento muy considerable de los aminoácidos totales en ambos tratamientos en comparación con lo obtenido en los vinos control. Asimismo, también detectamos un importante incremento en el porcentaje de Pro en las añadas 2019 y 2021 respecto al control, pasando de ser del orden de un 60% para el control a llegar a alcanzar el 81% y 84% para el vino procedente del tratamiento con MeJ y el 78% y 75% para el de nano-MeJ, respectivamente. Sin embargo en el año 2020, donde en el vino control la Pro suponía un 82% apenas se vio afectado por los tratamientos alcanzando el 84% para MeJ y el 85% para nano-MeJ.

En el año 2019 los únicos compuestos que no se vieron afectados por los tratamientos fueron NH_4^+ , Val, Met y Cys, el resto de aminoácidos se incrementaron en ambos. En el año 2020, en los vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ se produjo un incremento en todos los compuestos nitrogenados salvo en His, β -Ala, Met, Cys e Iso, por otro lado en los vinos procedentes de uvas tratadas con nano-MeJ el impacto producido fue algo menor, hubo una mayoría de compuestos no afectados y por otro lado sí que se pudimos observar un aumento en Asp, Glu, Asn+Ser, Gln, α -Ala, Pro, Tyr, Val y Trp. Finalmente en el año 2021, todos los compuestos se vieron incrementados en los vinos procedentes del tratamiento con MeJ salvo Glu que no se vio modificado y Asp, Met y Cys que mostraron concentraciones inferiores a las obtenidas en el vino control. En el caso del tratamiento con nano-MeJ se detectaron incrementos en Gln, Gly, GABA, α -Ala, Pro, Leu y Lys, pero sin embargo aminoácidos como Asp, Glu y Met descendieron en sus concentraciones.

Los resultados mostrados por Pérez-Álvarez et al. (2022b) con tratamientos de MeJ y Nano-MeJ sobre viñedos de Tempranillo fueron diferentes en las dos añadas estudiadas, en el 2019 el tratamiento con MeJ aumentó de manera general el contenido en compuestos nitrogenados, el efecto del tratamiento con nano-MeJ fue algo inferior ya que se registraron incrementos pero sin llegar a ser significativos; por otro lado en el año 2020 ambos tratamientos provocaron un descenso general del contenido en compuestos nitrogenados. Además los resultados mostrados incluyendo un año más de estudio vienen a confirmar los que ya fueron publicados por nuestro grupo en 2021 (Gil-Muñoz et al., 2021).

Es conocido que vinos con una mayor concentración de compuestos nitrogenados pueden llegar a desarrollar compuestos tóxicos como son el etil carbamato y las aminas biógenas (Lonvaud-Funel, 2016) por lo que en casos en los que se parte de uvas con un alto contenido en compuestos nitrogenados, como es el caso del año 2020, puede no ser acertado un tratamiento que pueda provocar un incremento de los mismos. A la vista de nuestros resultados, quizás la aplicación de los tratamientos con nano-MeJ sería más aconsejable ya que en las uvas provocó un aumento de los compuestos nitrogenados que resultó suficiente para llevar a cabo una fermentación adecuada. Por otro lado, el aumento resultante en los vinos, al ser más moderado podría ayudar a evitar en el futuro la producción de productos indeseables.

Por otro lado se realizó un estudio multifactorial tal como se muestra en la **Tabla 5.17**. Para la suma total de compuestos nitrogenados pudimos observar como el factor más influyente fue la añada, cosa que no ocurrió en el mosto, seguramente debido al alto porcentaje aportado por la Pro (62%). Además, el factor añada fue en líneas generales el más determinante para la mayoría de los compuestos nitrogenados analizados. Aun así, en ciertos compuestos como Asp, Glu, Gln, His, Gly, α -Ala, Tyr, Val, Met e Iso el factor que más contribuyó a la variabilidad de los resultados obtenidos fue el tratamiento. Finalmente, solo en la Asp se obtuvo un mayor porcentaje para la interacción tratamiento-año.

Análisis multifactorial			
	T (%)	A(%)	TxA(%)
Asp	20***	17***	63***
Glu	17***	77***	11***
Asn+Ser	32***	64***	1
Gln	51***	36***	5
His	41***	26***	22***
Gly	28***	73***	2
Thr	24***	74***	5**
β -Ala	9**	84***	4
Arg	21***	80***	6**
GABA	25***	76***	2
α -Ala	29***	74***	3*
Pro	36***	62***	3
NH ₄ ⁺	18***	71***	20***
Tyr	18***	79***	14***
Val	27***	60***	11*
Met	2	84***	9**
Cys	13**	57***	15*
Iso	7***	90***	2
Leu	34***	66***	9***
Trp	22***	76***	5**
Phe	32***	68***	9***
Orn	10***	91***	6***
Lys	35***	60***	8*
Total	35***	63***	2

Tabla 5.17. Análisis multifactorial de los compuestos nitrogenados en los vinos con los factores tratamiento (T), añada (A) y la interacción tratamiento-añada (TxA). Separación por test de rango múltiple al 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$).

5.5. ANÁLISIS DISCRIMINANTE

Se llevó a cabo un análisis discriminante para comprobar si con los valores obtenidos de los distintos compuestos fenólicos y nitrogenados tanto en uvas como en vinos era posible clasificar nuestras muestras según los tratamientos aplicados.

Se obtuvieron dos funciones discriminantes con un valor p inferior a 0,05 resultando estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%. Estas dos funciones discriminantes nos permitieron clasificar correctamente el 100% de las muestras analizadas (**Figura 5.4**). El porcentaje relativo para la función 1 fue de 80,92% y el de la función 2 de 19,08%.

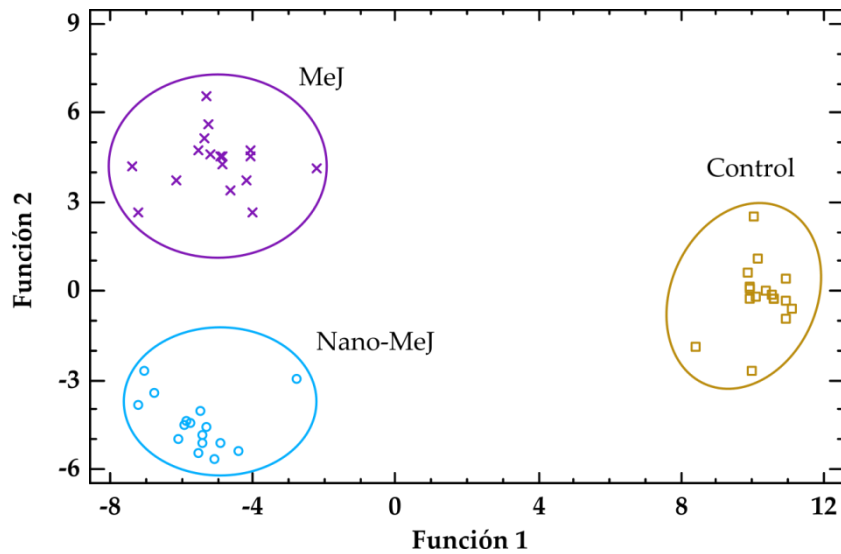


Figura 5.4. Gráfico de dispersión de análisis discriminante en uvas y vinos de las muestras control y de las procedentes de los tratamientos con MeJ y nano-MeJ.

Tal como se puede observar en la **Figura 5.4**, hay una clara separación entre el control y los distintos tratamientos. El control se sitúa en la parte central derecha del gráfico, por otro lado los dos tratamientos se encuentran en el lado izquierdo del mismo, el tratamiento con MeJ en la mitad superior y el tratamiento con nano-MeJ en la mitad inferior sin existir una mayor proximidad por parte de ninguno de los tratamientos al control.

La dimensión de los coeficientes de discriminación permite determinar cómo se utilizan las variables para discriminar entre grupos. Las variables con mayor poder de discriminación para la función 1 fueron: Gln, Asn+Ser, Thr, Arg+GABA, β -Ala y Trp y para la función 2: Gln, His, β -Ala y Val. Como puede apreciarse corresponden todas a aminoácidos, ya que según los resultados mostrados anteriormente, fueron estos los que tuvieron el mayor impacto de parte de los tratamientos y predominan sobre el resto de parámetros analizados. Los coeficientes de discriminación se muestran en la **Tabla 5.18**.

	Función 1	Función 2
Asp	-7,15483	-17,4414
Glu	-10,7976	31,5607
Asn+Ser	84,7552	1,56717
Gln	-158,073	-165,168
His	51,7878	97,1788
Gly	-26,0315	-22,5911
Thr	-83,3221	13,177
β-Ala	-61,5599	-61,609
Arg +GABA	68,2892	22,3557
α-Ala	-49,8741	-13,7772
Pro	-2,03841	-0,691617
NH₄⁺	9,40396	11,492
Tyr	13,4141	-9,39249
Val	53,4023	68,8963
Met	12,2799	16,591
Cys	7,84058	2,48451
Iso	6,39795	-17,4301
Leu	41,6175	-19,838
Trp	57,6259	31,04
Phe	-55,6515	21,9149
Orn	7,38956	1,52865
Lys	4,44649	0,11556
EpG-Ext	-1,49109	-8,84946
Cat-Ext	-33,1868	23,5578
Ep-Ext	49,1858	-38,7519
Cat-T	-8,1955	22,5792
Ep-3-O-g-Ext	-12,7274	22,6579
Ep-T	-6,42224	1,89629
Ep-3-O-g-T	0,199681	-1,88433
Di-OH	-3,07153	-7,55715
Tri-OH	14,1681	-33,2997
Acetatos	25,973	44,3203
Cumaratos	-27,9541	0,887972
Vitisinas	-5,44736	-3,4725
trans-piceido	10,664	8,7317
Piceatanol	-11,49	8,47796
cis-piceido	0,9583	-9,10504
trans-resveratrol	11,0319	15,4273
ε -viniferina	35,1264	-29,3326

Tabla 5.18. Coeficientes discriminantes estandarizados en uvas y vinos para las funciones discriminantes 1 y 2 para el factor tratamiento.

5.6. ANÁLISIS SENSORIAL

Se realizaron catas triangulares en los vinos correspondientes a las añadas 2020 y 2021 para determinar si a nivel organoléptico se podía detectar alguna diferencia entre los vinos elaborados con las uvas tratadas con MeJ y con nano-MeJ y los vinos elaborados con las uvas control. La cata de los vinos de la cosecha 2019 no se realizó debido a problemas organizativos generados por la pandemia de la COVID-19. Los resultados de las catas de los dos años de estudio que fueron evaluadas por 12 catadores se muestran en la **Tabla 5.19**.

Año	Cata	n	x	p-value
2020	Control vs. Urea	12	11	***
	Control vs. Nano-Urea	12	10	***
2021	Control vs. Urea	12	8	*
	Control vs. Nano-Urea	12	8	*

Tabla 5.19. Resultados obtenidos en las catas triangulares realizadas para los tratamientos de MeJ y nano-MeJ. n: nº de catadores, x; nº de catadores capaces de diferenciar entre los distintos tratamientos, p-value: 99,9%*** ($p < 0,001$), 99%** ($p < 0,01$) y 95%* ($p < 0,05$).

En el año 2020, cuando comparamos el vino control frente al del tratamiento con MeJ pudimos observar que de los 12 catadores ($n=12$), 11 fueron capaces de distinguir correctamente las muestras ($x=11$), de ellos 4 catadores mostraron preferencia por el vino control y 7 catadores por el vino procedente de uvas tratadas con MeJ. Cuando comparamos el vino control frente al procedente de uvas tratadas con nano-MeJ, los resultados fueron similares, en este caso 10 catadores de los 12 fueron capaces de identificar correctamente las muestras ($x=10$), 3 catadores mostraron preferencia por el vino control y 7 catadores por el vino procedente de las uvas tratadas con nano-MeJ.

En el año 2021, de los 12 catadores, 8 de ellos fueron capaces de diferenciar entre los distintos tratamientos ($x=8$). En la comparativa entre los vinos control y los procedentes de MeJ, un solo catador mostró preferencia por el vino control y 7 catadores lo hicieron por el vino de uvas tratadas con MeJ. En la cata en la que comparamos el vino control frente al de nano-MeJ solo 2 catadores mostraron preferencia por el vino control y 6 catadores por el vino procedente del tratamiento con nano-MeJ.

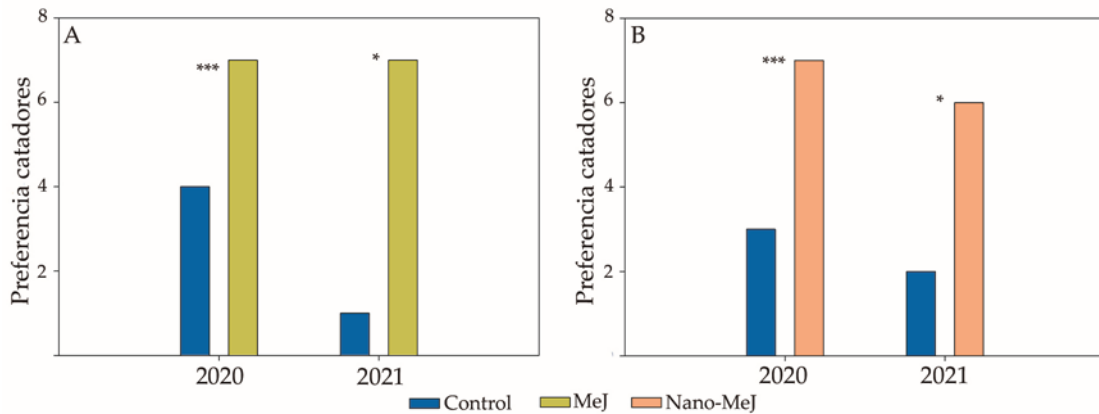


Figura. 5.5. Preferencia mostrada por los catadores en las catas triangulares realizadas: **A**, Control vs. MeJ. **B**, Control vs. nano-MeJ. Número de aciertos estadísticamente significativo * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$).

Por otro lado, el nivel de diferenciación entre las muestras fue algo mayor en 2020 que en 2021, como puede apreciarse en la **Figura 5.6**. La diferenciación encontrada entre el vino control y el procedente del tratamiento con MeJ fue muy similar a la percibida entre el vino control y el procedente del tratamiento con nano-MeJ, ya que las pequeñas diferencias no llegaron a ser significativas. A nivel visual se encontró una diferencia media en ambos tratamientos de 1,85 en 2020 y de 1,25 en 2021 y además esto coincide con los valores teóricos aportados por ΔE^* , que resultaron mayores en 2020 que en 2021 (apartado 5.3.7); aunque en 2021 y según ΔE^* tan solo hubiera sido posible diferenciar visualmente el vino procedente del tratamiento con MeJ sobre el vino control. Los valores de diferenciación medios para el nivel olfativo fueron 3,05 en 2020 y 2,19 en 2021, por otro lado a nivel gustativo fue muy similar 2,8 en 2020 y 2,38 en 2021.

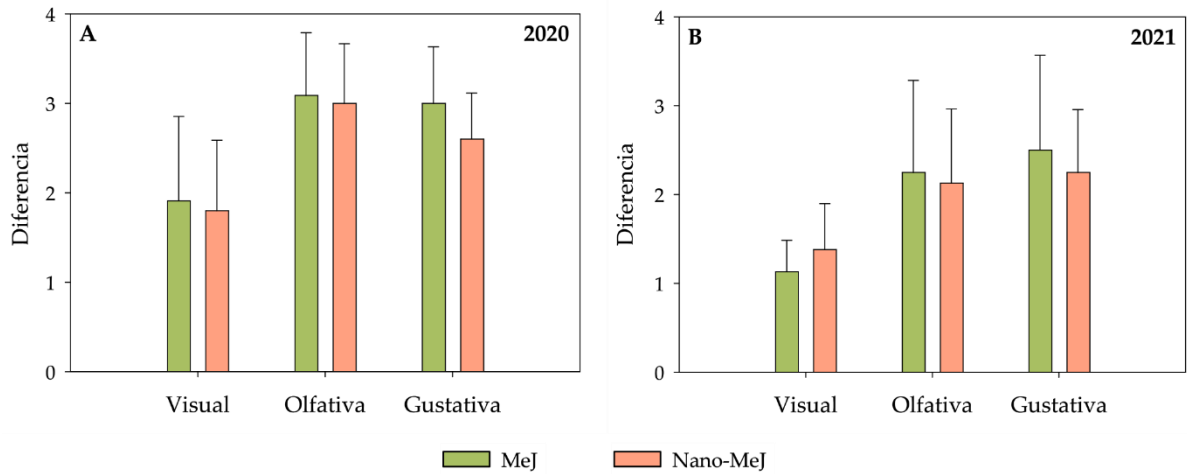


Figura 5.6. Grado de diferencia percibida entre los vinos control vs. MeJ y control vs. Nano-MeJ a nivel visual, olfativo y gustativo.

En resumen y a la vista de los resultados obtenidos, podemos decir que ambos tratamientos MeJ y nano-MeJ, para un nivel de confianza del 95% según los criterios de la norma UNE-EN-ISO 4120:2021, fueron capaces de mostrar diferencias significativas a nivel organoléptico entre los vinos elaborados con uvas control y los elaborados a partir de las uvas tratadas. Además se mostró una preferencia por los vinos procedentes tanto de MeJ como de nano-MeJ, aunque con algo de mayor incidencia en la preferencia por el tratamiento con MeJ.

6. CONCLUSIONES

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue la evaluación del efecto de la aplicación de urea y MeJ, tanto en forma convencional como soportados sobre nanopartículas de hidroxapatito, sobre la calidad de las uvas y vinos de la variedad Monastrell. Atendiendo a los resultados obtenidos podemos concluir:

Respecto al efecto de los tratamientos con urea y nano-urea:

1. Ambos tratamientos produjeron un incremento en el porcentaje de pared celular aislada, aumentando por tanto el grosor de la misma lo que pudo dificultar la liberación de compuestos de interés durante el proceso de vinificación.
2. En cuanto a la composición de la pared celular se vieron incrementados los contenidos en proteínas (con más relevancia en el caso del tratamiento con nano-urea), hemicelulosa y ácidos urónicos, mostrando un aumento muy importante en dos de las añadas estudiadas en estos dos últimos componentes. Sin embargo los CFT no se vieron afectados y la celulosa mostró concentraciones inferiores al control.
3. Respecto al efecto sobre la composición fenólica,
 - a. El efecto sobre los antocianos fue dispar en las uvas tratadas con urea, por otro lado en el caso de la nano-urea no logró incrementar la concentración de antocianos, mostrando valores inferiores a los encontrados en las uvas control. En relación al contenido de antocianos totales en los vinos, los valores hallados en ambos tratamientos siempre fueron inferiores a los obtenidos en el vino control.
 - b. En el caso de los estilbenos, el tratamiento con urea incrementó su contenido en las uvas tratadas, sin embargo el efecto del tratamiento con nano-urea no fue tan claro debido a la disparidad de resultados en los distintos años estudiados. A pesar de los resultados obtenidos en las uvas, los vinos procedentes de los distintos tratamientos no vieron afectados su contenido en estilbenos.
 - c. En el caso de las PAs, no se produjo efecto en las uvas procedentes de ambos tratamientos, al igual que sucedió en los vinos, en cambio en

ambos tratamientos los vinos obtenidos mostraron un menor valor del gMP. Además, el % de Gal de uvas y vinos no se vio afectado.

4. El efecto sobre los IPT mostró una tendencia a ser inferior en los vinos procedentes de ambos tratamientos, aunque con dependencia de la añada de estudio. La IC fue menor en los vinos procedentes de los tratamientos debido a que el valor encontrado en los antocianos fue menor al del vino control, además estas diferencias se consideraron perceptibles ($\Delta E^* > 3$). Por otro lado el tono no se vio afectado por los tratamientos.
5. En cuanto a los compuestos nitrogenados, ambos tratamientos provocaron un incremento de éstos en todas las añadas estudiadas pero más significativas cuando la cantidad de N en las uvas control fue bajo. En los vinos, para los dos tratamientos, se detectó un aumento en el contenido de compuestos nitrogenados aunque dependiendo de la añada fue más significativo en un caso que en otro.
6. En relación al análisis sensorial, no hubo diferencias detectables entre los vinos procedentes de las uvas control y los procedentes de cada uno de los tratamientos.

Respecto al efecto de los tratamientos con MeJ y nano-MeJ:

1. Los dos tratamientos provocaron un incremento en el porcentaje de pared celular aislada, lo que podría indicar un aumento del grosor de la misma. Al igual que ocurría con los tratamientos con urea, este hecho pudo dificultar la extracción de compuestos de interés.
2. En relación a los distintos componentes de la pared celular, se vieron incrementadas las proteínas (con más relevancia en el caso del nano-tratamiento) y el contenido en hemicelulosa. Los ácidos urónicos mostraron un incremento muy importante para los dos tratamientos en dos de las añadas estudiadas. Por otro lado, el efecto sobre los CFT fue poco relevante. Además, la cantidad de celulosa de las uvas procedentes de los dos tratamientos fue menor que en las uvas control.
3. El efecto sobre la composición fenólica resultó:
 - a. En un incremento en el contenido total de antocianos de las uvas tratadas con MeJ cuando se alcanzó una buena madurez, en el caso de las tratadas

- con nano-MeJ no se detectaron cambios. Los vinos procedentes de uvas tratadas con MeJ mostraron el mismo comportamiento que en las uvas, en cambio en los vinos procedentes de uvas tratadas con nano-MeJ el efecto fue variable en función de las añadas estudiadas.
- b. Los dos tratamientos fueron capaces de aumentar el contenido total de estilbenos de las uvas, mostrando el tratamiento con nano-MeJ una mayor capacidad para ello. Además, este incremento se trasladó a los vinos correspondientes lo que puede presentar un interés desde el punto de vista nutricional.
 - c. En cuanto al contenido en PAs, los hollejos de las uvas control mostraron concentraciones superiores a las tratadas, en el caso de las semillas este efecto no fue claro. En cuanto al contenido total de PAs en los vinos, éste no se vio afectado por los tratamientos, al igual que el gMP y el %Gal.
4. Los dos tratamientos provocaron un incremento en el contenido de compuestos nitrogenados de las uvas, dicho incremento fue mayor cuando se partió de uvas que contenían un menor valor de compuestos nitrogenados. En el caso de los vinos se detectó el mismo comportamiento que en las uvas.
 5. En relación a los IPT se puede considerar que prácticamente no se vieron afectados, ya que tan solo se registró un incremento para el tratamiento MeJ en una de las añadas estudiada. La IC se vio incrementada en el tratamiento con MeJ, cosa que no sucedió en el tratamiento con nano-MeJ, aunque este incremento solo fue detectable en dos de las añadas estudiadas. Finalmente el tono de los vinos no se vio influenciado por los tratamientos.
 6. En relación al análisis sensorial, los catadores fueron capaces de diferenciar entre los vinos procedentes de las uvas control y los procedentes de las uvas tratadas, mostrando su preferencia por estos últimos.

Conclusión final:

Se ha demostrado que tanto los tratamientos convencionales como en forma de nanopartículas con urea y con MeJ producen efectos sobre las uvas y finalmente sobre

los vinos de Monastrell, dichos efectos han sido variables debido en parte al factor añada que ha tenido un gran peso en todos los parámetros medidos.

Por otro lado, los tratamientos convencionales, en la mayoría de los casos han dado lugar a resultados más significativos que cuando hemos utilizado las nanopartículas. Aun así, también se han podido observar un impacto significativo en ciertas familias de compuestos cuando se han usado las nano-formulaciones.

Es obvio por tanto que la aplicación tanto de urea como de MeJ en formato de nanopartícula podría ser una herramienta que nos permitiría incrementar la calidad de uvas y vinos al mismo tiempo que nos permitiría realizar una viticultura más sostenible, pero dado que estamos aplicando dosis 8 (en el caso de la urea) y 10 (en el caso del MeJ) inferiores al modo convencional, es necesario realizar un mayor ajuste en la cantidad aplicada para poder optimizar su efectividad y poder ofertarlo al sector vitivinícola.

7. ANEXOS

	Fecha	° Bé	AT ¹	° Bé/AT	pH	Ácido Máfico ²	Ácido Tartárico ²
2019	12/08/2019	8,50	14,43	0,59	3,11	8,12	6,48
	19/08/2019	10,48	9,35	1,12	3,33	4,45	5,71
	26/08/2019	10,62	7,29	1,46	3,49	3,56	5,05
	02/09/2019	11,69	4,99	2,34	3,61	2,40	4,96
	09/09/2019	12,15	4,27	2,85	3,72	1,91	5,36
	18/09/2019	12,52	4,42	2,84	3,74	1,69	6,32
2020	10/08/2020	8,88	9,11	0,98	3,31	4,83	6,13
	17/08/2020	10,12	5,67	1,78	3,49	2,79	4,71
	24/08/2020	10,71	4,08	2,62	3,66	1,75	4,97
	31/08/2020	11,19	3,59	3,12	3,78	1,58	5,20
	07/09/2020	12,08	3,03	3,99	3,86	1,41	5,06
	14/09/2020	12,38	2,75	4,51	3,87	1,14	4,50
	21/09/2020	12,73	2,60	4,91	3,85	1,05	4,92
2021	09/08/2021	7,16	15,03	0,48	3,07	8,64	5,78
	16/08/2021	9,36	8,97	1,04	3,30	4,73	4,90
	23/08/2021	9,90	5,27	1,88	3,54	2,84	4,65
	30/08/2021	11,01	4,36	2,52	3,72	2,30	4,76
	06/09/2021	11,64	3,95	2,95	3,81	1,97	5,69
	13/09/2021	12,49	3,67	3,40	3,89	1,47	5,86
	20/09/2021	12,87	2,97	4,34	3,97	1,55	4,79

Tabla. 7.1. Control de maduración durante las campañas de estudio 2019,2020 y 2021. °Bé: grado Baumé. ¹Acidez total (AT) expresada en g/L de ácido tartárico, ²g/L.

		Control	Urea	Nano-urea	p-value
2019	Proteínas	45,69 ± 5,24 b	48,11 ± 7,05 b	70,66 ± 3,34 a	***
	CFT	65,34 ± 7,52	70,34 ± 9,12	69,82 ± 7,70	ns
	Glucosa celulósica	151,32 ± 9,44 a	160,70 ± 19,18 a	119,71 ± 9,01 b	**
	Hemicelulosa	7,84 ± 1,10 c	14,70 ± 1,26 b	29,73 ± 3,26 a	***
	Ácidos urónicos	132,04 ± 9,30 a	82,86 ± 5,92 c	115,16 ± 5,17 b	***
2020	Proteínas	57,63 ± 5,63	54,11 ± 2,77	51,37 ± 2,09	ns
	CFT	64,13 ± 10,02 a	62,05 ± 3,07 a	49,85 ± 3,59 b	*
	Glucosa celulósica	119,37 ± 15,66	111,79 ± 11,91	98,19 ± 15,51	ns
	Hemicelulosa	0,00 ± 0,00 b	6,02 ± 2,80 a	0,00 ± 0,00 b	*
	Ácidos urónicos	116,92 ± 31,63 b	197,84 ± 21,17 a	205,97 ± 9,77 a	***
2021	Proteínas	28,32 ± 3,71 b	36,36 ± 2,65 a	36,91 ± 2,19 a	**
	CFT	78,81 ± 5,62 a	66,03 ± 5,53 b	73,76 ± 2,48 a	*
	Glucosa celulósica	113,77 ± 14,44 a	97,32 ± 5,82 b	91,22 ± 4,87 b	*
	Hemicelulosa	36,44 ± 2,14 c	53,80 ± 4,15 a	46,71 ± 1,12 b	***
	Ácidos urónicos	130,39 ± 18,98 c	191,31 ± 12,68 a	165,27 ± 10,42 b	***

Figura 7.2. Composición de la pared celular en uvas Monastrell control y tratadas con urea y nano-urea (mg/g hollejo) durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Los datos representan las medias ± desviación estándar. CFT: compuestos fenólicos totales. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (**p<0,001, *p<0,01, p<0,05, ns: no significativo).

2019	Control	Urea	Nano-Urea	p-value
Delfidina-3-glucósido	3495,32 ± 1148,42	2740,11 ± 499,76	2732,48 ± 183,55	ns
Cianidina-3-glucósido	3450,50 ± 730,38	2997,94 ± 212,21	3982,11 ± 744,37	ns
Petunidina-3-glucósido	4049,20 ± 1163,01	3367,15 ± 621,70	3240,47 ± 282,58	ns
Peonidina-3-glucósido	5049,67 ± 492,49	4470,16 ± 367,14	5835,25 ± 835,13	ns
Malvidina-3-glucósido	15203,46 ± 4084,04	12678,43 ± 2656,23	11626,38 ± 1564,25	ns
Delfidina-3-acetil-glucósido	42,09 ± 13,53	37,16 ± 4,01	52,22 ± 15,72	ns
Cianidina-3-acetil-glucósido	nd	nd	nd	
Petunidina-3-acetil-glucósido	103,71 ± 30,13	92,09 ± 29,36	78,15 ± 14,44	ns
Peonidina-3-acetil-glucósido	90,14 ± 5,73	75,12 ± 4,26	109,64 ± 28,55	ns
Malvidina-3-acetil-glucósido	656,36 ± 139,19	531,11 ± 146,50	470,30 ± 96,18	ns
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>cis</i>)	26,84 ± 13,84	20,12 ± 9,30 b	10,65 ± 4,53 b	ns
Delfidina-3-cumaril-glu/peonidina-3-cafeoil-glu	199,11 ± 50,64	173,97 ± 38,83	134,89 ± 35,42	ns
Malvidina-3-cafeoil-glucósido	49,64 ± 23,48	72,57 ± 33,56	21,21 ± 20,04	ns
Cianidina-3-cumaril-glucósido	288,12 ± 60,73	266,74 ± 22,28	262,85 ± 48,39	ns
Petunidina-3-cumaril-glucósido	418,07 ± 105,35	365,15 ± 75,54	283,51 ± 53,40	ns
Peonidina-3-cumaril- glucósido	488,39 ± 74,06	440,99 ± 14,73	495,81 ± 11,75	ns
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>trans</i>)	2333,94 ± 544,43	2019,14 ± 427,58	1606,88 ± 270,26	ns
Sumatorio	35930,46 ± 8541,29	30347,95 ± 4381,04	30942,77 ± 883,12	ns

Tabla 7.3. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2019. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$, $p < 0,05$, ns: no significativo), nd: no detectado.

2020	Control	Urea	Nano-urea	p-value
Delfidina-3-glucósido	1518,59 ± 96,13	1803,50 ± 252,60	1694,46 ± 147,16	ns
Cianidina-3-glucósido	2314,18 ± 367,50	2067,31 ± 316,99	2296,76 ± 203,34	ns
Petunidina-3-glucósido	1800,98 ± 98,01	2076,83 ± 242,98	1955,79 ± 186,27	ns
Peonidina-3-glucósido	3041,76 ± 431,17	2606,41 ± 237,98	3031,42 ± 212,35	ns
Malvidina-3-glucósido	7772,42 ± 385,09	8652,91 ± 952,34	8344,25 ± 814,05	ns
Delfidina-3-acetil-glucósido	55,59 ± 2,80	69,04 ± 7,17	62,26 ± 8,31	ns
Cianidina-3-acetil-glucósido	56,61 ± 10,30	60,19 ± 6,44	64,93 ± 9,66	ns
Petunidina-3-acetil-glucósido	91,81 ± 5,41 b	120,05 ± 10,62 a	107,39 ± 12,97 ab	*
Peonidina-3-acetil-glucósido	91,49 ± 12,08	84,22 ± 7,67	95,92 ± 5,63	ns
Malvidina-3-acetil-glucósido	516,52 ± 11,50	638,21 ± 95,42	583,94 ± 81,59	ns
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>cis</i>)	22,91 ± 5,95	38,61 ± 9,95	32,26 ± 7,34	ns
Delfidina-3-cumaril-glu/peonidina-3-cafeoil-glu	129,97 ± 10,16	166,52 ± 23,57	154,79 ± 14,79	ns
Malvidina-3-cafeoil-glucósido	13,52 ± 2,43	22,59 ± 6,60	15,38 ± 7,51	ns
Cianidina-3-cumaril-glucósido	189,09 ± 13,01	202,48 ± 25,64	218,81 ± 18,80	ns
Petunidina-3-cumaril-glucósido	304,30 ± 23,59	383,15 ± 39,49	345,89 ± 46,49	ns
Peonidina-3-cumaril- glucósido	306,59 ± 14,28 b	300,53 ± 7,61 b	338,81 ± 17,53 a	*
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>trans</i>)	1748,76 ± 75,52	2026,45 ± 293,18	1879,05 ± 238,73	ns
Sumatorio	19975,09 ± 1293,97	21319,00 ± 1791,93	21222,12 ± 1538,16	ns

Tabla 7.4. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2020. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$, $p < 0,05$, ns: no significativo).

2021	Control	Urea	Nano-urea	p-value
Delfidina-3-glucósido	1883,43 ± 297,41	2241,99 ± 109,43	1905,98 ± 232,72	ns
Cianidina-3-glucósido	2779,11 ± 188,54 b	3397,98 ± 11,83 a	2439,23 ± 250,61 b	**
Petunidina-3-glucósido	2344,81 ± 170,83	2685,98 ± 128,65	2290,55 ± 198,17	ns
Peonidina-3-glucósido	3934,34 ± 196,48 b	4992,35 ± 12,80 a	3432,58 ± 271,49 c	***
Malvidina-3-glucósido	10848,19 ± 414,00 a	10905,59 ± 486,40 a	9176,03 ± 656,27 b	*
Delfidina-3-acetil-glucósido	47,55 ± 20,39	80,29 ± 8,50	65,39 ± 10,01	ns
Cianidina-3-acetil-glucósido	88,77 ± 9,66 b	123,20 ± 6,49 a	76,52 ± 10,15 b	**
Petunidina-3-acetil-glucósido	124,67 ± 16,35 b	158,22 ± 11,14 a	127,47 ± 12,30 b	*
Peonidina-3-acetil-glucósido	122,40 ± 8,35 b	174,02 ± 14,69 a	107,97 ± 8,25 b	***
Malvidina-3-acetil-glucósido	705,17 ± 29,43 a	701,34 ± 21,83 a	582,32 ± 35,00 b	**
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>cis</i>)	81,06 ± 5,83 a	75,25 ± 6,88 ab	64,07 ± 5,47 b	*
Delfidina-3-cumaril-glu/peonidina-3-cafeoil-glu	133,70 ± 63,04	224,79 ± 4,57	199,74 ± 18,26	ns
Malvidina-3-cafeoil-glucósido	76,49 ± 20,11 a	28,71 ± 3,66 b	47,16 ± 9,18 b	*
Cianidina-3-cumaril-glucósido	305,13 ± 9,11 b	355,34 ± 34,60 a	289,26 ± 17,09 b	*
Petunidina-3-cumaril-glucósido	474,78 ± 45,24	488,02 ± 22,01	416,48 ± 39,14	ns
Peonidina-3-cumaril- glucósido	449,24 ± 26,66 b	546,90 ± 15,46 a	387,43 ± 16,42 c	***
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>trans</i>)	2489,15 ± 169,07 a	2386,13 ± 76,83 a	2008,16 ± 199,98 b	*
Sumatorio	26887,99 ± 771,54 b	29566,11 ± 724,77 a	23616,34 ± 1421,81 c	**

Tabla 7.5. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2021. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, $p < 0,05$, ns: no significativo).

2019	Control	Urea	Nano-urea	p-value
Delfidina-3- glucósido	47,86 ± 4,70	45,37 ± 3,08	44,40 ± 3,16	ns
Cianidina-3-glucósido	18,88 ± 3,87	17,75 ± 1,09	20,49 ± 4,09	ns
Petunidina-3-glucósido	67,61 ± 6,04	65,13 ± 3,54	63,45 ± 3,43	ns
Peonidina-3-glucósido	64,27 ± 10,70	63,90 ± 3,56	70,31 ± 10,64	ns
Malvidina-3-glucósido	321,96 ± 31,31	304,67 ± 20,69	289,64 ± 3,82	ns
Vitisina A	2,40 ± 0,57	2,33 ± 0,26	2,95 ± 0,49	ns
Delfinidina-3-acetil-glucósido	4,18 ± 0,38	3,8 ± 0,35	3,62 ± 0,66	ns
Vitisina B	2,89 ± 0,23	2,95 ± 0,57	3,76 ± 0,46	ns
Acetil-vitisina A	3,17 ± 0,44	3,53 ± 0,55	3,67 ± 0,85	ns
Cianidina-3-acetil-glucósido	3,05 ± 0,63	2,79 ± 1,64	3,70 ± 1,45	ns
Petunidina-3-acetil-glucósido	4,44 ± 0,15	5,38 ± 0,98	6,22 ± 1,50	ns
Peonidina-3-acetil-glucósido	1,50 ± 0,03	2,44 ± 1,18	3,08 ± 1,38	ns
Malv-acet+Delf-cuma ¹	18,07 ± 0,80	19,86 ± 1,42	21,28 ± 3,69	ns
Peonidina-3-cafeoil-glucósido	nd	0,42 ± 0,72	0,87 ± 0,75	ns
Cianidina-3-cafeoil-glucósido+Cumaril-glucósido	0,03 ± 0,05	0,40 ± 0,69	0,68 ± 0,59	ns
Petunidina-3-cumaril-glucósido	3,89 ± 0,11	4,95 ± 1,17	5,80 ± 2,21	ns
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>cis</i>)	1,84 ± 0,31	2,47 ± 0,73	2,30 ± 0,67	ns
Peonidina-3-cumaril-glucósido	3,99 ± 0,17	4,59 ± 0,22	4,46 ± 0,96	ns
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>trans</i>)	38,00 ± 3,36	40,02 ± 0,71	37,97 ± 5,42	ns
Sumatorio	608,03 ± 60,39	592,79 ± 21,82	588,65 ± 26,90	ns

Tabla 7.6. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2019. Los datos representan las medias ± desviación estándar. ¹Malvidina-3-acetil-glucósido+delfidina-3-cumaril-glucósido. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (**p<0,001, *p<0,01, p<0,05, ns: no significativo), nd: no detectado.

2020	Control	Urea	Nano-urea	p-value
Delfidina-3- glucósido	25,65 ± 1,01 a	19,25 ± 2,96 b	19,73 ± 0,71 b	**
Cianidina-3-glucósido	12,62 ± 1,82	8,81 ± 2,75	10,26 ± 0,73	ns
Petunidina-3-glucósido	41,50 ± 2,31 a	32,04 ± 4,75 b	34,03 ± 1,06 b	*
Peonidina-3-glucósido	48,48 ± 5,90 a	32,92 ± 5,10 b	37,81 ± 0,92 b	*
Malvidina-3-glucósido	235,80 ± 8,57 a	199,71 ± 14,30 b	208,64 ± 6,27 b	*
Vitisina A	1,40 ± 0,28 a	0,94 ± 0,08 b	0,81 ± 0,04 b	*
Delfinidina-3-acetil-glucósido	1,67 ± 0,21	1,69 ± 0,16	1,45 ± 0,22	ns
Vitisina B	0,57 ± 0,08	0,43 ± 0,08	0,43 ± 0,10	ns
Acetil-vitisina A	nd	nd	nd	
Cianidina-3-acetil-glucósido	0,45 ± 0,11 a	0,15 ± 0,13 b	0,16 ± 0,05 b	*
Petunidina-3-acetil-glucósido	0,60 ± 0,02	0,54 ± 0,23	0,40 ± 0,15	
Peonidina-3-acetil-glucósido	1,05 ± 0,18	0,83 ± 0,12	0,86 ± 0,11	ns
Malv-acet+Delf-cuma ¹	15,36 ± 0,73	13,66 ± 1,01	14,55 ± 0,35	ns
Peonidina-3-cafeoil-glucósido	nd	nd	nd	
Cianidina-3-cafeoil-glucósido+Cumaril-glucósido	2,11 ± 0,29 a	1,26 ± 0,15 b	1,42 ± 0,14 b	**
Petunidina-3-cumaril-glucósido	2,01 ± 0,14 b	2,36 ± 0,10 a	2,41 ± 0,22 a	*
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>cis</i>)	3,53 ± 0,40 a	2,56 ± 0,31 b	2,59 ± 0,17 b	*
Peonidina-3-cumaril-glucósido	1,58 ± 0,45	1,00 ± 0,41	1,04 ± 0,11	ns
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>trans</i>)	28,94 ± 1,66 a	21,32 ± 1,77 b	23,04 ± 0,87 b	**
Sumatorio	423,32 ± 15,99 a	339,48 ± 33,64 b	359,64 ± 8,08 b	**

Tabla 7.7. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2020.

Los datos representan las medias ± desviación estándar.¹ Malvidina-3-acetil-glucósido+delfidina-3-cumaril-glucósido. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (**p<0,001, *p<0,01, p<0,05, ns: no significativo) nd: no detectado

	Control	Urea	Nano-urea	p-value
Delfidina-3- glucósido	33,51 ± 5,16	32,43 ± 3,82	32,23 ± 3,28	ns
Cianidina-3-glucósido	12,08 ± 2,48	13,85 ± 1,72	11,78 ± 1,57	ns
Petunidina-3-glucósido	58,22 ± 5,98	56,13 ± 5,08	54,76 ± 4,45	ns
Peonidina-3-glucósido	49,02 ± 7,60	59,18 ± 6,90	45,42 ± 4,64	ns
Malvidina-3-glucósido	313,86 ± 18,54	280,72 ± 20,34	276,76 ± 21,49	ns
Vitisina A	3,71 ± 1,00	3,09 ± 0,21	2,68 ± 0,21	ns
Delfinidina-3-acetil-glucósido	0,67 ± 0,18 b	0,76 ± 0,06 b	1,05 ± 0,11 a	*
Vitisina B	0,99 ± 0,12	0,78 ± 0,02	0,79 ± 0,09	ns
Acetil-vitisina A	0,12 ± 0,14	nd	nd	
Cianidina-3-acetil-glucósido	0,86 ± 0,22	1,23 ± 0,31	0,81 ± 0,18	ns
Petunidina-3-acetil-glucósido	2,34 ± 0,37	2,08 ± 0,30	2,14 ± 0,28	ns
Peonidina-3-acetil-glucósido	1,37 ± 0,42 a	0,73 ± 0,10 b	0,94 ± 0,03 ab	*
Malv-acet+Delf-cuma ¹	18,26 ± 0,96	16,82 ± 0,96	16,76 ± 1,58	ns
Peonidina-3-cafeoil-glucósido	0,18 ± 0,10	nd	nd	
Cianidina-3-cafeoil-glucósido+Cumaril-glucósido	4,23 ± 0,47	3,86 ± 0,53	4,35 ± 0,83	ns
Petunidina-3-cumaril-glucósido	3,50 ± 0,46	2,67 ± 0,16	3,10 ± 0,46	ns
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>cis</i>)	10,31 ± 0,84	10,50 ± 1,18	10,82 ± 1,90	ns
Peonidina-3-cumaril-glucósido	3,89 ± 0,57	4,92 ± 0,50	3,92 ± 0,65	ns
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>trans</i>)	36,99 ± 1,51	32,72 ± 3,28	34,91 ± 5,78	ns
Sumatorio	554,12 ± 41,87	522,47 ± 42,69	503,21 ± 46,01	ns

Tabla 7.8. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con urea y nano-urea durante la campaña 2021. Los datos representan las medias ± desviación estándar. ¹ Malvidina-3-acetil-glucósido+delfidina-3-cumaril-glucósido. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (**p<0,001, *p<0,01, p<0,05, ns: no significativo) nd: no detectado.

2019		Control	Urea	Nano-urea	p-value
HOLLEJO	EpG-Ext	2282,18 ± 93,11	2221,54 ± 211,52	2392,69 ± 216,70	ns
	Cat-Ext	175,23 ± 24,30	183,35 ± 119,32	198,87 ± 25,61	ns
	Ep-Ext	5137,10 ± 609,91	5024,77 ± 881,79	5452,09 ± 699,32	ns
	Cat-T	336,82 ± 35,97	352,27 ± 39,17	322,02 ± 82,77	ns
	Ep-3-O-g-Ext	443,04 ± 12,92	514,32 ± 214,68	341,92 ± 92,50	ns
	Ep-T	252,98 ± 96,20	209,85 ± 15,77	191,36 ± 40,60	ns
	Total	8627,35 ± 872,42	8506,10 ± 1450,71	8898,94 ± 1100,88	ns
SEMILLA	Cat-Ext	2609,54 ± 229,25	2046,96 ± 536,37	2128,21 ± 197,02	ns
	Ep-Ext	26088,50 ± 1894,85	23191,31 ± 542,80	21611,65 ± 1969,36	ns
	Cat-T	2067,36 ± 115,68	1969,71 ± 13,65	1711,33 ± 173,36	ns
	Ep-3-O-g-Ext	6176,70 ± 621,38	5435,64 ± 268,06	5610,96 ± 714,78	ns
	Ep-T	3354,39 ± 323,51	2734,76 ± 142,37	2478,16 ± 472,13	ns
	Ep-3-O-g-T	2385,79 ± 279,90	1995,98 ± 129,49	1923,95 ± 295,73	ns
	Total	42682,29 ± 3366,48	37374,36 ± 532,71	35464,27 ± 3735,71	ns
VINO	EpG-Ext	64,36 ± 7,41 a	52,18 ± 0,98 b	61,46 ± 3,69 ab	*
	Cat-Ext	8,76 ± 3,65	9,05 ± 0,26	8,53 ± 4,67	ns
	Ep-Ext	215,89 ± 32,47	192,51 ± 5,20	208,69 ± 17,10	ns
	Cat-T	38,31 ± 3,25 ab	34,65 ± 1,57 b	42,32 ± 0,60 a	*
	Ep-3-O-g-Ext	19,33 ± 4,42	23,17 ± 1,81	17,56 ± 1,64	ns
	Ep-T	68,79 ± 8,41	61,88 ± 4,13	66,29 ± 5,87	ns
	Ep-3-O-g-T	22,49 ± 13,94	17,09 ± 1,54	22,94 ± 2,96	ns
Total	428,01 ± 54,04	390,53 ± 9,63	427,79 ± 29,37	ns	

Figura 7.9. Concentración de los derivados de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con urea y nano-urea durante la campaña 2019. EpG-Ext, (-)- epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-) epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)-epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, $p < 0,05$, ns: no significativo).

2020		Control	Urea	Nano-urea	p-value
HOLLEJO	EpG-Ext	2977,99 ± 221,56	3186,26 ± 237,57	2956,76 ± 177,54	ns
	Cat-Ext	146,97 ± 3,02 b	189,71 ± 3,54 a	146,54 ± 17,53 b	*
	Ep-Ext	6408,11 ± 503,70	6957,89 ± 494,48	6419,62 ± 613,27	ns
	Cat-T	359,21 ± 34,60	430,00 ± 1,59	448,52 ± 46,50	ns
	Ep-3-O-g-Ext	176,59 ± 7,72	173,49 ± 23,99	239,17 ± 82,43	ns
	Ep-T	225,88 ± 37,23	252,58 ± 31,49	215,87 ± 21,56	ns
	Total	10294,75 ± 792,39	11189,94 ± 317,43	10426,48 ± 829,91	ns
SEMILLA	Cat-Ext	1173,71 ± 221,95 b	1879,99 ± 327,90 a	2064,83 ± 12,42 a	*
	Ep-Ext	9493,36 ± 1185,56 b	14191,48 ± 2356,70 a	16737,12 ± 540,64 a	*
	Cat-T	696,33 ± 142,23 b	1108,75 ± 133,75 a	1257,71 ± 25,13a	**
	Ep-3-O-g-Ext	2404,68 ± 279,36 c	3544,99 ± 565,73 b	4714,07 ± 83,51 a	**
	Ep-T	635,45 ± 130,42 b	1205,08 ± 254,99 a	1415,32 ± 121,63 a	*
	Ep-3-O-g-T	765,88 ± 165,45 b	1168,40 ± 179,02 a	1459,96 ± 35,30 a	*
	Total	15169,41 ± 2122,90 b	23098,68 ± 3790,55 a	27649,02 ± 793,79 a	*
VINO	EpG-Ext	93,56 ± 6,85 a	70,99 ± 4,97 b	67,81 ± 7,53 b	**
	Cat-Ext	9,09 ± 0,83	8,43 ± 2,32	5,94 ± 0,39	ns
	Ep-Ext	273,68 ± 15,11 a	238,21 ± 9,73 b	197,18 ± 12,06 c	***
	Cat-T	77,23 ± 9,44	84,06 ± 1,90	72,09 ± 2,21	ns
	Ep-3-O-g-Ext	16,55 ± 1,49 a	13,23 ± 1,34 b	11,52 ± 0,44 b	**
	Ep-T	19,65 ± 5,12	17,15 ± 0,84	15,35 ± 0,91	ns
	Ep-3-O-g-T	9,16 ± 1,22 a	6,10 ± 1,24 b	5,66 ± 0,70 b	*
Total	498,92 ± 20,71 a	438,18 ± 17,31 b	375,55 ± 16,71 c	***	

Figura 7.10. Concentración de los derivados de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con urea y nano-urea durante la campaña 2020. EpG-Ext, (-)- epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-)- epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)-epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (*** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, $p < 0,05$, ns: no significativo).

2021		Control	Urea	nano-urea	p-value
HOLLEJO	EpG-Ext	1548,12 ± 254,98	2106,23 ± 16,86	1651,27 ± 217,48	ns
	Cat-Ext	119,01 ± 6,09 b	179,76 ± 12,25 a	89,97 ± 9,92 c	**
	Ep-Ext	3884,00 ± 426,04 b	5636,71 ± 485,34 a	3627,21 ± 412,03 b	*
	Cat-T	307,1 ± 37,80	346,4 ± 38,36	279,29 ± 9,10	ns
	Ep-3-O-g-Ext	129,74 ± 41,05	148,13 ± 31,51	99,76 ± 7,56	ns
	Ep-T	116,06 ± 14,81 b	178,58 ± 22,15 a	88,59 ± 17,72 b	*
	Total	6104,03 ± 763,55 b	8595,81 ± 581,98 a	5836,09 ± 640,49 b	*
SEMILLA	Cat-Ext	2105,11 ± 132,13	2259,04 ± 203,52	2076,26 ± 244,98	ns
	Ep-Ext	17521,96 ± 1019,16	18846,54 ± 211,65	17471,02 ± 1727,96	ns
	Cat-T	1513,02 ± 110,41	1606,52 ± 88,02	1634,96 ± 181,39	ns
	Ep-3-O-g-Ext	3688,60 ± 249,84	3857,33 ± 208,24	3614,91 ± 473,24	ns
	Ep-T	1416,54 ± 173,42 b	1775,26 ± 149,83 a	1794,33 ± 136,20 a	*
	Ep-3-O-g-T	1516,74 ± 127,99	1642,18 ± 126,16	1561,92 ± 128,73	ns
	Total	27761,97 ± 1661,78	29986,88 ± 742,54	28153,4 ± 2852,15	ns
VINO	EpG-Ext	79,88 ± 16,37	79,34 ± 8,25	64,92 ± 10,54	ns
	Cat-Ext	31,45 ± 3,33	35,04 ± 1,33	32,19 ± 2,89	ns
	Ep-Ext	291,42 ± 45,36	300,61 ± 27,78	249,28 ± 26,73	ns
	Cat-T	63,32 ± 8,10	61,31 ± 5,04	55,58 ± 6,33	ns
	Ep-3-O-g-Ext	17,42 ± 3,22	17,02 ± 1,84	15,3 ± 1,87	ns
	Ep-T	21,81 ± 4,06	28,46 ± 2,37	23,56 ± 3,81	ns
	Ep-3-O-g-T	8,26 ± 2,56	8,39 ± 1,44	7,23 ± 0,87	ns
Total	513,55 ± 82,12	530,18 ± 47,20	448,05 ± 52,21	ns	

Figura 7.11. Concentración de los derivados de proantocianidinas en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con urea y nano-urea durante la campaña 2021. EpG-Ext, (-)- epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-)- epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)-epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, $p < 0,05$, ns: no significativo).

		Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value
2019	Proteínas	45,69 ± 5,24 c	55,19 ± 3,67 b	69,18 ± 2,64 a	***
	CFT	65,34 ± 7,52	69,23 ± 13,17	58,89 ± 8,70	ns
	Glucosa celulósica	151,32 ± 9,44 a	137,38 ± 6,03 b	128,60 ± 2,05 b	**
	Hemicelulosa	7,84 ± 1,11 c	17,88 ± 1,08 a	15,24 ± 0,65 b	***
	Ácidos urónicos	132,04 ± 9,30 a	86,77 ± 15,54 b	135,80 ± 10,06 a	***
2020	Proteínas	57,63 ± 5,63	54,83 ± 1,58	51,27 ± 5,08	ns
	CFT	64,13 ± 10,02 a	60,25 ± 4,02 a	44,39 ± 2,46 b	**
	Glucosa celulósica	119,37 ± 15,66 a	107,65 ± 13,80 a	76,92 ± 8,55 b	**
	Hemicelulosa	0,00 ± 0,00 b	0,00 ± 0,00 b	12,14 ± 3,23 a	***
	Ácidos urónicos	116,92 ± 31,62 b	203,67 ± 20,25 a	216,53 ± 3,97 a	***
2021	Proteínas	28,32 ± 3,71 b	36,60 ± 2,73 a	35,55 ± 4,45 a	*
	CFT	78,81 ± 5,62	68,70 ± 7,52	73,50 ± 2,37	ns
	Glucosa celulósica	113,77 ± 14,44	101,92 ± 8,63	95,28 ± 5,81	ns
	Hemicelulosa	36,44 ± 2,14 b	41,28 ± 1,42 a	42,84 ± 2,36 a	**
	Ácidos urónicos	130,39 ± 18,98 b	194,68 ± 6,29 a	183,75 ± 12,69a	***

Figura 7.12. Composición de la pared celular en uvas Monastrell (mg/g hollejo) control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante las campañas 2019, 2020 y 2021. Los datos representan las medias ± desviación estándar. CFT: compuestos fenólicos totales. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (**p<0,001, **p<0,01, p<0,05, ns: no significativo).

2019	Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value
Delfidina-3-glucósido	3495,32 ± 1148,42	3346,36 ± 137,84	2991,65 ± 617,74	ns
Cianidina-3-glucósido	3450,50 ± 730,38	3688,97 ± 883,26	3766,72 ± 588,72	ns
Petunidina-3-glucósido	4049,20 ± 1163,01	3979,12 ± 222,71	3458,10 ± 721,90	ns
Peonidina-3-glucósido	5049,67 ± 492,49	5889,73 ± 1717,07	5322,76 ± 224,90	ns
Malvidina-3-glucósido	15203,46 ± 4084,04	15092,34 ± 1251,41	12743,73 ± 3466,64	ns
Delfidina-3-acetil-glucósido	42,09 ± 13,53	53,86 ± 21,80	49,95 ± 13,12	ns
Cianidina-3-acetil-glucósido	nd	nd	nd	ns
Petunidina-3-acetil-glucósido	103,71 ± 30,13	119,97 ± 24,34	96,61 ± 24,09	ns
Peonidina-3-acetil-glucósido	90,14 ± 5,73	120,12 ± 59,89	97,35 ± 14,66	ns
Malvidina-3-acetil-glucósido	656,36 ± 139,19	672,94 ± 155,02	530,47 ± 150,26	ns
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>cis</i>)	26,84 ± 13,84	12,65 ± 4,39	11,79 ± 13,17	ns
Delfidina-3-cumaril-glu/peonidina-3-cafeoil-glu	199,11 ± 50,64	171,43 ± 17,94	159,91 ± 39,09	ns
Malvidina-3-cafeoil-glucósido	49,64 ± 23,48	59,14 ± 7,38	43,19 ± 19,46	ns
Cianidina-3-cumaril-glucósido	288,12 ± 60,73	276,71 ± 64,07	259,34 ± 16,89	ns
Petunidina-3-cumaril-glucósido	418,07 ± 105,35	336,48 ± 46,79	316,42 ± 101,84	ns
Peonidina-3-cumaril- glucósido	488,39 ± 74,06	504,82 ± 133,33	441,56 ± 29,39	ns
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>trans</i>)	2333,94 ± 544,43	2014,45 ± 320,74	1750,97 ± 548,18	ns
Sumatorio	35930,46 ± 8541,29	36339,07 ± 4092,46	32040,52 ± 4962,47	ns

Tabla 7.13. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2019. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, $p < 0,05$, ns: no significativo), nd: no detectado.

2020	Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value
Delfidina-3-glucósido	1518,59 ± 96,13 b	2063,46 ± 313,22 a	1750,08 ± 36,42 ab	*
Cianidina-3-glucósido	2314,18 ± 367,50 b	3354,31 ± 294,75 a	2646,01 ± 156,67 b	*
Petunidina-3-glucósido	1800,98 ± 98,01 b	2381,19 ± 288,40 a	2021,39 ± 32,65 b	*
Peonidina-3-glucósido	3041,76 ± 431,17 b	4486,96 ± 581,27 a	3670,76 ± 194,98 ab	*
Malvidina-3-glucósido	7772,42 ± 385,09 b	10049,94 ± 558,60 a	8262,88 ± 242,27 b	**
Delfidina-3-acetil-glucósido	55,59 ± 2,80 b	82,27 ± 12,20 a	65,19 ± 8,00 ab	*
Cianidina-3-acetil-glucósido	56,61 ± 10,30 b	108,51 ± 13,03 a	75,68 ± 2,75 b	**
Petunidina-3-acetil-glucósido	91,81 ± 5,41 c	139,46 ± 14,81 a	115,03 ± 12,28 b	**
Peonidina-3-acetil-glucósido	91,49 ± 12,08 b	154,41 ± 24,83 a	114,01 ± 4,91 b	**
Malvidina-3-acetil-glucósido	516,52 ± 11,50 b	679,06 ± 18,56 a	551,62 ± 40,98 b	***
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>cis</i>)	22,91 ± 5,95	19,17 ± 6,45	27,61 ± 6,90	ns
Delfidina-3-cumaril-glu/peonidina-3-cafeoil-glu	129,97 ± 10,16	153,75 ± 24,13	147,88 ± 11,67	ns
Malvidina-3-cafeoil-glucósido	13,52 ± 2,43	14,73 ± 1,87	14,66 ± 2,54	ns
Cianidina-3-cumaril-glucósido	189,09 ± 13,01 c	267,48 ± 21,77 a	222,39 ± 12,16 b	**
Petunidina-3-cumaril-glucósido	304,30 ± 23,59	341,05 ± 38,20	341,29 ± 42,92	ns
Peonidina-3-cumaril- glucósido	306,59 ± 14,28 b	413,88 ± 43,50 a	351,51 ± 19,95 b	*
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>trans</i>)	1748,76 ± 75,52	1995,27 ± 142,81	1807,59 ± 168,03	ns
Sumatorio	19975,09 ± 1293,97 b	26704,92 ± 1467,72 a	22185,58 ± 258,55 b	***

Tabla 7.14. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2020. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns: no significativo).

2021	Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value
Delfidina-3-glucósido	1883,43 ± 297,41 b	2772,74 ± 257,42 a	1969,65 ± 133,53 b	**
Cianidina-3-glucósido	2779,11 ± 188,54 ab	3161,56 ± 293,63 a	2238,38 ± 322,49 b	*
Petunidina-3-glucósido	2344,81 ± 170,83 b	3188,09 ± 248,48 a	2406,70 ± 136,51 b	**
Peonidina-3-glucósido	3934,34 ± 196,48 b	5398,75 ± 560,98 a	3397,21 ± 530,11 b	**
Malvidina-3-glucósido	10848,19 ± 414,00 b	13127,20 ± 848,66 a	10165,55 ± 430,89 b	**
Delfidina-3-acetil-glucósido	47,55 ± 20,39	82,00 ± 6,52	71,49 ± 11,48	ns
Cianidina-3-acetil-glucósido	88,77 ± 9,66	108,38 ± 8,67	83,98 ± 18,54	ns
Petunidina-3-acetil-glucósido	124,67 ± 16,35	165,93 ± 11,54	146,41 ± 21,85	ns
Peonidina-3-acetil-glucósido	122,40 ± 8,35 b	171,07 ± 11,93 a	109,95 ± 18,35 b	**
Malvidina-3-acetil-glucósido	705,17 ± 29,43 ab	762,89 ± 32,82 a	657,50 ± 35,49 b	*
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>cis</i>)	81,06 ± 5,83 a	58,82 ± 4,81 b	77,85 ± 7,73 a	**
Delfidina-3-cumaril-glu/peonidina-3-cafeoil-glu	133,70 ± 63,04	200,76 ± 19,95	219,97 ± 12,39	ns
Malvidina-3-cafeoil-glucósido	76,49 ± 20,11 a	27,50 ± 2,92 b	44,46 ± 4,43 b	**
Cianidina-3-cumaril-glucósido	305,13 ± 9,11	282,83 ± 27,80	265,94 ± 18,20	ns
Petunidina-3-cumaril-glucósido	474,78 ± 45,24	401,28 ± 29,89	458,45 ± 37,83	ns
Peonidina-3-cumaril- glucósido	449,24 ± 26,66 a	492,78 ± 38,40 a	376,54 ± 35,92 b	*
Malvidina-3-cumaril glucósido (<i>trans</i>)	2489,15 ± 169,07	2226,55 ± 96,78	2272,12 ± 167,04	ns
Sumatorio	26887,99 ± 771,54 b	32629,13 ± 2470,91 a	24962,16 ± 509,11 b	**

Tabla 7.15. Concentración de antocianos individuales ($\mu\text{g/g}$ hollejo fresco) en las uvas control y tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2021. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (** $p < 0,001$, * $p < 0,01$, $p < 0,05$, ns: no significativo).

2019	Control	Urea	Nano-urea	p-value
Delfidina-3- glucósido	47,86 ± 4,70	46,93 ± 4,17	42,28 ± 6,76	ns
Cianidina-3-glucósido	18,88 ± 3,87	18,41 ± 0,71	18,92 ± 3,97	ns
Petunidina-3-glucósido	67,61 ± 6,04	65,20 ± 5,18	59,72 ± 7,62	ns
Peonidina-3-glucósido	64,27 ± 10,70	63,51 ± 6,58	66,29 ± 11,57	ns
Malvidina-3-glucósido	321,96 ± 31,31	320,45 ± 21,56	287,89 ± 19,97	ns
Vitisina A	2,40 ± 0,57	2,60 ± 0,48	2,48 ± 0,52	ns
Delfinidina-3-acetil-glucósido	4,18 ± 0,38 a	3,07 ± 0,29 b	2,87 ± 0,43 b	*
Vitisina B	2,89 ± 0,23 b	3,54 ± 0,23 a	2,85 ± 0,35 b	*
Acetil-vitisina A	3,17 ± 0,44	3,38 ± 0,04	3,12 ± 0,50	ns
Cianidina-3-acetil-glucósido	3,05 ± 0,63	2,93 ± 0,26	2,72 ± 0,38	ns
Petunidina-3-acetil-glucósido	4,44 ± 0,15	4,95 ± 0,42	4,65 ± 0,43	ns
Peonidina-3-acetil-glucósido	1,50 ± 0,03	1,33 ± 0,14	1,42 ± 0,22	ns
Malv-acet+Delf-cuma ¹	18,07 ± 0,80	19,49 ± 0,86	18,28 ± 0,70	ns
Peonidina-3-cafeoil-glucósido	nd	nd	nd	ns
Cianidina-3-cafeoil-glucósido+Cumaril-glucósido	0,03 ± 0,05	nd	nd	ns
Petunidina-3-cumaril-glucósido	3,89 ± 0,11	3,60 ± 0,56	3,76 ± 0,41	ns
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>cis</i>)	1,84 ± 0,31	1,63 ± 0,27	1,64 ± 0,12	ns
Peonidina-3-cumaril-glucósido	3,99 ± 0,17	3,53 ± 0,60	3,68 ± 2,29	ns
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>trans</i>)	38,00 ± 3,36	38,25 ± 3,91	37,02 ± 2,29	ns
Sumatorio	608,03 ± 60,39	602,82 ± 41,76	559,58 ± 55,55	ns

Tabla 7.16. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2019. Los datos representan las medias ± desviación estándar. ¹ Malvidina-3-acetil-glucósido+delfinidina-3-cumaril-glucósido. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (**p<0,001, *p<0,01, p<0,05, ns: no significativo) nd: no detectado.

2020	Control	Urea	Nano-urea	p-value
Delfidina-3- glucósido	25,65 ± 1,01 ab	31,65 ± 4,83 a	21,99 ± 3,58 b	*
Cianidina-3-glucósido	12,62 ± 1,82	14,26 ± 7,76	12,51 ± 3,03	ns
Petunidina-3-glucósido	41,50 ± 2,31 b	50,73 ± 3,29 a	37,12 ± 5,73 b	*
Peonidina-3-glucósido	48,48 ± 5,90	60,10 ± 17,90	48,50 ± 8,42	ns
Malvidina-3-glucósido	235,80 ± 8,57 b	297,74 ± 9,12 a	222,55 ± 17,43 b	***
Vitisina A	1,40 ± 0,28	1,47 ± 0,27	1,00 ± 0,05	ns
Delfinidina-3-acetil-glucósido	1,67 ± 0,21	2,02 ± 1,12	1,38 ± 0,10	ns
Vitisina B	0,57 ± 0,08 b	0,84 ± 0,12 a	0,48 ± 0,11 b	*
Acetil-vitisina A	nd	nd	nd	
Cianidina-3-acetil-glucósido	0,45 ± 0,11	0,58 ± 0,12	0,37 ± 0,16	ns
Petunidina-3-acetil-glucósido	0,60 ± 0,02 b	0,94 ± 0,18 a	0,52 ± 0,13 b	*
Peonidina-3-acetil-glucósido	1,05 ± 0,18	1,27 ± 0,23	1,10 ± 0,09	ns
Malv-acet+Delf-cuma ¹	15,36 ± 0,73 b	18,98 ± 0,54 a	14,99 ± 0,80 b	***
Peonidina-3-cafeoil-glucósido	nd	nd	nd	
Cianidina-3-cafeoil-glucósido+Cumaril-glucósido	2,11 ± 0,29 a	2,28 ± 0,12 a	1,42 ± 0,31 b	*
Petunidina-3-cumaril-glucósido	2,01 ± 0,14 ab	1,32 ± 0,61 b	2,56 ± 0,23 a	*
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>cis</i>)	3,53 ± 0,40 a	3,94 ± 0,18 a	2,67 ± 0,32 b	**
Peonidina-3-cumaril-glucósido	1,58 ± 0,45 ab	2,07 ± 0,29 a	1,06 ± 0,17 b	*
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>trans</i>)	28,94 ± 1,66 b	35,64 ± 0,30 a	24,78 ± 2,13 c	***
Sumatorio	423,32 ± 15,99 b	525,85 ± 28,48 a	394,99 ± 41,21 b	**

Tabla 7.17. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2020. Los datos representan las medias ± desviación estándar. ¹ Malvidina-3-acetil-glucósido+delfidina-3-cumaril-glucósido. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (***p<0,001, **p<0,01, p<0,05, ns: no significativo) nd: no detectado.

2021	Control	Urea	Nano-urea	p-value
Delfidina-3- glucósido	33,51 ± 5,16	43,99 ± 5,79	39,06 ± 1,75	ns
Cianidina-3-glucósido	12,08 ± 2,48	15,79 ± 3,05	15,87 ± 0,98	ns
Petunidina-3-glucósido	58,22 ± 5,98 b	73,55 ± 7,77 a	65,32 ± 1,93 ab	*
Peonidina-3-glucósido	49,02 ± 7,60	64,77 ± 13,13	58,13 ± 3,18	ns
Malvidina-3-glucósido	313,86 ± 18,54 b	380,73 ± 24,27 a	318,49 ± 6,07 b	**
Vitisina A	3,71 ± 1,00	3,76 ± 0,49	2,97 ± 0,15	ns
Delfinidina-3-acetil-glucósido	0,67 ± 0,18 b	1,35 ± 0,11 a	1,00 ± 0,26 ab	*
Vitisina B	0,99 ± 0,12	1,22 ± 0,32	1,20 ± 0,01	ns
Acetil-vitisina A	0,12 ± 0,14	0,02 ± 0,02	nd	ns
Cianidina-3-acetil-glucósido	0,86 ± 0,22	1,18 ± 0,61	1,18 ± 0,13	ns
Petunidina-3-acetil-glucósido	2,34 ± 0,37	2,86 ± 0,48	2,83 ± 0,23	ns
Peonidina-3-acetil-glucósido	1,37 ± 0,42	1,11 ± 0,22	0,94 ± 0,12	ns
Malv-acet+Delf-cuma ¹	18,26 ± 0,96 b	22,42 ± 1,36 a	20,64 ± 0,36 a	**
Peonidina-3-cafeoil-glucósido	0,18 ± 0,10 a	0,02 ± 0,02 b	0,09 ± 0,03 ab	*
Cianidina-3-cafeoil-glucósido+Cumaril-glucósido	4,23 ± 0,47 b	4,56 ± 0,39 ab	5,30 ± 0,28 a	*
Petunidina-3-cumaril-glucósido	3,50 ± 0,46	2,95 ± 0,36	2,87 ± 0,22	ns
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>cis</i>)	10,31 ± 0,84 b	10,85 ± 0,99 b	13,05 ± 0,60 a	*
Peonidina-3-cumaril-glucósido	3,89 ± 0,57	4,46 ± 0,89	5,11 ± 0,19	ns
Malvinida-3-cumaril-glucósido (<i>trans</i>)	36,99 ± 1,51 b	40,14 ± 1,74 ab	41,98 ± 1,88 a	*
Sumatorio	554,12 ± 41,87b	675,73 ± 60,32 a	596,02 ± 13,36 ab	*

Tabla 7.18. Concentración de antocianos individuales (mg/L) en vinos control y procedentes de uvas tratadas con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2021. Los datos representan las medias ± desviación estándar. ¹ Malvidina-3-acetil-glucósido+delfidina-3-cumaril-glucósido. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (**p<0,001, *p<0,01, p<0,05, ns: no significativo) nd: no detectado.

2019		Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value
HOLLEJO	EpG-Ext	2282,18 ± 93,12	1831,97 ± 160,52	2282,83 ± 362,42	ns
	Cat-Ext	175,23 ± 24,29	177,73 ± 7,96	184 ± 7,30	ns
	Ep-Ext	5137,1 ± 609,91	4853,86 ± 140,32	4907,56 ± 138,25	ns
	Cat-T	336,82 ± 35,97	423,51 ± 96,36	400,78 ± 50,62	ns
	Ep-3-O-g-Ext	443,04 ± 12,92 a	324,16 ± 67,71 b	343,4 ± 4,01 b	*
	Ep-T	252,98 ± 96,20	230,06 ± 17,64	192,45 ± 73,59	ns
	Total	8627,35 ± 872,42	7841,29 ± 245,73	8311,03 ± 426,28	ns
SEMILLA	Cat-Ext	2609,54 ± 229,25 a	2347,68 ± 82,10 ab	1932,01 ± 282,29 b	*
	Ep-Ext	26088,50 ± 1894,85 a	22325,30 ± 379,22 b	18384,17 ± 1350,67 c	**
	Cat-T	2067,36 ± 115,68 a	1848,20 ± 50,22 a	1365,46 ± 129,69 b	**
	Ep-3-O-g-Ext	6176,7 ± 621,38	5737,23 ± 279,51	5117,7 ± 522,96	ns
	Ep-T	3354,39 ± 323,51 a	2688,17 ± 75,07 b	1742,65 ± 168,58 c	**
	Ep-3-O-g-T	2385,79 ± 279,90 a	2080,37 ± 68,88 a	1548,51 ± 113,04 b	**
	Total	42682,29 ± 3366,48 a	37026,95 ± 684,43 a	30090,50 ± 2489,24 b	**
VINO	EpG-Ext	64,36 ± 7,41	63,92 ± 4,38	73,6 ± 11,75	ns
	Cat-Ext	8,76 ± 3,65	11,11 ± 0,392	11,12 ± 1,79	ns
	Ep-Ext	215,89 ± 32,47	224,56 ± 13,72	226,19 ± 29,35	ns
	Cat-T	38,31 ± 3,25	46,04 ± 2,01	43,17 ± 5,98	ns
	Ep-3-O-g-Ext	19,33 ± 4,42 b	28,88 ± 0,62 a	22,79 ± 1,68 b	*
	Ep-T	68,79 ± 8,41	73,41 ± 1,55	69,46 ± 5,22	ns
	Ep-3-O-g-T	22,49 ± 13,94	14,15 ± 1,31	17,53 ± 2,98	ns
Total	428,01 ± 54,04	462,08 ± 19,63	463,87 ± 57,92	ns	

Figura 7.19. Concentración de los derivados de proantocianidinas tras reacción de floroglucinolisis en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2019. EpG-Ext, (-)- epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-)- epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)-epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, $p < 0,05$, ns: no significativo).

2020		Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value
HOLLEJO	EpG-Ext	2977,99 ± 221,56	2423,53 ± 338,09	2691,11 ± 95,66	ns
	Cat-Ext	146,97 ± 3,02	150,54 ± 9,54	164,69 ± 6,74	ns
	Ep-Ext	6408,11 ± 503,70	5723,03 ± 517,54	5825,74 ± 331,04	ns
	Cat-T	359,21 ± 34,60 b	469,48 ± 9,76 a	447,84 ± 38,65 a	*
	Ep-3-O-g-Ext	176,59 ± 7,72	167,73 ± 22,65	191,96 ± 32,00	ns
	Ep-T	225,88 ± 37,23	170,42 ± 28,85	220,20 ± 30,36	ns
	Total	10294,75 ± 792,39	9104,74 ± 892,06	9541,54 ± 443,67	ns
SEMILLA	Cat-Ext	1173,71 ± 221,93	1830,33 ± 403,09	1796,95 ± 388,92	ns
	Ep-Ext	9493,36 ± 1185,56	13651,55 ± 3885,37	14203,23 ± 2654,02	ns
	Cat-T	696,33 ± 142,23	1043,57 ± 307,68	1139,57 ± 261,56	ns
	Ep-3-O-g-Ext	2404,68 ± 279,36	3506,88 ± 948,81	3773,17 ± 783,57	ns
	Ep-T	635,45 ± 130,42	931,73 ± 357,69	1051,51 ± 236,08	ns
	Ep-3-O-g-T	765,88 ± 165,45	1114,06 ± 333,25	1163,04 ± 194,79	ns
	Total	15169,41 ± 2122,90	22078,12 ± 6223,07	23127,46 ± 4481,46	ns
VINO	EpG-Ext	93,56 ± 6,85	96,46 ± 14,41	87,85 ± 5,79	ns
	Cat-Ext	9,09 ± 0,83	9,41 ± 2,17	8,16 ± 0,51	ns
	Ep-Ext	273,68 ± 15,11	275,52 ± 40,29	246,38 ± 12,71	ns
	Cat-T	77,23 ± 9,44	84,44 ± 6,81	80,99 ± 2,44	ns
	Ep-3-O-g-Ext	16,55 ± 1,49	14,91 ± 2,08	14,18 ± 1,35	ns
	Ep-T	19,65 ± 5,12	23,1 ± 3,42	18,53 ± 1,56	ns
	Ep-3-O-g-T	9,16 ± 1,22	9,37 ± 3,43	6,48 ± 1,09	ns
Total	498,92 ± 20,71	513,21 ± 65,41	462,56 ± 22,21	ns	

Figura 7.20. Concentración de los derivados de proantocianidinas tras reacción de florogluculinolisis en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2020. EpG-Ext, (-)- epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-)- epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)-epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (**p<0,001, *p<0,01, p<0,05, ns: no significativo).

2021		Control	MeJ	Nano-MeJ	p-value
HOLLEJO	EpG-Ext	1548,12 ± 254,98	1954,38 ± 263,29	1418,22 ± 327,63	ns
	Cat-Ext	119,01 ± 6,09 b	163,19 ± 29,97 a	90,10 ± 16,50b	*
	Ep-Ext	3884,00 ± 426,04	5136,25 ± 932,28	3709,12 ± 937,94	ns
	Cat-T	307,1 ± 37,80	335,84 ± 32,72	290,66 ± 49,02	ns
	Ep-3-O-g-Ext	129,74 ± 41,05	142,76 ± 24,15	92,89 ± 35,63	ns
	Ep-T	116,06 ± 14,81	157,87 ± 39,14	106,6 ± 37,43	ns
	Total	6104,03 ± 763,55	7890,29 ± 1289,43	5707,59 ± 1396,39	ns
SEMILLA	Cat-Ext	2105,11 ± 132,13 ab	2579,79 ± 396,65 a	1634,11 ± 164,80 b	*
	Ep-Ext	17521,96 ± 1019,16 a	18394,43 ± 2829,91 a	13957,29 ± 690,91 b	*
	Cat-T	1513,02 ± 110,41 a	1623,71 ± 249,93 a	1122,48 ± 145,87 b	*
	Ep-3-O-g-Ext	3688,6 ± 249,84	3719,88 ± 546,67	2891,52 ± 199,15	ns
	Ep-T	1416,54 ± 173,42	1464,2 ± 271,05	1072,52 ± 157,70	ns
	Ep-3-O-g-T	1516,74 ± 127,99 a	1550,06 ± 221,28 a	1141,99 ± 47,13 b	*
	Total	27761,97 ± 1661,78 a	29332,08 ± 4394,04 a	21819,90 ± 1329,98 b	*
VINO	EpG-Ext	79,88 ± 16,37	100,98 ± 8,76	82,49 ± 4,63	ns
	Cat-Ext	31,45 ± 3,33	35,61 ± 2,02	34,15 ± 1,71	ns
	Ep-Ext	291,42 ± 45,36	310,66 ± 17,00	277,85 ± 22,78	ns
	Cat-T	63,32 ± 8,10	64,7 ± 1,76	62,92 ± 3,16	ns
	Ep-3-O-g-Ext	17,42 ± 3,22	16,68 ± 1,36	14,53 ± 2,55	ns
	Ep-T	21,81 ± 4,06	24,81 ± 3,59	22,14 ± 1,79	ns
	Ep-3-O-g-T	8,26 ± 2,56	8,14 ± 1,34	9,17 ± 0,38	ns
Total	513,55 ± 82,12	561,59 ± 31,32	503,25 ± 34,99	ns	

Figura 7.21. Concentración de los derivados de proantocianidinas tras reacción de florogluculinolisis en hollejo fresco ($\mu\text{g/g}$), semillas ($\mu\text{g/g}$) de uvas y vinos (mg/L) control y los procedentes de tratamientos con MeJ y nano-MeJ durante la campaña 2021. EpG-Ext, (-)- epigallocatequina-floroglucinol; Cat-Ext, (+)-catequina-floroglucinol; Ep-Ext, (-)epicatequina-4-floroglucinol; Cat-T, (+)-catequina terminal; Ep-3-O-g-Ext, (-)- epicatequina-3-orto-galato-floroglucinol; Ep-T, (-)-epicatequina terminal; Ep-3-O-g-T, (-)-epicatequina-3-orto-galato terminal. Los datos representan las medias \pm desviación estándar. Diferentes letras en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo al test LSD (**p<0,001, *p<0,01, p<0,05, ns: no significativo).

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abascal, E., Gómez-Coma, L., Ortiz, I., Ortiz, A., 2022. Global diagnosis of nitrate pollution in groundwater and review of removal technologies. *Sci. Total Environ.* 810. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152233>
- Ahmad, S., Belwal, V., Punia, S.S., Ram, M., Dalip, Rajput, S.S., Kunwar, R., Meena, M.K., Gupta, D., Kumawat, G.L., Hussain, T., Mohamed, H.I., 2022. Role of plant secondary metabolites and phytohormones in drought tolerance: A review. *Gesunde Pflanzen* 75, 729–746. <https://doi.org/10.1007/s10343-022-00795-z>
- Albersheim, P., Valent, B.S., 1978. Host-pathogen interactions in plants: Plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. *J. Cell Biol.* 78, 627–643. <https://doi.org/10.1083/jcb.78.3.627>
- Aldon, D., Mbengue, M., Mazars, C., Galaud, J.P., 2018. Calcium signalling in plant biotic interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms19030665>
- Angelova, Z., Georgiev, S., Roos, W., 2006. Elicitation of plants. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 20, 72–83. <https://doi.org/10.1080/13102818.2006.10817345>
- Antonacci, A., Arduini, F., Moscone, D., Palleschi, G., Scognamiglio, V., 2018. Nanostructured (Bio)sensors for smart agriculture. *Trends Anal. Chem.* 98, 95–103. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.022>
- Aoki, Y., Okamura, Y., Tadaka, S., Kinoshita, K., Obayashi, T., 2016. ATTED-II in 2016: A plant coexpression database towards lineage-specific coexpression. *Plant Cell Physiol.* 57, (1): e5. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcv165>
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J.M., Ros-García, J.M., 2015a. The composition of cell walls from grape marcs is affected by grape origin and enological technique. *Food Chem.* 167, 370–377. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.030>
- Apolinar-Valiente, R., Romero-Cascales, I., Gómez-Plaza, E., López-Roca, J.M., Ros-García, J.M., 2015b. Cell wall compounds of red grapes skins and their grape marcs from three different winemaking techniques. *Food Chem.* 187, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.042>
- 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. *J. Agric. Food Chem.* 66, 11151–11157. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05231>
- Arias-Gil, M., Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C., 2007. Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in

- spontaneous must fermentation. *Food Chem.* 103, 1312–1318. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.037>
- Avanci, N.C., Luche, D.D., Goldman, G.H., Goldman, M.H., 2010. Jasmonates are phytohormones with multiple functions, including plant defense and reproduction. *Genet. Mol. Res.* 9, 484–505. <https://doi.org/10.4238/vol9-1gmr754>
- Azam, M., Bhatti, H.N., Khan, A., Zafar, L., Iqbal, M., 2022. Zinc oxide nano-fertilizer application (foliar and soil) effect on the growth, photosynthetic pigments and antioxidant system of maize cultivar. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 42, 102343. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102343>
- Badawy, M.E.I., Rabea, E.I., 2011. A biopolymer chitosan and its derivatives as promising antimicrobial agents against plant pathogens and their applications in crop protection. *Int. J. Carbohydr. Chem.*, 1–29. <https://doi.org/10.1155/2011/460381>
- Baig, N., Kammakam, I., Falath, W., Kammakam, I., 2021. Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges. *Mater. Adv.* 2, 1821–1871. <https://doi.org/10.1039/d0ma00807a>
- Ballaré, C.L., 2011. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. *Trends Plant Sci.* 16, 249–257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.12.001>
- Bansal, P., Bubel, K., Agarwal, S., Greiner, A., 2012. Water-stable all-biodegradable microparticles in nanofibers by electrospinning of aqueous dispersions for biotechnical plant protection. *Biomacromolecules* 13, 439–444. <https://doi.org/10.1021/bm2014679>
- Bari, R., Jones, J.D.G., 2009. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* 69, 473–488. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9435-0>
- Bastos-Arrieta, J., Florido, A., Pérez-Ràfols, C., Serrano, N., Fiol, N., Poch, J., Villaescusa, I., 2018. Green synthesis of Ag nanoparticles using grape stalk waste extract for the modification of screen-printed electrodes. *Nanomaterials* 8. <https://doi.org/10.3390/nano8110946>
- Battiston, E., Antonielli, L., Di Marco, S., Fontaine, F., Mugnai, L., 2019. Innovative delivery of Cu(II) ions by a nanostructured hydroxyapatite: potential application in planta to enhance the sustainable control of *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 109, 748–759. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-18-0033-R>
- Bautista-Ortín, A.B., Busse-Valverde, N., Fernández-Fernández, J.I., Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., 2016. The extraction kinetics of anthocyanins and proanthocyanidins from grape to wine in three different varieties. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* 50, 91–100. <https://doi.org/10.20870/oenone.2016.50.2.781>

- Bavaresco, L., Mattivi, F., De Rosso, M., Flamini, R., 2012. Effects of elicitors, viticultural factors, and enological practices on resveratrol and stilbenes in grapevine and wine. *Mini-Reviews Med. Chem.* 12, 1366–1381. <https://doi.org/10.2174/13895575112091366>
- 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 Physiol. Biochem.* 46, 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.001>
- Bell, S.J., Henschke, P.A., 2005. Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 11, 242–295. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2005.tb00028.x>
- Berovic, M., Berlot, M., Kralj, S., Makovec, D., 2014. A new method for the rapid separation of magnetized yeast in sparkling wine. *Biochem. Eng. J.* 88, 77–84. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2014.03.014>
- Bettini, S., Santino, A., Valli, L., Giancane, G., 2015. A smart method for the fast and low-cost removal of biogenic amines from beverages by means of iron oxide nanoparticles. *RSC Adv.* 5, 18167–18171. <https://doi.org/10.1039/C5RA01699A>
- Boido, E., Alcalde-Eon, C., Carrau, F., Dellacassa, E., Rivas-Gonzalo, J.C., 2006. Aging effect on the pigment composition and color of *Vitis vinifera* L. Cv. Tannat wines. Contribution of the main pigment families to wine color. *J. Agric. Food Chem.* 54, 6692–6704. <https://doi.org/10.1021/jf061240m>
- Boller, T., Felix, G., 2009. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 379–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>
- Browse, J., 2009. Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 183–205. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092007>
- 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. *J. Agric. Food Chem.* 58, 11333–11339. <https://doi.org/10.1021/jf102265c>
- Cano-López, M., Pardo-Minguez, F., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E., 2006. Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 325–331. <https://doi.org/10.5344/ajev.2006.57.3.325>

- Cao, S., Zheng, Y., Wang, K., Rui, H., Tang, S., 2010. Effect of methyl jasmonate on cell wall modification of loquat fruit in relation to chilling injury after harvest. *Food Chem.* 118, 641–647. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.047>
- Carbone, K., Paliotta, M., Micheli, L., Mazzuca, C., Cacciotti, I., Nocente, F., Ciampa, A., Dell'Abate, M.T., 2019. A completely green approach to the synthesis of dendritic silver nanostructures starting from white grape pomace as a potential nanofactory. *Arab. J. Chem.* 12, 597–609. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.08.001>
- Carpita, N.C., Gibeaut, D.M., 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3, 1–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x>
- Carpita, N.C., McCann, M.C., 2020. Redesigning plant cell walls for the biomass-based bioeconomy. *J. Biol. Chem.* 295, 15144–15157. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.014561>
- Castro-López, L.D.R., Gómez-Plaza, E., Ortega-Regules, A., Lozada, D., Bautista-Ortín, A.B., 2016. Role of cell wall deconstructing enzymes in the proanthocyanidin-cell wall adsorption-desorption phenomena. *Food Chem.* 196, 526–532. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.080>
- Cataldo, E., Fucile, M., Mattii, G.B., 2022. Biostimulants in viticulture: a sustainable approach against biotic and abiotic stresses. *Plants* 11(2):162. <https://doi.org/10.3390/plants11020162>
- Chen, H., Yang, J., Deng, X., Lei, Y., Xie, S., Guo, S., Ren, R., Li, J., Zhang, Z., Xu, T., 2020. Foliar-sprayed manganese sulfate improves flavonoid content in grape berry skin of Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) growing on alkaline soil and wine chromatic characteristics. *Food Chem.* 314, 126182. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126182>
- Cheng, X., Ma, T., Wang, P., Liang, Y., Zhang, J., Zhang, A., Chen, Q., Li, W., Ge, Q., Sun, X., Fang, Y., 2020. Foliar nitrogen application from veraison to preharvest improved flavonoids, fatty acids and aliphatic volatiles composition in grapes and wines. *Food Res. Int.* 137, 109566. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109566>
- Cheyrier, V., Duenas-Paton, M., Salas, E., Maury, C., Souquet, J.-M., Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., 2006. Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* 57, 298–305.
- Chinnici, F., Sonni, F., Natali, N., Galassi, S., Riponi, C., 2009. Colour features and pigment composition of Italian carbonic macerated red wines. *Food Chem.* 113, 651–657. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.055>

- Chira, K., Jourdes, M., Teissedre, P.-L., 2012. Cabernet Sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *Eur. Food Res. Technol.* 234, 253–261. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1627-1>
- Chouhan, R., Rai, G., Gandhi, S.G., 2023. Chapter 10 Plant transcription factors and flavonoid metabolism, in: Srivastava, V., Mishra, S., Mehrotra, S., Upadhyay, S.K.B.T.-P.T.F. (Eds.), *Plant Transcription Factors*. INC, pp. 219–231. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90613-5.00001-7>
- Chronopoulou, L., Donati, L., Bramosanti, M., Rosciani, R., Palocci, C., Pasqua, G., Valletta, A., 2019. Microfluidic synthesis of methyl jasmonate-loaded PLGA nanocarriers as a new strategy to improve natural defenses in *Vitis vinifera*. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54852-1>
- Ciurli, A., Giagnoni, L., Pastorelli, R., Segal, D., Zamboni, A., Renella, G., Varanini, Z., 2022. A novel P nanofertilizer has no impacts on soil microbial communities and soil microbial activity. *Appl. Soil Ecol.* 178, 104570. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104570>
- Clemente, H.S., Kolkas, H., Canut, H., Jamet, E., 2022. Plant cell wall proteomes: the core of conserved protein families and the case of non-canonical proteins. *Int. J. Mol. Sci.* 23(8):4273. <https://doi.org/10.3390/ijms23084273>
- Comisión Europea, 2011. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial. *Off J Eur Union L* 275. <http://data.europa.eu/eli/reco/2011/696/oj>
- Consejo Regulador Denominación de Origen Yecla. <https://yeclavino.com/web/es/vino> (acceso 10/02/2023).
- Cosme, F., Gonçalves, B., Ines, A., Jordão, A.M., Vilela, A. 2016. Grape and wine metabolites: biotechnological approaches to improve wine quality. In Morata, A. y Loira, I. (Eds.). *Grape wine biotechnology*; InTechOpen <https://doi.org/10.5772/64822>
- Costantini, A., Vaudano, E., Pulcini, L., Carafa, T., Garcia-Moruno, E., 2019. An overview on biogenic amines in wine. *Beverages* 5, 19. <https://doi.org/10.3390/beverages5010019>
- Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G. Natural products (secondary metabolites), 2000. In Buchanan, B., Grissem, W., Jones, R. (Eds.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants* (1250–1318). Wiley.
- D’Onofrio, C., Matarese, F., Cuzzola, A., 2018. Effect of methyl jasmonate on the aroma of Sangiovese grapes and wines. *Food Chem.* 242, 352–361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.09.084>

- De Freitas, V., Mateus, N., 2001. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *J. Agric. Food Chem.* 49, 940–945. <https://doi.org/10.1021/jf000981z>
- De Geyter, N., Gholami, A., Goormachtig, S., Goossens, A., 2012. Transcriptional machineries in jasmonate-elicited plant secondary metabolism. *Trends Plant Sci.* 17, 349–359. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.03.001>
- 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. *Carbohydr. Polym.* 4, 89–101. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(84\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0144-8617(84)90016-X)
- 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. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 4837–4846. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1841-4>
- Depuydt, S., Hardtke, C.S., 2011. Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Curr. Biol.* 21, 365–373. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.03.013>
- Dewick, P.M., 2002. The shikimate pathway: aromatic amino acids and phenylpropanoids. In *Medicinal natural products: A biosynthetic approach*. 3rd edition. Wiley. (137–189). <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2010.01.005>
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Dubrovina, A.S., Kiselev, K. V., 2017. Regulation of stilbene biosynthesis in plants. *Planta* 246, 597–623. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2730-8>
- Dušak, P., Benčina, M., Turk, M., Bavčar, D., Košmerl, T., Berovič, M., Makovec, D., 2016. Application of magneto-responsive *Oenococcus oeni* for the malolactic fermentation in wine. *Biochem. Eng. J.* 110, 134–142. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bej.2016.02.016>
- Escribano-Bailón, M.T., Rivas-Gonzalo, J.C., García-Estévez, I., 2019. Chapter 13 - Wine color evolution and stability, In Morata, A. (Ed.). *Red wine technology (195–205)* Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00013-X>
- Fernandes, A., Oliveira, J., Teixeira, N., Mateus, N., De Freitas, V., 2017. A review of the current knowledge of red wine colour. *J. Int. des Sci. la Vigne du Vin* 51, 1–21. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2017.51.1.1604>

- Fernandes, J.C., Goulao, L.F., Amâncio, S., 2016. Regulation of cell wall remodeling in grapevine (*Vitis vinifera* L.) callus under individual mineral stress deficiency. *J. Plant Physiol.* 190, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2015.10.007>
- Fernández, V., Sotiropoulos, T., Brown, P., 2013. Foliar fertilization: scientific principles and field practices . First edit. (12-70) International Fertilizer Industry Association (IFA).
- Ferrara, G., Malerba, A.D., Matarrese, A.M.S., Mondelli, D., Mazzeo, A., 2018. Nitrogen distribution in annual growth of “Italia” table grape vines. *Front. Plant Sci.* 9, 1374. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01374>
- Feynman, R.P., 2011. There’s plenty of room at the bottom. *Resonance* 16, 890–905. <https://doi.org/10.1007/s12045-011-0109-x>
- Flores, G., Blanch, G.P., Ruiz-del-Castillo, M.L. 2013. Isolation of the four methyl jasmonate stereoisomers and their effects on selected chiral volatile compounds in red raspberries. *Food Chem.* 141, 2982–2987. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.05.117>
- Fornara, V., Onelli, E., Sparvoli, F., Rossoni, M., Aina, R., Marino, G., Citterio, S., 2008. Localization of stilbene synthase in *Vitis vinifera* L. during berry development. *Protoplasma* 233, 83–93. <https://doi.org/10.1007/s00709-008-0309-8>
- Fürstenberg-Hägg, J., Zagrobelny, M., Bak, S., 2013. Plant defense against insect herbivores, *Int. J. Mol. Sci.* 14, 10242-10297. <https://doi.org/10.3390/ijms140510242>
- García-Escudero Domínguez, E. 2010. Abonado del viñedo. In *Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Parte II, Abonado de los principales cultivos de España.* (213-221). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- García-Serrano, P., Ruano Criado, S., Lucena Marotta, J.J., Nogales García, M., 2010. *Guía práctica de la fertilización racional de los cultivos en España. Parte I, El suelo, los nutrientes, los fertilizantes y la fertilización.* (41-62; 67-74; 103-106). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.
- Garde-Cerdán, T., Gutiérrez-Gamboa, G., Portu, J., Fernández-Fernández, J.I., Gil-Muñoz, R., 2017. Impact of phenylalanine and urea applications to Tempranillo and Monastrell vineyards on grape amino acid content during two consecutive vintages. *Food Res. Int.* 102, 451–457. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.09.023>
- Garde-Cerdán, T., López, R., Garijo, P., González-Arenzana, L., Gutiérrez, A.R., López-Alfaro, I., Santamaría, P., 2014b. Application of colloidal silver versus sulfur dioxide during vinification and storage of Tempranillo red wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 20, 51–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/ajgw.12050>

- Garde-Cerdán, T., López, R., Portu, J., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., Santamaría, P., 2014a. Study of the effects of proline, phenylalanine, and urea foliar application to Tempranillo vineyards on grape amino acid content. Comparison with commercial nitrogen fertilisers. *Food Chem.* 163, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.04.101>
- Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Lara, J.F., Pardo, F., Ancín-Azplicueta, C., Salinas, M.R., 2009. Study of the evolution of nitrogen compounds during grape ripening . application to differentiate. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2410–2419.
- Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A.M., Lorenzo, C., Lara, J.F., Pardo, F., Salinas, M.R., 2011. Implications of nitrogen compounds during alcoholic fermentation from some grape varieties at different maturation stages and cultivation systems. *Food Chem.* 124, 106–116. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.112>
- Garde-Cerdán, T., Pérez-Álvarez, E.P., Fernández-Fernández, J.I., Gil-Muñoz, R., 2022. Influence of elicitors application to Monastrell and Tempranillo vineyards on grape nitrogen composition over two vintages. *Oeno One* 56, 295–303. <https://doi.org/10.20870/OENO-ONE.2022.56.1.3795>
- Garde-Cerdán, T., Portu, J., López, R., Santamaría, P., 2015. Effect of foliar applications of proline, phenylalanine, urea, and commercial nitrogen fertilizers on stilbene concentrations in Tempranillo musts and wines. *Am. J. Enol. Vitic.* 66, 542–547. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.14128>
- Garde-Cerdán, T., Sáenz de Urturi, I., Rubio-Bretón, P., Marín-San Román, S., Baroja, E., Ramírez-Rodríguez, G.B., Delgado-López, J.M., Pérez-Álvarez, E.P., 2023a. Foliar application of methyl jasmonate and methyl jasmonate supported on nanoparticles: Incidence on grape phenolic composition over two seasons. *Food Chem.* 402, 134244. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134244>
- Garde-Cerdán, T., Itziar, C., Urturi, S. De, Marín, S., Román, S., Murillo, R., 2023b. Influence of foliar treatments with methyl jasmonate and methyl jasmonate-doped nanoparticles on nitrogen composition of Tempranillo grapes during two vintages. *Eur. Food Res. Technol.* 249, 1187-1197. <https://doi.org/10.1007/s00217-023-04206-z>
- Garrido-Bañuelos, G., Buica, A., du Toit, W., 2021. Relationship between anthocyanins, proanthocyanidins, and cell wall polysaccharides in grapes and red wines. A current state-of-art review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 62, 7743-7759 <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1918056>
- Garrido, J., Borges, F., 2013. Wine and grape polyphenols. A chemical perspective. *Food Res. Int.* 54, 1844-1858. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>

- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F., Velasco, R., 2008. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J. Agric. Food Chem.* 56, 11773–11785. <https://doi.org/10.1021/jf8017707>
- Gil-Muñoz, R., Bautista-Ortín, A.B., Ruiz-García, Y., Fernández-Fernández, J.I., Gómez-Plaza, E., 2017b. Improving phenolic and chromatic characteristics of Monastrell, Merlot and Syrah wines by using methyl jasmonate and benzothiadiazole. *Oeno One* 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., 2017a. Elicitors used as a tool to increase stilbenes in grapes and wines. *Food Res. Int.* 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., 2017c. Methyl jasmonate: effect on proanthocyanidin content in Monastrell and Tempranillo grapes and wines. *Eur. Food Res. Technol.* 244, 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 Origen Jumilla during ripening stage. *Int. J. Food Sci. Technol.* 45, 1870–1877. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2010.02340.x>
- Gil-Muñoz, R., Giménez-Bañón, M.J., Moreno-Olivares, J.D., Paladines-Quezada, D.F., Bleda-Sánchez, J.A., Fernández-Fernández, J.I., Parra-Torrejón, B., Ramírez-Rodríguez, G.B., Delgado-López, J.M., 2021. Effect of methyl jasmonate doped nanoparticles on nitrogen composition of Monastrell grapes and wines. *Biomolecules* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3390/biom11111631>
- Gil-Muñoz, R., Paladines-Quezada, D.F., Giménez-Bañón, M.J., Moreno-Olivares, J.D., Bleda-Sánchez, J.A., Fernández-Fernández, J.I., Parra-Torrejón, B., Ramírez-Rodríguez, G.B., Delgado-López, J.M., 2023. The effect of methyl jasmonate-doped nano-particles and methyl jasmonate on the phenolics and quality in monastrell grapes during the ripening period. *Appl. Sci.* 13, 1–18. <https://doi.org/10.3390/app13031906>
- Giménez-Bañón, M.J., Moreno-Olivares, J.D., Paladines-Quezada, D.F., Bleda-Sánchez, J.A., Fernández-Fernández, J.I., Parra-Torrejón, B., Delgado-López, J.M., Gil-Muñoz, R., 2022. Effects of methyl jasmonate and nano-methyl jasmonate treatments on Monastrell wine volatile composition. *Molecules* 27, 2878. <https://doi.org/10.3390/molecules27092878>
- Glories, Y., 1984. La couleur des vins rouges. 1^{re} partie : les équilibres des anthocyanes et des tanins. *Oeno One* 18, 195-217. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.1984.18.3.1751>

- Glories, Y., Saucier, C., 2000. Tannin evolution from grape to wine. Effects on wine taste. Proc. ASEV 50th Anniv. Annu. Meet. 353–355.
- Gobert, A., Tourdot-Maréchal, R., Morge, C., Sparrow, C., Liu, Y., Quintanilla-Casas, B., Vichi, S., Alexandre, H., 2017. Non-*Saccharomyces* yeasts nitrogen source preferences: Impact on sequential fermentation and wine volatile compounds profile. *Front. Microbiol.* 8, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02175>
- Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., García-Romero, E., 2007. Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *J. Agric. Food Chem.* 55, 608–613. <https://doi.org/10.1021/jf062820m>
- 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. *J. Sci. Food Agric.* 97, 977–983. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7823>
- Gooding, M.J., Davies, W.P., 1992. Foliar urea fertilization of cereals: A review. *Fertil. Res.* 32, 209–222. <https://doi.org/10.1007/BF01048783>
- Goulao, L.F., Fernandes, J.C., Lopes, P., Amâncio, S., 2012. Tackling the cell wall of the grape berry. In *The biochemistry of grape berry*. Gerós, H.; Chaves, M.M.; Derot, S.(eds.), Bentham Science Publishers (172–193).
- Gutiérrez-Gamboa, G., Alañón-Sánchez, N., Mateluna-Cuadra, R., Verdugo-Vásquez, N., 2020. An overview about the impacts of agricultural practices on grape nitrogen composition: Current research approaches. *Food Res. Int.* 136, 109477. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109477>
- Gutiérrez-Gamboa, G., Carrasco-Quiroz, M., Martínez-Gil, A.M., Pérez-Álvarez, E.P., Garde-Cerdán, T., Moreno-Simunovic, Y., 2018a. Grape and wine amino acid composition from Carignan noir grapevines growing under rainfed conditions in the Maule Valley, Chile: Effects of location and rootstock. *Food Res. Int.* 105, 344–352. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.021>
- Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Portu, J., Moreno-Simunovic, Y., Martínez-Gil, A.M., 2017b. Foliar nitrogen application in Cabernet Sauvignon vines: Effects on wine flavonoid and amino acid content. *Food Res. Int.* 96, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.03.025>
- 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. *Sci. Hortic.* 244, 257–262. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.09.063>

- Gutiérrez-Gamboa, G., Portu, J., López, R., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T., 2018b. Effects of a combination of elicitation and precursor feeding on grape amino acid composition through foliar applications to Garnacha vineyard. *Food Chem.* 244, 159–163. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.067>
- Gutiérrez-Gamboa, G., Portu, J., Santamaría, P., López, R., Garde-Cerdán, T., 2017a. Effects on grape amino acid concentration through foliar application of three different elicitors. *Food Res. Int.* 99, 688–692. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.022>
- Hanlin, R.L., Downey, M.O., 2009. Condensed tannin accumulation and composition in skin of Shiraz and Cabernet Sauvignon grapes during berry development. *Am. J. Enol. Vitic.* 60, 13 LP – 23. <https://doi.org/10.5344/ajev.2009.60.1.13>
- Hannam, K.D., Neilsen, G.H., Neilsen, D., Midwood, A.J., Millard, P., Zhang, Z., Thornton, B., Steinke, D., 2016. Amino acid composition of grape (*Vitis vinifera* L.) juice in response to applications of urea to the soil or foliage. *Am. J. Enol. Vitic.* 67, 47–55. <https://doi.org/10.5344/ajev.2015.15015>
- Hannam, K.D., Neilsen, G.H., Neilsen, D., Rabie, W.S., Midwood, A.J., Millard, P., 2014. Late-season foliar urea applications can increase berry yeast-assimilable nitrogen in winegrapes (*Vitis vinifera* L.). *Am. J. Enol. Vitic.* 65, 89–95. <https://doi.org/10.5344/ajev.2013.13092>
- Haris, M., Hussain, T., Mohamed, H.I., Khan, A., Ansari, M.S., Tauseef, A., Khan, A.A., Akhtar, N., 2023. Nanotechnology: A new frontier of nano-farming in agricultural and food production and its development. *Sci. Total Environ.* 857, 159639. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.159639>
- 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.). *Aust. J. Grape Wine Res.* 16, 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., 2012. Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules* 17, 1483–1519. <https://doi.org/10.3390/molecules17021483>
- Hellström, J.K., Törrönen, A.R., Mattila, P.H., 2009. Proanthocyanidins in common food products of plant origin. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7899–7906. <https://doi.org/10.1021/jf901434d>
- 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 Chem.* 146, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.037>
- Hirano, S., 1999. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. *Polym. Int.* 48, 732–734. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0126\(199908\)48:8<732::aid-pi211>3.0.co;2-u](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0126(199908)48:8<732::aid-pi211>3.0.co;2-u)
- 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. *Sci. Hortic.* 104, 249–263. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2004.09.002>
- Hui, Y., Wang, J., Jiang, T., Ma, T., Wang, R., 2021. Effect of nitrogen regulation on berry quality and flavonoids during veraison stage. *Food Sci. Nutr.* 9, 5448–5456. <https://doi.org/10.1002/fsn3.2503>
- Izquierdo-Cañas, P.M., García-Romero, E., Huertas-Nebreda, B., Gómez-Alonso, S., 2012. Colloidal silver complex as an alternative to sulphur dioxide in winemaking. *Food Control* 23, 73–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.06.014>
- Jalili, I., Ebadi, A., Askari, M.A., KalatehJari, S., Aazami, M.A., 2023. Foliar application of putrescine, salicylic acid, and ascorbic acid mitigates frost stress damage in *Vitis vinifera* cv. 'Giziluzum'. *BMC Plant Biol.* 23, 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12870-023-04126-w>
- Jarvis, M.C., 1984. Structure and properties of pectin gels in plant cell walls. *Plant, Cell Environ.* 7, 153–164. <https://doi.org/10.1111/1365-3040.ep11614586>
- Jean-Denis, J.B., Pezet, R., Tabacchi, R., 2006. Rapid analysis of stilbenes and derivatives from downy mildew-infected grapevine leaves by liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1112, 263–268. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.060>
- Jordão, A.M., Ricardo-da-Silva, J.M., 2018. Evolution of proanthocyanidins during grape maturation, winemaking, and aging process of red wines. In Morata, A. (Ed.). *Red wine technology* (177-193). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00012-8>
- Kapteyn, J.C., Van Den Ende, H., Klis, F.M., 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1426, 373–383. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(98\)00137-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(98)00137-8)
- 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. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5348–5355. <https://doi.org/10.1021/jf010758h>

- Kennedy, J.A., Jones, G.P., 2001. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1740–1746. <https://doi.org/10.1021/jf001030o>
- Kennedy, J.A., Matthews, M.A., Waterhouse, A.L., 2000. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 55, 77–85. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00196-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00196-5)
- Khalili, N., Oraei, M., Gohari, G., Panahirad, S., Nourafcan, H., Hano, C., 2022. Chitosan-enriched salicylic acid nanoparticles enhanced anthocyanin content in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Red Sultana) berries. *Polymers*. 14, 3349. <https://doi.org/10.3390/polym14163349>
- Kim, S.A., Oh, S.K., Ahn, S.Y., Yun, H.K., 2018. Expression of flavonoid and stilbene synthesis genes in grape berries is affected by high temperature. *Hortic. Sci. Technol.* 36, 607–618. <https://doi.org/10.12972/KJHST.20180061>
- Klarzynski, O., Fritig, B., 2001. Stimulation of plant natural defenses. *C. R. Acad. Sci. III.* 324, 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., 1977. Influence of temperature, solar radiation and nitrogen on coloration and composition of emperor grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 28, 96-103. <https://doi.org/10.5344/ajev.1974.28.2.96>
- Koyama, R., Roberto, S.R., de Souza, R.T., Borges, W.F.S., Anderson, M., Waterhouse, A.L., Cantu, D., Fidelibus, M.W., Blanco-Ulate, B., 2018. Exogenous abscisic acid promotes anthocyanin biosynthesis and increased expression of flavonoid synthesis genes in *Vitis vinifera* × *Vitis labrusca* table grapes in a subtropical region. *Front. Plant Sci.* 9, 323. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00323>
- Lambert, S.G., Asenstorfer, R.E., Williamson, N.M., Iland, P.G., Jones, G.P., 2011. Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chem.* 125, 106–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.08.045>
- Landi, S., Esposito, S., 2017. Nitrate uptake affects cell wall synthesis and modeling. *Front. Plant Sci.* 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01376>
- Lang, C.P., Merkt, N., Klaiber, I., Pfannstiel, J., Zörb, C., 2019. Different forms of nitrogen application affect metabolite patterns in grapevine leaves and the sensory of wine. *Plant Physiol. Biochem.* 143, 308–319. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.09.009>
- Langcake, P., Pryce, R.J., 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 77–86. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-4059\(76\)90077-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0048-4059(76)90077-1)

- 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. *Am. J. Enol. Vitic.* 54, 63–66.
- Lasa, B., Menendez, S., Sagastizabal, K., Cervantes, M.E.C., Irigoyen, I., Muro, J., Aparicio-Tejo, P.M., Ariz, I., 2012. Foliar application of urea to “Sauvignon Blanc” and “Merlot” vines: Doses and time of application. *Plant Growth Regul.* 67, 73–81. <https://doi.org/10.1007/s10725-012-9667-5>
- Lesschaeve, I., Noble, A.C., 2005. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 330-335. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.330S>
- Li, X., Zhao, J., Walk, T.C., Liao, H., 2014. Characterization of soybean β -expansin genes and their expression responses to symbiosis, nutrient deficiency, and hormone treatment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 2805–2817. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5240-z>
- Liu, H., Li, X., Xiao, J., Wang, S., 2012. A convenient method for simultaneous quantification of multiple phytohormones and metabolites: Application in study of rice-bacterium interaction. *Plant Methods* 8, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-2>
- Lonvaud-Funel, A., 2016. Undesirable compounds and spoilage microorganisms in wine. In Moreno-Arribas, M.V., Bartolomé Suáldea, B. (Eds.). *Wine safety, consumer preference, and human health* (3-26). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-24514-0_1
- Mahdavi, S., Karimi, R., Goudarzi, A.V., 2022. Effect of nano zinc oxide, nano zinc chelate and zinc sulfate on vineyard soil Zn availability and grapevines (*Vitis vinifera* L.) yield and quality. *J. Plant Nutr.* 45, 1961–1976. <https://doi.org/10.1080/01904167.2022.2046081>
- Malone, T.C., Newton, A., 2020. The globalization of cultural eutrophication in the coastal ocean: causes and consequences. *Front. Mar. Sci.* 7, 1–30. <https://doi.org/10.3389/fmars.2020.00670>
- MAPA, 2021. Aplicación del régimen de autorizaciones de nuevas plantaciones de viñedo 2020 y potencial de producción vitícola en España (a 31 de julio 2020). Madrid.
- Marchive, C., León, C., Kappel, C., Coutos-Thévenot, P., Corio-Costet, M.F., Delrot, S., Lauvergeat, V., 2013. Over-expression of VvWRKY1 in grapevines induces expression of jasmonic acid pathway-related genes and confers higher tolerance to the downy mildew. *PLoS One* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054185>
- Marín-San Román, S., Pérez-Álvarez, E.P., Saenz de Urturi, I., Parra Torrejon, B., Ramírez-Rodríguez, G.B., Delgado-López, M., Garde-Cerdán, T., 2023. Changes on grape aroma composition as a consequence of foliar application of methyl jasmonate and nano-sized

- particles doped with methyl jasmonate. *Appl. Sci.* 13, 2487. <https://doi.org/10.3390/app13042487>
- Marín, D., Armengol, J., Carbonell-Bejerano, P., Escalona, J.M., Gramaje, D., Hernández-Montes, E., Intrigliolo, D.S., Martínez-Zapater, J.M., Medrano, H., Mirás-Avalos, J.M., Palomares-Rius, J.E., Romero-Azorín, P., Savé, R., Santesteban, L.G., de Herralde, F., 2021. Challenges of viticulture adaptation to global change: tackling the issue from the roots. *Aust. J. Grape Wine Res.* 27, 8–25. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12463>
- Marowa, P., Ding, A., Kong, Y., 2016. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Rep.* 35, 949–965. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1948-4>
- Martínez-Cutillas, A., Ruiz-García, L., Fernández-Fernández, J.I. 2018. Material vegetal de Monastrell. In Martínez-Cutillas, A. y Riquelme, F. (Eds.), *El Libro de la Monastrell* (45–70). Cofradía del Vino Reino de la Monastrell.
- Martínez-Lapuente, L., Garde-Cerdán, T., Pérez-álvarez, E.P., Guadalupe, Z., Parra-Torrejón, B., Ayestarán, B., 2023. Foliar applications to vines of methyl jasmonate and nanoparticles doped with methyl jasmonate: impact on grape and wine polysaccharide composition. *Oeno One* 57, 1–14. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2023.57.1.7163>
- Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Pérez-Porras, P., Bautista-Ortín, A.B., Gómez-Plaza, E., Ayestarán, B., 2021. Effect of sonication treatment and maceration time in the extraction of polysaccharide compounds during red wine vinification. *Molecules* 26, 4452. <https://doi.org/10.3390/molecules26154452>
- Martínez-Márquez, A., 2016. Diversificación de la producción de estilbenos en cultivos celulares de vid mediante ingeniería metabólica. (Tesis Doctoral) Universidad de Alicante. Alicante-España
- Martínez, J.A., Melgosa, M., Pérez, M.M., Hita, E., Negueruela, A.I., 2001. Note. Visual and instrumental color evaluation in red wines. *Food Sci. Technol. Int.* 7, 439–444. <https://doi.org/10.1106/VFAT-5REN-1WK2-5JGQ>
- Martins, V., Garcia, A., Costa, C., Sottomayor, M., Gerós, H., 2018. Calcium and hormone driven regulation of secondary metabolism and cell wall enzymes in grape berry cells. *J. Plant Physiol.* 231, 57–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jplph.2018.08.011>
- Matus, J.T., Loyola, R., Vega, A., Peña-Neira, A., Bordeu, E., Arce-Johnson, P., Alcalde, J.A., 2009. Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *J. Exp. Bot.* 60, 853–867. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern336>

- Mierczynska-Vasilev, A., Mierczynski, P., Maniukiewicz, W., Visalakshan, R.M., Vasilev, K., Smith, P.A., 2019. Magnetic separation technology: Functional group efficiency in the removal of haze-forming proteins from wines. *Food Chem.* 275, 154–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.046>
- Mira de Orduña, R., 2010. Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Res. Int.* 43, 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
- Mnich, E., Bjarnholt, N., Eudes, A., Harholt, J., Holland, C., Jørgensen, B., Larsen, F.H., Liu, M., Manat, R., Meyer, A.S., Mikkelsen, J.D., Motawia, M.S., Muschiol, J., Møller, B.L., Møller, S.R., Perzon, A., Petersen, B.L., Ravn, J.L., Ulvskov, P., 2020. Phenolic cross-links: Building and de-constructing the plant cell wall. *Nat. Prod. Rep.* 37, 919–961. <https://doi.org/10.1039/c9np00028c>
- Modesti, M., Macaluso, M., Taglieri, I., Bellincontro, A., Sanmartin, C., 2021. Ozone and bioactive compounds in grapes and wine. *Foods* 10, 1–14. <https://doi.org/10.3390/foods10122934>
- Monteiro, A.C.A., de Resende, M.L.V., Valente, T.C.T., Ribeiro Junior, P.M., Pereira, V.F., da Costa, J.R., da Silva, J.A.G., 2016. Manganese phosphite in coffee defence against hemileia vastatrix, the coffee rust fungus: Biochemical and molecular analyses. *J. Phytopathol.* 164, 1043–1053. <https://doi.org/10.1111/jph.12525>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Calderón, F., Suárez, J.A., 2006. Effects of pH, temperature and SO₂ on the formation of pyranoanthocyanins during red wine fermentation with two species of *Saccharomyces*. *Int. J. Food Microbiol.* 106, 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.019>
- Morata, A., Gómez-Cordovés, M.C., Colomo, B., Suárez, J.A., 2003. Pyruvic acid and acetaldehyde production by different strains of *Saccharomyces cerevisiae*: relationship with vitisin A and B formation in red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51, 7402–7409. <https://doi.org/10.1021/jf0304167>
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., 2009a. Nitrogen compounds. In Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.). *Wine Chemistry and Biochemistry* (161-162). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_8
- Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C., 2009b. Amino acids and biogenic amines. In Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (Eds.). *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer International Publishing (163–189). https://doi.org/10.1007/978-0-387-74118-5_9
- Moreno-Olivares, J.D., Paladines-Quezada, D.F., Giménez-Bañón, M.J., Bleda-Sánchez, J.A., Cebrián-Pérez, A., Gómez-Martínez, J.C., Gil-Muñoz, R., 2023. Proanthocyanidins

- composition in new varieties descended from Monastrell. *J. Sci. Food Agric.* 103, 5039–5049. <https://doi.org/10.1002/jsfa.12578>
- Moreno-Olivares, J.D., Paladines-Quezada, D.F., Giménez-Bañón, M.J., Cebrián-Pérez, A., Fernández-Fernández, J.I., Gómez-Martínez, J.C., Bleda-Sánchez, J.A., Gil-Muñoz, R., 2022. Cell wall characterization of new Monastrell hybrid descendants and their phenolic wine composition. *Eur. Food Res. Technol.* 248, 1253–1265. <https://doi.org/10.1007/s00217-022-03966-4>
- 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
- Mori, K., Goto-Yamamoto, N., Kitayama, M., Hashizume, K., 2007. Loss of anthocyanins in red-wine grape under high temperature. *J. Exp. Bot.* 58, 1935–1945. <https://doi.org/10.1093/jxb/erm055>
- Murphy, C.J., Jana, N.R., 2002. Controlling the aspect ratio of inorganic nanorods and nanowires. *Adv. Mater.* 14, 80–82. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/1521-4095\(20020104\)14:1<80::AID-ADMA80>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/1521-4095(20020104)14:1<80::AID-ADMA80>3.0.CO;2-#)
- Muthamilarasan, M., Prasad, M., 2013. Plant innate immunity: an updated insight into defense mechanism. *J. Biosci.* 38, 433–449. <https://doi.org/10.1007/s12038-013-9302-2>
- Naik, P.M., Al-Khayri, J.M., 2016. Abiotic and biotic elicitors—role in secondary metabolites production through in vitro culture of medicinal plants. In *Abiotic and biotic stress in plants—Recent advances and future perspectives*. Shanker, A. y Shanker, C. (Eds.) Intech <https://doi.org/10.5772/61442>
- Napoleão, T.A., Soares, G., Vital, C.E., Bastos, C., Castro, R., Loureiro, M.E., Giordano, A., 2017. Methyl jasmonate and salicylic acid are able to modify cell wall but only salicylic acid alters biomass digestibility in the model grass *Brachypodium distachyon*. *Plant Sci.* 263, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.06.014>
- 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, 93–100. <https://doi.org/10.1007/s004250050169>
- Ogden, M., Hoefgen, R., Roessner, U., Persson, S., Khan, G.A., 2018. Feeding the walls: How does nutrient availability regulate cellwall composition? *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2691. <https://doi.org/10.3390/ijms19092691>
- 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. *Anal. Chim. Acta* 563, 26–32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.024>
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros García, J.M., Bautista-Ortín, A.B., López-Roca, J.M., Fernández-Fernández, J.I., Gómez-Plaza, E., 2008c. Anthocyanins and tannins in four grape varieties (*Vitis vinifera* L.) evolution of their content and extractability. *Oeno One* 42, 147–156. <https://doi.org/10.20870/oeno-one.2008.42.3.818>
- Ortega-Regules, A., Ros-García, J. M., Bautista-Ortín, A.B., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E., 2008a. Changes in skin cell wall composition during the maturation of four premium wine grape varieties. *J. Sci. Food Agric.* 88, 420–428. <https://doi.org/10.1002/jsfa>
- Ortega-Regules, A., Ros-García, J.M., Bautista-Ortín, A.B., López-Roca, J.M., Gómez-Plaza, E., 2008b. Differences in morphology and composition of skin and pulp cell walls from grapes (*Vitis vinifera* L.): Technological implications. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 223–231. <https://doi.org/10.1007/s00217-007-0714-9>
- Paladines-Quezada, D.F., 2021. Optimización del momento de aplicación de elicitores para mejorar la calidad de las uvas y vinos de la variedad Monastrell. (Tesis Doctoral). Universidad de Murcia. Murcia-España.
- Paladines-Quezada, D.F., Fernández-Fernández, J.I., Moreno-Olivares, J.D., Bleda-Sánchez, J.A., Gómez-Martínez, J.C., Martínez-Jiménez, J.A., Gil-Muñoz, R., 2021. Application of elicitors in two ripening periods of *Vitis vinifera* L. cv Monastrell: influence on anthocyanin concentration of grapes and wines. *Molecules* 26, 1689. <https://doi.org/10.3390/molecules26061689>.
- Paladines-Quezada, D. F., Moreno-Olivares, J.D., Fernández-Fernández, J.I., Bautista-Ortín, A.B., Gil-Muñoz, R., 2019b. Influence of methyl jasmonate and benzothiadiazole on the composition of grape skin cell walls and wines. *Food Chem.* 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., Gil-Muñoz, R., 2022. Application of elicitors at two maturation stages of *Vitis vinifera* L. cv Monastrell: Changes in skin cell walls. *Chemistry*, 4, 98 -111. <https://doi.org/10.3390/chemistry4010008>.
- Paladines-Quezada, D. F., Moreno-Olivares, J.D., Fernández-Fernández, J.I., Bleda-Sánchez, J.A., Martínez-Moreno, A., Gil-Muñoz, R., 2019a. Elicitors and pre-fermentative cold maceration: Effects on polyphenol concentration in Monastrell grapes and wines. *Biomolecules*, 9, 671. <https://doi.org/10.3390/biom9110671>
- Parra-Torrejón, B., Ramírez-Rodríguez, G.B., Giménez-Bañón, M.J., Moreno-Olivares, J.D., Paladines-Quezada, D.F., Gil-Muñoz, R., Delgado-López, J.M., 2021. Nanoelicitors with

- prolonged retention and sustained release to produce beneficial compounds in wines. *Environ. Sci. Nano* 8, 3524–3535. <https://doi.org/10.1039/d1en00504a>
- Pérez-Álvarez, E.P., Ramírez-Rodríguez, G.B., Carmona, F.J., Martínez-Vidaurre, J.M., Masciocchi, N., Guagliardi, A., Garde-Cerdán, T., Delgado-López, J.M., 2021. Towards a more sustainable viticulture: foliar application of N-doped calcium phosphate nanoparticles on Tempranillo grapes. *J. Sci. Food Agric.* 101, 1307–1313. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10738>
- Pérez-Álvarez, E. P., Rubio-Bretón, P., Intrigliolo, D.S., Parra-Torrejón, B., Ramírez-Rodríguez, G.B., Delgado-López, J.M., Garde-Cerdán, T., 2022a. Year, watering regime and foliar methyl jasmonate doped nanoparticles treatments: Effects on must nitrogen compounds in Monastrell grapes. *Sci. Hortic.* 297, 110944. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.110944>
- Pérez-Álvarez, E. P., Sáenz de Urturi, I., Rubio-Bretón, P., Marín-San Román, S., Murillo-Peña, R., Parra-Torrejón, B., Ramírez-Rodríguez, G.B., Delgado-López, J.M., Garde-Cerdán, T., 2022b. Application of elicitors, as conventional and nano forms, in viticulture: effects on phenolic, aromatic and nitrogen composition of Tempranillo wines. *Beverages* 8, 56. <https://doi.org/10.3390/beverages8030056>
- Pérez-de-Luque, A., 2017. Interaction of nanomaterials with plants: What do we need for real applications in agriculture? *Front. Environ. Sci.* 5, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2017.00012>
- Pérez-de-Luque, A., Hermosín, M.C., 2013. Nanotechnology and its Use in Agriculture. In *Bio-Nanotechnology: A revolution in food, biomedical and health sciences*. Bagchi, D. Bagchi, M., Moriyama, H., Shahidi, F. (Eds.) Wiley (383–398). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118451915.ch20>
- Pérez-Lamela, C., García-Falcón, M.S., Simal-Gándara, J., Orriols-Fernández, I., 2007. Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chem.* 101, 601–606. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.020>
- Pérez-Porras, P., Bautista-Ortín, A.B., Jurado, R., Gómez-Plaza, E., 2022a. Combining high-power ultrasound and enological enzymes during winemaking to improve the chromatic characteristics of red wine. *Lwt-Food Sci. Technol.* 156, 113032. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113032>
- Pérez-Porras, P., Gómez-Plaza, E., Muñoz García, R., Díaz-Maroto, M.C., Moreno-Olivares, J.D., Bautista-Ortín, A.B., 2022b. Prefermentative grape microwave treatment as a tool for increasing red wine phenolic content and reduce maceration time. *Appl. Sci.* 12, 8164. <https://doi.org/10.3390/app12168164>

- Portal estadístico de la Región de Murcia, 2023. https://econet.carm.es/web/crem/inicio/-/crem/sicrem/PU590/sec17_c23.html (acceso 20/03/2023).
- Portu, J., González-Arenzana, L., Hermosín-Gutiérrez, I., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T., 2015a. Phenylalanine and urea foliar applications to grapevine: Effect on wine phenolic content. *Food Chem.* 180, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.008>
- Portu, J., López-Alfaro, I., Gómez-Alonso, S., López, R., Garde-Cerdán, T., 2015b. Changes on grape phenolic composition induced by grapevine foliar applications of phenylalanine and urea. *Food Chem.* 180, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.042>
- Portu, J., López, R., Baroja, E., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T., 2016. Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. *Food Chem.* 201, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.086>
- Portu, J., López, R., Ewald, P., Santamaría, P., Winterhalter, P., Garde-Cerdán, T., 2018a. Evaluation of Grenache, Graciano and Tempranillo grape stilbene content after field applications of elicitors and nitrogen compounds. *J. Sci. Food Agric.* 98, 1856–1862. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8662>
- Portu, J., López, R., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T., 2018b. Methyl jasmonate treatment to increase grape and wine phenolic content in Tempranillo and Graciano varieties during two growing seasons. *Sci. Hortic.* 240, 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.06.019>
- Portu, J., López, R., Santamaría, P., Garde-Cerdán, T., 2017. Elicitation with methyl jasmonate supported by precursor feeding with phenylalanine: Effect on Garnacha grape phenolic content. *Food Chem.* 237, 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.126>
- Portu, J., Santamaría, P., López-Alfaro, I., López, R., Garde-Cerdán, T., 2015c. Methyl jasmonate foliar application to Tempranillo vineyard improved grape and wine phenolic content. *J. Agric. Food Chem.* 63, 2328–2337. <https://doi.org/10.1021/jf5060672>
- Radman, R., Saez, T., Bucke, C., Keshavarz, T., 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 37, 91–102. <https://doi.org/10.1042/ba20020118>
- Ralph, J., Lapierre, C., Boerjan, W., 2019. Lignin structure and its engineering. *Curr. Opin. Biotechnol.* 56, 240–249. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.02.019>
- Ramírez-Rodríguez, G.B., Dal Sasso, G., Carmona, F.J., Miguel-Rojas, C., Pérez-De-Luque, A., Masciocchi, N., Guagliardi, A., Delgado-López, J.M., 2020. Engineering biomimetic calcium phosphate nanoparticles: a green synthesis of slow-release multinutrient (NPK) Nanofertilizers. *ACS Appl. Bio Mater.* 3, 1344–1353. <https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00937>

- Ranty, B., Aldon, D., Cotelle, V., Galaud, J.P., Thuleau, P., Mazars, C., 2016. Calcium sensors as key hubs in plant responses to biotic and abiotic stresses. *Front. Plant Sci.* 7, 1–7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00327>
- 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.
- Rinaldo, A.R., Cavallini, E., Jia, Y., Moss, S.M.A., McDavid, D.A.J., Hooper, L.C., Robinson, S.P., Tornielli, G.B., Zenoni, S., Ford, C.M., Boss, P.K., Walker, A.R., 2015. A grapevine anthocyanin acyltransferase, transcriptionally regulated by VvMYBA, can produce most acylated anthocyanins present in grape skins. *Plant Physiol.* 169, 1897–1916. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01255>
- Roberts, A.G., Oparka, K.J., 2003. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant. Cell Environ.* 26, 103–124. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.00950.x>
- Romero-Azorín, P., García-García, J., 2020. The productive, economic, and social efficiency of vineyards using combined drought-tolerant rootstocks and efficient low water volume deficit irrigation techniques under mediterranean semiarid conditions. *Sustain.* 12, 1930. <https://doi.org/10.3390/su12051930>
- Romero-Azorín, P., Navarro, J.M., Ordaz, P.B., 2022. Towards a sustainable viticulture: The combination of deficit irrigation strategies and agroecological practices in Mediterranean vineyards. A review and update. *Agric. Water Manag.* 259, 107216. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2021.107216>
- Rui, Y., Dinneny, J.R., 2020. A wall with integrity: surveillance and maintenance of the plant cell wall under stress. *New Phytol.* 225, 1428–1439. <https://doi.org/10.1111/nph.16166>
- Ruiz-García, Y., Gómez-Plaza, E., 2013. Elicitors: A tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture* 3, 33–52. <https://doi.org/10.3390/agriculture3010033>
- 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. *Am. J. Enol. Vitic.* 64, 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. *J. Agric. Food Chem.* 60, 1283–1290. <https://doi.org/10.1021/jf204028d>

- Sabir, A., Yazar, K., Sabir, F., Kara, Z., Yazici, M.A., Goksu, N., 2014. Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations. *Sci. Hortic.* 175, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2014.05.021>
- Sánchez-Sánchez, M. A., Belmonte-Serrato, F., Ballesteros-Pelegrín, G., 2017. Localización y caracterización de los paisajes de viñedo en la región de Murcia. In *Estudios de paisagem* (335-357). Faculdade de Ciências Sociais se Humanas. Universidade nova de Lisboa.
- Sardar, M., Ahmed, Waqas, Al Ayoubi, S., Nisa, S., Bibi, Y., Sabir, M., Khan, M.M., Ahmed, Waseem, Qayyum, A., 2022. Fungicidal synergistic effect of biogenically synthesized zinc oxide and copper oxide nanoparticles against *Alternaria citri* causing citrus black rot disease. *Saudi J. Biol. Sci.* 29, 88–95. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.08.067>
- Saritha, G.N.G., Anju, T., Kumar, A., 2022. Nanotechnology-Big impact: How nanotechnology is changing the future of agriculture? *J. Agric. Food Res.* 10, 100457. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100457>
- Sasaki, Y., Asamizu, E., Shibata, D., Nakamura, Y., Kaneko, T., Awai, K., Amagai, M., Kuwata, C., Tsugane, T., Masuda, T., Shimada, H., Takamiya, K., Ohta, H., Tabata, S., 2001. Monitoring of methyl jasmonate-responsive genes in arabidopsis by cDNA macroarray: self-activation of jasmonic acid biosynthesis and crosstalk with other phytohormone signaling pathways. *DNA Res.* 8, 153–161. <https://doi.org/10.1093/dnares/8.4.153>
- Sattelmacher, B., 2001. The apoplast and its significance for plant mineral nutrition. *New Phytol.* 149, 167–192. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2001.00034.x>
- Schnee, S., Viret, O., Gindro, K., 2008. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 72, 128–133. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.07.002>
- Schneider, K.-H., Karpov, A., Voss, H., Dunker, S., Merk, Mi., Kopf, A., Kondo, S., 2010. Method for treating phytopathogenic microorganisms using surface-modified nanoparticulate copper salts.
- Schreiner, R.P., Lee, J., Skinkis, P.A., 2013. N, P, and K supply to Pinot Noir grapevines: impact on vine nutrient status, growth, physiology, and yield. *Am. J. Enol. Vitic.* 64, 26–38. <https://doi.org/10.5344/ajev.2012.12064>
- Scott, R.W., 1979. Colorimetric determination of hexuronic acids in plant materials. *Anal. Chem.* 51, 936–941. <https://doi.org/10.1021/ac50043a036>

- Sembdner, G., Parthier, B., 1993. The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 569–589. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.44.060193.003033>
- Sett, S., Lee, M.W., Weith, M., Pourdeyhimi, B., Yarin, A.L., 2015. Biodegradable and biocompatible soy protein/polymer/adhesive sticky nano-textured interfacial membranes for prevention of esca fungi invasion into pruning cuts and wounds of vines. *J. Mater. Chem. B* 3, 2147–2162. <https://doi.org/10.1039/C4TB01887G>
- Seybold, H., Trempel, F., Ranf, S., Scheel, D., Romeis, T., Lee, J., 2014. Ca²⁺ signalling in plant immune response: From pattern recognition receptors to Ca²⁺ decoding mechanisms. *New Phytol.* 204, 782–790. <https://doi.org/10.1111/nph.13031>
- Song, M., Cui, S., Gao, F., Liu, Y.-R., Fan, C., Lei, T., Liu, D., 2012. Dispersible silica nanoparticles as carrier for enhanced bioactivity of chlorfenapyr. *J. Pestic. Sci.* 37, 258–260.
- Su, L., Fang, L., Zhu, Z., Zhang, L., Sun, X., Wang, Y., Wang, Q., Li, S., Xin, H., 2020. The transcription factor VaNAC17 from grapevine (*Vitis amurensis*) enhances drought tolerance by modulating jasmonic acid biosynthesis in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* 39, 621–634. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02519-x>
- Sun, B., Ribes, A.M., Leandro, M.C., Belchior, A.P., Spranger, M.I., 2006. Stilbenes: Quantitative extraction from grape skins, contribution of grape solids to wine and variation during wine maturation. *Anal. Chim. Acta* 563, 382–390. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.12.002>
- Taurino, M., Ingrosso, I., D'amico, L., De Domenico, S., Nicoletti, I., Corradini, D., Santino, A., Giovinazzo, G., 2015. Jasmonates elicit different sets of stilbenes in *Vitis vinifera* cv. Negramaro cell cultures. *SpringerPlus* 4, 49. <https://doi.org/10.1186/s40064-015-0831-z>
- Temido, J. V, Conceição, A.C.L., Geraldés, V., Maria, A., Alves, B., 2015. Development of a nanofiltration process to remove volatile acidity in wines. Técnico Lisboa. <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/844820067124921/Development%20of%20a%20nanofiltration%20process%20to%20remove%20volatile%20acidity%20in%20wines.pdf> (Acceso 25/02/2023).
- Tenhaken, R., 2015. Cell wall remodeling under abiotic stress. *Front. Plant Sci.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00771>
- Trenkel, M., 2010. Slow and controlled-release and stabilized fertilizers: An option for enhancing nutrient efficiency in agriculture. Second edit. International Fertilizer Industry Association (IFA), .

- Tsurkan, M. V., Voronkina, A., Khrunyk, Y., Wysokowski, M., Petrenko, I., Ehrlich, H., 2021. Progress in chitin analytics. *Carbohydr. Polym.* 252, 117204. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117204>
- Ugarte, P., Agosin, E., Bordeu, E., Villalobos, J.I., 2005. Reduction of 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol concentration in red wines using reverse osmosis and adsorption. *Am. J. Enol. Vitic.* 56, 30–36. <https://doi.org/10.5344/ajev.2005.56.1.30>
- Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, S.A., Rehman, H. ur, Ashraf, I., Sanaullah, M., 2020. Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. *Sci. Total Environ.* 721, 137778. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>
- Velásquez, A., Valenzuela, M., Carvajal, M., Fiaschi, G., Avio, L., Giovannetti, M., D'Onofrio, C., Seeger, M., 2020. The arbuscular mycorrhizal fungus *Funneliformis mosseae* induces changes and increases the concentration of volatile organic compounds in *Vitis vinifera* cv. Sangiovese leaf tissue. *Plant Physiol. Biochem.* 155, 437–443. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.06.048>
- Vicens, A., David, F., Williams, P., Sidhoum, L., Moutounet, M., Docco, T., 2009. Changes in polysaccharide and protein composition of cell walls in grape berry skin (cv. Shiraz) during ripening and over-ripening. *J. Agric. Food Chem.* 57, 2955–2960. <https://doi.org/10.1021/jf803416w>
- Vidal, M., Blouin, J., 1978. Dosage colorimétrique rapide de l'acide tartrique dans les mouts et les vins. *Rev. Fr. d'Enol.* 16, 39–46.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., Waters, E.J., 2003. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *J. Sci. Food Agric.* 83, 564–573. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1394>
- 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. *Carbohydr. Polym.* 45, 315–323. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(00\)00285-X](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(00)00285-X)
- Voragen, A.G.J., Coenen, G.J., Verhoef, R.P., Schols, H.A., 2009. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls. *Struct. Chem.* 20, 263–275. <https://doi.org/10.1007/s11224-009-9442-z>
- Wang, L., Ma, L., Xi, H., Duan, W., Wang, J., Li, S., 2013. Individual and combined effects of CaCl₂ and UV-C on the biosynthesis of resveratrol in grape leaves and berry skins. *J. Agric. Food Chem.* 61, 7135–7141. <https://doi.org/10.1021/jf401220m>

- Wang, P., Lombi, E., Zhao, F.J., Kopittke, P.M., 2016. Nanotechnology: A new opportunity in plant sciences. *Trends Plant Sci.* 21, 699–712. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.04.005>
- Wang, W., Tang, K., Yang, H.R., Wen, P.F., Zhang, P., Wang, H.L., Huang, W.D., 2010. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.12.002>
- Wang, X., Xie, H., Wang, P., Yin, H., 2023. Nanoparticles in plants: uptake, transport and physiological activity in leaf and root. *Materials* 16, 3097. <https://doi.org/10.3390/ma16083097>
- Wang, X., Xie, H., Wang, Z., He, K., Jing, D., 2019. Graphene oxide as a multifunctional synergist of insecticides against lepidopteran insect. *Environ. Sci. Nano* 6, 75–84. <https://doi.org/10.1039/C8EN00902C>
- Wasternack, C., Hause, B., 2013. Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann. Bot.* 111, 1021–1058. <https://doi.org/10.1093/aob/mct067>
- Witte, C.P., Tiller, S.A., Taylor, M.A., Davies, H. V., 2002. Leaf urea metabolism in potato. Urease activity profile and patterns of recovery and distribution of ¹⁵N after foliar urea application in wild-type and urease-antisense transgenics. *Plant Physiol.* 128, 1129–1136. <https://doi.org/10.1104/pp.010506>
- Zahedi, S.M., Abolhassani, M., Hadian-Deljou, M., Feyzi, H., Akbari, A., Rasouli, F., Koçak, M.Z., Kulak, M., Gohari, G., 2023. Proline-functionalized graphene oxide nanoparticles (GO-Pro NPs): A new engineered nanoparticle to ameliorate salinity stress on grape (*Vitis vinifera* L. cv Sultana). *Plant Stress* 7, 100128. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stress.2022.100128>
- Zhang, W., Wu, L., Ding, Y., Yao, X., Wu, X., Weng, F., Li, G., Liu, Z., Tang, S., Ding, C., Wang, S., 2017. Nitrogen fertilizer application affects lodging resistance by altering secondary cell wall synthesis in japonica rice (*Oryza sativa*). *J. Plant Res.* 130, 859–871. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-0943-3>