

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID



**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE
INGENIERÍAS AGRARIAS DE PALENCIA**

TRABAJO FIN DE MASTER

**EFFECTO DEL PERFIL FENÓLICO SOBRE LAS
CARACTERÍSTICAS ANTIOXIDANTES DE VINOS
TINTOS**

MÁSTER EN CALIDAD, DESARROLLO E INNOVACIÓN DE ALIMENTOS

ALUMNO: MARTA CAÑIBANO ALBEROLA

TUTORES: ENCARNACIÓN FERNÁNDEZ FERNÁNDEZ

JOSÈ MANUEL RODRÍGUEZ NOGALES

SEPTIEMBRE, 2012

ÍNDICE

1. Resumen	3
2. Antecedentes	4
3. Objetivo	6
4. Material y Métodos	6
4.1. Muestras	6
4.2. Métodos empleados	7
4.2.1. Determinación del contenido de polifenoles totales	7
4.2.1.1. Método Folin-Ciocalteu (IFC)	7
4.2.1.2. Índice de polifenoles totales (IPT)	7
4.2.2. Determinación del contenido de ácidos hidroxicinámicos	8
4.2.3. Determinación del contenido de flavonoles	8
4.2.4. Determinación del contenido de antocianos totales	8
4.2.5. Determinación del contenido en taninos	9
4.2.6. Determinación de la capacidad antioxidante	9
4.2.6.1. Método DPPH	9
4.2.6.2. Método FRAP	10
4.2.6.3. Método HRSA	10
4.3. Resumen de resultados	11
5. Resultados y Discusión	12
5.1. Análisis descriptivo de los parámetros analizados	12
5.2. Análisis descriptivo de los factores	13
5.3. Análisis ANOVA de dos factores	14
5.4. Comparaciones múltiples. Test de Tukey	24
5.5. Análisis de Componentes Principales (ACP)	25
6. Conclusiones	28
7. Referencias bibliográficas	28

1. Resumen

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la incidencia del año de vendimia y la variedad de uva sobre la capacidad antioxidante de diversos vinos tintos secos y correlacionar su potencial antioxidante con su perfil fenólico.

Se analizaron 16 muestras de vino tinto, 8 de la vendimia del 2009, 4 de ellos elaborados con uva Tempranillo y los otros 4 con Cabernet Sauvignon, y 8 de la vendimia de 2010, con las mismas variedades de uva que la vendimia anterior. Estos vinos fueron elaborados por los alumnos de la E.T.S.I.I.A.A (Universidad de Valladolid, Palencia).

Se determinó la actividad antioxidante total utilizando los métodos DPPH, FRAP y HRSA. El contenido en fenoles se determina a través de dos métodos, mediante el índice de polifenoles totales (absorbancia a 280 nm) y mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu. Además, se cuantifican las familias fenólicas de ácidos hidroxicinámicos, flavonoles, taninos y antocianos.

1. Abstract

The main objective of this work is to study the harvest year and grape variety on the antioxidant capacity of various dry red wines and relate antioxidant potential to phenolic profile.

Were analyzed 16 samples of red wine, 8 samples of 2009 vintage, 4 of them made with Tempranillo grape and other 4 with Cabernet Sauvignon, and 8 samples of 2010 vintage, with the same varieties of grapes before harvest. These wines were made by students of the E.T.S.I.I.A.A. (University of Valladolid, Palencia).

Was determined the total antioxidant activity using DPPH, FRAP and HRSA methods. Phenols content is determined by two methods, using the index of total polyphenols (absorbance at 280 nm) and by the Folin-Ciocalteu reagent. In addition, phenolic families were quantified like hydroxycinnamic acids, flavonols, tannins and anthocyanins.

2. Antecedentes

La excesiva oxidación de biomoléculas da lugar a diversos daños en el organismo. Así, un exceso de radicales libres se ha relacionado con una mayor incidencia de diversas enfermedades degenerativas como cáncer, enfermedades cardíacas, inflamación, artritis, disfunción cerebral, aceleración del envejecimiento, etc. (Pratico et al., 2000)

El mecanismo por el que los radicales libres producen sus efectos transcurre formando especies reactivas oxigenadas, que son los que producen los efectos nocivos. Este proceso se ve favorecido por la presencia de oxígeno y de luz ultravioleta, que inicia la formación de radicales libres.

La utilización de antioxidantes permite que no se produzcan las especies reactivas oxigenadas de forma que se impiden las consecuencias de su actividad. Estos antioxidantes actúan principalmente en reacciones de terminación de cadenas de radicales libres, impidiendo la oxidación de lípidos y otras moléculas, y cediendo átomos de hidrógeno de forma que se neutralizan los radicales libres (Visioli et al., 2000; Kris-Etherton et al., 2002).

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8.000 compuestos distintos. Químicamente los polifenoles son un gran grupo de compuestos presentes en la naturaleza que poseen anillos aromáticos con sustituyentes hidroxilos. Estos compuestos son en su mayoría potentes antioxidantes necesarios para el funcionamiento de las células vegetales. Se encuentran en frutas y verduras y en bebidas como té y vino (Kinsella et al., 1993). La estructura química de los polifenoles es especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante.

Al postularse la acción protectora del vino en algunas enfermedades crónicas como resultado de su capacidad antioxidante, diferentes grupos han abordado la medición de esta capacidad. Está demostrado, que las propiedades antioxidantes del vino se deben a sus componentes polifenólicos (Abu-amsha et al., 1996). El contenido total de polifenoles de un vino se correlaciona directamente con su capacidad antioxidante (Rice-Evans et al., 1997; Sato et al., 1998).

Los compuestos polifenólicos de la uva se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas y en las pepitas, su concentración es baja en la pulpa. El proceso de elaboración de los vinos comienza con la obtención del vino base procedente de uvas blancas o tintas. Los vinos base blancos y rosados se obtienen cuando la fermentación tiene lugar sin el contacto entre hollejo y mosto. En cambio, los tintos se elaboran en contacto con los hollejos y su color dependerá del tiempo y la intensidad de la maceración (Hidalgo et al., 2004). Por esta razón, la cantidad de compuestos fenólicos que se encuentran en el vino tinto es mayor que la de los vinos blancos y rosados, ya que en el proceso de elaboración del vino tinto se incluye el proceso de maceración del mosto con la piel y partes sólidas de la uva, principal origen de los polifenoles. Cabe destacar que los polifenoles contribuyen de forma notable en las características organolépticas del vino (color, astringencia, etc.).

La cantidad y calidad de polifenoles en la uva depende principalmente de la variedad de la vid, del clima, del terreno y de las prácticas de cultivo. De todos estos factores condicionantes las prácticas de cultivo son el factor más fácil de modificar.

Existe disparidad de opinión por parte de expertos viticultores y enólogos en cuanto a las necesidades hídricas de los viñedos y la influencia del riego en el vino final. Un suplemento de agua generalmente aumenta el rendimiento en cosecha (Spiegel-Roy y Bravdo, 1964). Así por ejemplo Carbonneau (1987); Van Leeuwen y Seguin (1994) han demostrado que en una zona de clima templado, la regulación de la alimentación en agua a un nivel bajo es un factor de calidad determinante en un terreno vitícola. Algunos investigadores como Neja et al. (1977) encontraron que el riego tenía efectos positivos en la calidad del vino, sin embargo esta observación no es compartida por autores como Morris et al. (1982) quienes encontraron efectos negativos o ningún efecto en absoluto. Estos resultados contradictorios podrían deberse a efectos diversos e indirectos del riego y del estrés hídrico en fases particulares de crecimiento (Hepner et al., 1985).

La disminución del crecimiento vegetativo es la incidencia más característica de una baja disponibilidad de agua. La ralentización del crecimiento está doblemente ligada a la disminución de los cambios gaseosos a causa del cierre de los estomas (Smart, 1987) y a la disminución de la expansión celular debida a la pérdida de turgencia de la célula (Schulze, 1986). Asimismo, un régimen hídrico limitante repercute en el ciclo fenológico de la vid, es decir, éste es más precoz y la parada vegetativa se acelera (Koundouras et al., 1999).

3. Objetivo

Estudiar la capacidad antioxidante de diversos vinos tintos secos elaborados en las vendimias 2009 y 2010 empleando diferentes variedades de uva y relacionar su potencial antioxidante con su perfil fenólico.

4. Material y Métodos

4.1. Muestras

La parcela sobre la que se realizó el experimento se ubica en la finca Zamadueñas (Valladolid) perteneciente al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León. Sobre dicha finca se establecieron dos ensayos experimentales, uno en un viñedo de la variedad Tempranillo y otro de la variedad Cabernet Sauvignon, en las que se tomaron cuatro muestras de uvas de distintas características en cuanto a la densidad de plantación, dosis, época y sistemas de riego (Tabla 1). Estas condiciones se mantuvieron en las vendimias de 2009 y de 2010.

En este estudio se emplearon 16 vinos tintos secos, de los cuales, 8 vinos pertenecen a la cosecha de 2009, siendo 4 de ellos producidos a partir de uva de la variedad Tempranillo y los otros 4 se elaboraron con uva de la variedad Cabernet Sauvignon. Otros 8 vinos pertenecen a la cosecha de 2010 y fueron tratados con las mismas técnicas experimentales que en el año anterior.

En la siguiente tabla se muestran las diferentes codificaciones de las muestras, la variedad de uva empleada para elaborar el vino, la densidad de plantación de la parcela, las dosis de riego aplicadas y el sistema de riego de cada parcela.

Tabla 1. *Tratamientos experimentales de las distintas muestras.*

Código muestra	Variedad	Densidad plantación	Dosis riego	Época riego	Sistema riego
A2E ₂₀₀₉ / A2E ₂₀₁₀	Tempranillo	Alta	25% ETo	E	GT
A2P ₂₀₀₉ / A2P ₂₀₁₀		Alta	25% ETo	P	GT
B0 ₂₀₀₉ / B0 ₂₀₁₀		Baja	0% ETo		
B2 ₂₀₀₉ / B2 ₂₀₁₀		Baja	25% ETo	P	GT
P1 ₂₀₀₉ / P1 ₂₀₁₀	Cabernet Sauvignon	Alta	12,5% ETo	P	PRD
P2 ₂₀₀₉ / P2 ₂₀₁₀		Alta	25% ETo	P	PRD
T0 ₂₀₀₉ / T0 ₂₀₁₀		Alta	0% ETo		
T2 ₂₀₀₉ / T2 ₂₀₁₀		Alta	25% ETo	P	GT

ETo : Evapotranspiración del cultivo de referencia.

P: A partir de la parada de crecimiento de pámpanos hasta final de maduración.

E: Desde el inicio del envero hasta el final de la maduración.

GT: Goteo tradicional.

PRD: Goteo con secado parcial de raíces (partial root drying).

Se analizó el contenido total de polifenoles, las familias fenólicas y la capacidad antioxidante de las 16 muestras de vino por triplicado. Antes de comenzar los análisis, las muestras de vino fueron centrifugadas a 4000 r.p.m. durante 5 minutos.

4.2. Métodos empleados

4.2.1. Determinación del contenido de polifenoles totales

4.2.1.1. Método Folin-Ciocalteu (IFC)

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. El reactivo de Folin-Ciocalteu contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico (Peterson, 1979). La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula (Julkunen-Tiito, 1985).

En un matraz aforado de 10 mL, se introducen respetando el orden, 0,1 mL de muestra diluida 1:5, 5 mL de agua destilada, 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 2 mL de la solución de carbonato de sodio (20% p/v) y se enrasa a 10 mL con agua destilada. Se agita el matraz para homogeneizar, se espera 30 minutos para estabilizar la reacción, transcurrido este tiempo, se mide la absorbancia a 750 nm con una cubeta de plástico de 1 cm de camino óptico frente a un blanco preparado con agua destilada. Mediante la siguiente ecuación se determina el índice Folin-Ciocalteu:

$$IFC = A_{750} \times 100$$

4.2.1.2. Índice de Polifenoles Totales (IPT)

El fundamento de esta técnica analítica se basa en la obtención del índice por la medida de la absorbancia del vino a 280 nm (UV), porque el núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máximo de absorbancia a esta longitud de onda (Zamora, 2003).

El procedimiento consiste en diluir la muestra de vino con un índice de 1:50, en agua destilada e introducirlo en la cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Se realiza la lectura de la absorbancia a 280 nm utilizando como blanco agua destilada. En el cálculo del índice se aplica la siguiente ecuación:

$$IPT = A_{280} \times 50$$

4.2.2. Determinación del contenido de Ácidos Hidroxicinámicos

El fundamento de este ensayo se basa en la obtención del contenido de ácidos hidroxicinámicos por la medida de la absorbancia del vino a 320 nm (Andrés-Lacueva et al., 1997).

El procedimiento consiste en diluir la muestra con un factor de dilución de 1:100 y medir la absorbancia en un espectrofotómetro con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El resultado de la absorbancia se multiplica por el factor de dilución:

$$\text{Ác. Hidroxicinámicos} = A_{320} \times 100$$

4.2.3. Determinación del contenido de Flavonoles

El fundamento se basa en la obtención del contenido de flavonoles por la medida de la absorbancia del vino a 365 nm (Andrés-Lacueva et al., 1997).

El procedimiento consiste en diluir la muestra con un factor de dilución de 1:100 y medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 365 nm con cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El resultado se obtiene con la siguiente ecuación:

$$\text{Flavonoles} = A_{365} \times 100$$

4.2.4. Determinación del contenido de Antocianos Totales

El fundamento de esta técnica analítica se basa en la decoloración mediante bisulfito de sodio (Ribereau-Gayon y Stonestreet, 1965), donde la decoloración es proporcional a la concentración de antocianos libres.

El procedimiento consiste en preparar una disolución madre que contenga 1 mL de muestra, 1 mL de etanol y 20 mL de HCl al 2% v/v. A partir de esta disolución se vierte en un tubo de ensayo denominado tubo "A", 5 mL de dicha disolución y 2 mL de agua destilada y en un tubo "B", 5 mL de la disolución y 2 mL de HNaSO₃ al 16%. Esperar 15 minutos y medir la absorbancia a 520 nm en cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico. La concentración de antocianos totales viene dada según la siguiente ecuación:

$$C_{\text{Antocianos}} \text{ (mg/L)} = 875 \times (A_A - A_B)$$

4.2.5. Determinación del contenido en Taninos

Este método se basa en la propiedad que presentan los taninos condensados de liberar en medio ácido y en presencia de calor, por rotura de los enlaces intermonoméricos, un carbón muy reactivo, que puede, por oxidación, dar lugar a una antocianidina (Bate-Smith, 1981).

El procedimiento consiste en preparar una dilución previa de la muestra de vino con un factor de dilución de 1:10. A partir de esta dilución se preparan dos tubos de ensayo, en el tubo "A" se añade 1 mL de muestra diluida, 0,5 mL de agua destilada y 3 mL de HCl al 37%. En el tubo "B" se añade 1 mL de muestra diluida, 0,5 mL de agua destilada y 3 mL de HCl al 37%. Se lleva el tubo "A" a 90 °C durante 30 minutos tapado y protegido de la luz y una vez transcurrido este tiempo se deja atemperar en oscuridad. El tubo "B" se deja a temperatura ambiente protegido de la luz. Una vez el tubo "A" esté atemperado se añade 0,5 mL de etanol en ambos tubos y se mide la absorbancia a 550 nm en cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico. La concentración de taninos condensados se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$C_{\text{Taninos}}(\text{mg/L}) = 19,33 \times (A_A - A_B) / 5$$

4.2.6. Determinación de la capacidad antioxidante

4.2.6.1. Método DPPH

Este método se basa en la reducción de los radicales libres DPPH (2,2 –difetil-1-picrilhidrazil), que conduce a la decoloración (Brand-Williams et al., 1995). La presencia del antioxidante provoca una pérdida de color en el reactivo en metanol a una concentración de 60 µM. A esta concentración, la solución inmediatamente alcanza un valor de absorbancia de 0,7 a 517 nm.

La reacción tiene lugar cuando 980 µL DPPH (60 µM) se mezcla con 20 µL de la muestra (a una dilución de 1:50 en agua). El tiempo de reacción es de 2 horas a temperatura ambiente, que es el tiempo necesario para llegar a una lectura estable de los reactivos con la muestra. Los resultados se expresan en milimolar de Trolox usando la curva patrón lineal descrita por esta sustancia.

$$mM \text{ Trolox} = 1.6903 \times \text{Dif A} - 0.0056$$

$$\text{Range} = 0,08-1 \text{ mM}$$

$$R = 0,9986$$

4.2.6.2. Método FRAP

Este método se utiliza para medir el poder reductor de una muestra (Benzie et al. 1996). Se basa en el aumento de absorbancia a 593 nm debido a la formación de complejos tripiridil-S-triazina con férrico (II) [TPTZ-Fe (II)] en presencia de un agente reductor.

La mezcla de reacción se prepara mezclando 25 mL de solución tampón de acetato de sodio 0,3 M a un pH de 3,6, 2,5 mL de TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-S-triazina) a concentración 10 mM, 2,5 mL de FeCl₃ (20 mM) y 3 mL de agua. A 30 µL de la muestra (diluido en agua a 1:50) se añaden a 970 µL de la mezcla reactiva anterior y se incuba a 37 °C durante 30 minutos. Se prepara un blanco en el que se añaden 30 µL de agua destilada en lugar de la muestra diluida. Los resultados fueron expresados como milimoles de Fe (II), utilizando la calibración lineal obtenida con diferentes concentraciones de FeSO₄ según se indica en la siguiente ecuación lineal.

$$mM Fe(II) = 1.535 \times Dif A - 0.0137$$

$$Range = 0,2-1,6 mM$$

$$R = 0,9983$$

4.2.6.3. Método HRSA

El método HRSA se basa en la actividad atrapadora de radicales hidroxilo. La Desoxirribosa (2 - desoxi-D-ribose) se descompone cuando se expone a los radicales hidroxilo generados por la reacción de Fenton (Halliwell, 1987). Los radicales hidroxilo (HO[•]) se generaron a través de los siguientes sistemas; 50 µL de FeCl₃ (0,1 mM), 50 µL de ácido ascórbico (0,1 mM), 50 µL de H₂O₂ (1 mM) y 50 µL de EDTA (0,1 mM).

La reacción se produce cuando se añade a la mezcla anterior 75 µL de la muestra (diluido al 1:50 en agua), con 100 µL de desoxirribosa (1 mM de concentración final). Se incuba a 37 °C durante 1 hora. Una vez transcurrido ese tiempo se añade 562,5 mL de TCA (ácido tricloroacético) al 28% p/v en agua, 375 mL de TBA (ácido tiobarbitúrico) al 1% p/v en una disolución 0,05 M de NaOH y se añade a 375 mL de la muestra bajo incubación. Esta nueva mezcla se mantiene durante 15 minutos a 100 °C después de lo cual se deja enfriar a temperatura ambiente. La MDA (malondialdehído) formada por la descomposición de la desoxirribosa se evalúa en la reacción con TBA y se mide la absorbancia del producto de reacción a 532 nm. El resultado se expresa como un porcentaje de inhibición en relación con una muestra de control (Blanco).

$$\% \text{ Inhibición} = [(A_{\text{blanco}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{blanco}}] \times 100$$

4.3. Resumen de resultados

Tabla 2. Resultados de análisis en laboratorio.

Vendimia	Variedad uva	Muestra	IFC	IPT	Ac. Hidrúxica	Flavonoles	Antocianos (mg/L)	Taninos (mg/L)	DPPH (mM Trolox)	FRAP (mM Fe(II))	HRSA (% inhibición)
2009	Tempranillo	A2E	16,6	30	15,3	6,9	155	0,86	0,10	0,24	61
2009	Tempranillo	A2P	16,2	29	15,6	7,1	181	0,84	0,08	0,24	62
2009	Tempranillo	B0	10,3	26	14,8	6,8	229	0,60	0,10	0,21	53
2009	Tempranillo	B2	14,4	25	13,5	6,2	226	0,63	0,06	0,22	56
2009	Cabernet S.	P1	14,2	34	17,6	9,7	102	0,79	0,07	0,27	50
2009	Cabernet S.	P2	15,0	33	16,4	9,0	148	0,84	0,07	0,27	51
2009	Cabernet S.	T0	15,2	35	17,8	10,2	257	0,76	0,07	0,31	45
2009	Cabernet S.	T2	15,0	32	16,2	9,1	217	0,81	0,07	0,26	38
2010	Tempranillo	A2E	20,1	31	14,9	7,1	360	0,23	0,13	0,36	65
2010	Tempranillo	A2P	17,6	32	16,4	7,6	360	0,48	0,10	0,36	61
2010	Tempranillo	B0	18,1	29	13,9	6,5	340	0,55	0,15	0,38	52
2010	Tempranillo	B2	17,3	27	12,4	5,8	300	0,28	0,09	0,37	59
2010	Cabernet S.	P1	16,1	38	18,3	10,1	510	0,64	0,10	0,34	45
2010	Cabernet S.	P2	17,6	38	16,3	9,1	540	0,64	0,14	0,37	55
2010	Cabernet S.	T0	15,7	38	17,4	9,8	510	0,68	0,06	0,31	56
2010	Cabernet S.	T2	16,0	38	16,1	9,1	520	0,71	0,04	0,41	55

5. Resultados y discusión

Con el fin de interpretar los resultados de los análisis químicos se realiza un análisis estadístico de los datos empleando distintos métodos. El principal objetivo del estudio estadístico es averiguar si existen diferencias significativas en los niveles de polifenoles y la capacidad antioxidante de las distintas muestras de vino en función de las variables “muestra” y “año”.

En primer lugar se lleva a cabo un análisis descriptivo de los parámetros. Para estimar si existen diferencias en estas variables en función de la muestra y el año en dichos parámetros se realiza un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores sin interacción. Se emplea el test Tukey con el fin de determinar las diferencias por pareja en la variable muestra. Por último, con el objetivo de reducir el número de variables se realiza un Análisis de Componentes Principales (ACP). Estos métodos se llevan a cabo mediante el programa estadístico SPSS versión 18.

5.1. Análisis descriptivo de los parámetros analizados

Se disponen de un total de 16 muestras de vino de los que se han recogido los datos relativos al año de vendimia, tipo de uva, nombre de la muestra e información sobre 9 parámetros químicos relacionados con los polifenoles y la capacidad antioxidante de los vinos.

En la tabla 3 aparecen algunos estadísticos descriptivos (media, mediana, desviación típica, máximo, mínimo y rango intercuartílico) de los parámetros químicos.

Tabla 3. Estadísticos descriptivos.

	IFC	IPT	HIDRO	FLAV	ANT	TAN	DPPH	FRAP	HRSA
Media	16,0	32,2	15,8	8,1	310	0,65	0,09	0,31	54,0
Mediana	16,0	32,0	16,2	8,3	279	0,66	0,09	0,31	55,0
Desv. típ.	2,2	4,4	1,6	1,5	146	0,19	0,03	0,06	7,2
Mínimo	10,3	25,0	12,4	5,8	102	0,23	0,04	0,20	38,0
Máximo	20,1	38,0	18,3	10,2	540	0,86	0,14	0,41	65,0
Amplitud intercuartil	2,5	8,6	2,3	2,7	282	0,25	0,03	0,12	10,0

En la figura 1 se representan los diagramas box plot para los distintos parámetros analizados en laboratorio.

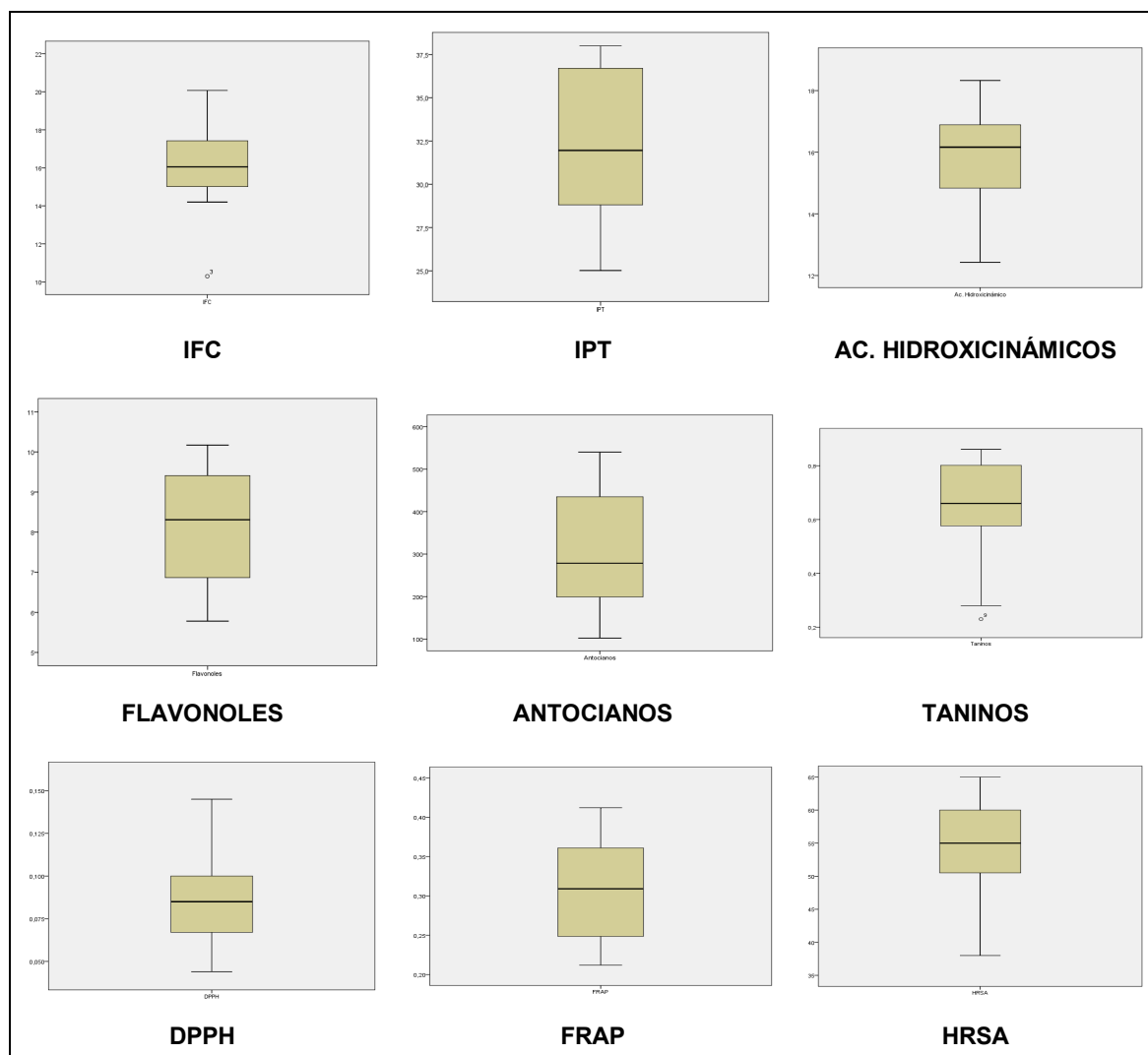


Figura 1. Diagramas box plot.

A pesar del escaso tamaño muestral se observa que la mediana y la media de todos los componentes son muy similares y que no existen valores extremos, por lo que podemos decir que la distribución de estas variables es simétrica y por lo tanto asumiremos normalidad.

5.2. Análisis descriptivo de los factores

En este análisis se utilizan dos variables de exposición, el año de la vendimia (2009 ó 2010) y la muestra (8 tipos). Sus frecuencias se resumen en las tablas 4 y 5.

Tabla 4. Variable vendimia.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	2009	8	50,0	50,0	50,0
	2010	8	50,0	50,0	100,0
	Total	16	100,0	100,0	

Tabla 5. Variable muestra.

		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válidos	A2E	2	12,5	12,5	12,5
	A2P	2	12,5	12,5	25,0
	B0	2	12,5	12,5	37,5
	B2	2	12,5	12,5	50,0
	P1	2	12,5	12,5	62,5
	P2	2	12,5	12,5	75,0
	T0	2	12,5	12,5	87,5
	T2	2	12,5	12,5	100,0
	Total	16	100,0	100,0	

5.3. Análisis ANOVA de dos factores

El análisis de la varianza (o Anova: *Analysis of variance*) permite estudiar simultáneamente los efectos de dos fuentes de variación. Es decir, el efecto simultáneo que tienen dos factores en una variable cuantitativa.

Se realiza un experimento para cada uno de los grupos formados por los dos factores a estudiar (“muestra” y “año”). Es decir, para cada muestra de vino y año de vendimia sólo hay una repetición/experimento.

Los resultados del ANOVA aparecen reflejados en las tablas 6 hasta la 14; y en las figuras 2 hasta la 10 se representa gráficamente para cada parámetro analizado en el laboratorio, las medias marginales para el año de vendimia y muestra, al realizarse un experimento para cada subgrupo, cada punto del gráfico representa cada uno de los experimentos.

Variable dependiente: IFC

Tabla 6. Tabla ANOVA dos factores, IFC.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	50,807 ^a	8	6,351	2,426	,130
Intersección	4074,907	1	4074,907	1556,745	,000
vendimia_rec	28,998	1	28,998	11,078	,013
muestra_rec	21,808	7	3,115	1,190	,412
Error	18,323	7	2,618		
Total	4144,037	16			
Total corregida	69,130	15			

a. R cuadrado = ,735 (R cuadrado corregida = ,432)

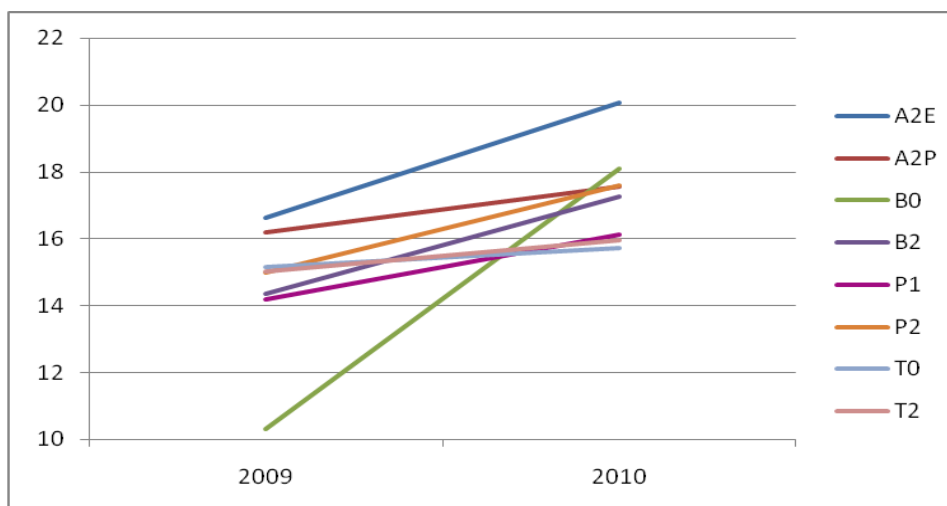


Figura 2. Medidas marginales estimadas de IFC

En la tabla ANOVA de dos vías para el parámetro IFC (tabla 6), se observa que p-valor para el factor vendimia es igual a 0,013 ($< 0,05$), por lo que se concluye que la media de IFC es estadísticamente diferente en función del año de vendimia. En la figura 2 se observa que para todas las muestras la media de IFC fue superior en el año 2010. El p-valor para el factor muestra es igual 0,412 ($> 0,05$) por lo que se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de IFC en función de la muestra. En la figura 2 podemos observar que las líneas que representan los valores de IFC para cada muestra no son paralelas por lo que visualmente podríamos decir que hay interacción aunque esto no se puede comprobar estadísticamente. La muestra A2E obtuvo los mayores valores de IFC tanto en 2009 como en 2010 y la muestra B0 obtuvo el menor valor de IFC en 2009 y T0 en 2010.

Variable dependiente: IPT

Tabla 7. Tabla ANOVA dos factores, IPT.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	285,497 ^a	8	35,687	29,520	,000
Intersección	16597,040	1	16597,040	13728,967	,000
vendimia_rec	44,496	1	44,496	36,806	,001
muestra_rec	241,002	7	34,429	28,479	,000
Error	8,462	7	1,209		
Total	16891,000	16			
Total corregida	293,960	15			

a. R cuadrado = ,971 (R cuadrado corregida = ,938)

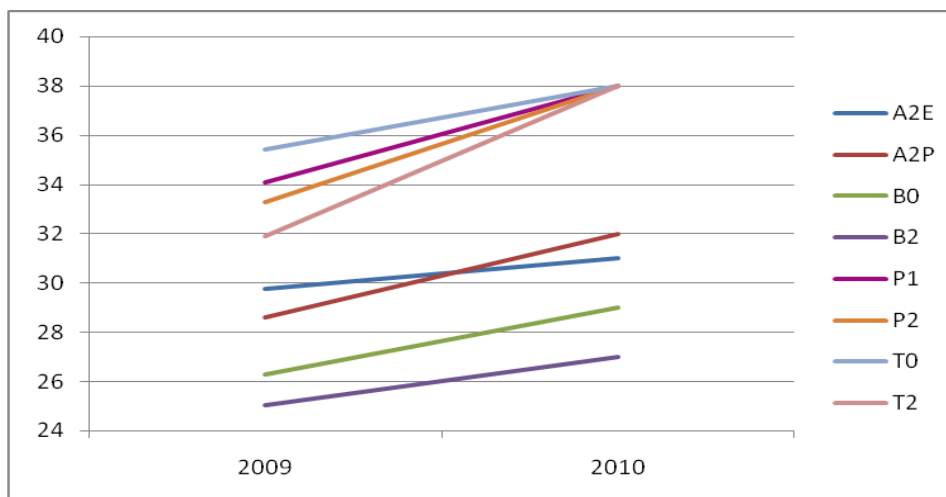


Figura 3. Medidas marginales estimadas de IPT

En la tabla 7, se observa que p-valor tanto para el factor vendimia como para el factor muestra es menor de 0,05 (p-valor=0,001 y p-valor=0,000 respectivamente), por lo que existen diferencias estadísticamente significativas en función del año y del tipo de muestra.

En la figura 3 se observa que para todas las muestras la media de IPT fue superior en el año 2010 que en la vendimia del año anterior y en cuanto a las muestras, la muestra T0 alcanza el mayor nivel de IPT frente a la muestra B2 que se encuentra en el nivel más bajo. Las muestras P1, P2, T0 y T2 correspondientes a la variedad de uva Cabernet Sauvignon presentan mayor IPT que las muestras procedentes de uva Tempranillo.

Variable dependiente: Ácidos Hidroxicinámicos

Tabla 8. Tabla ANOVA dos factores, Ac. Hidroxicinámicos.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	37,925 ^a	8	4,741	20,703	,000
Intersección	3998,981	1	3998,981	17464,503	,000
vendimia_rec	,131	1	,131	,574	,473
muestra_rec	37,793	7	5,399	23,579	,000
Error	1,603	7	,229		
Total	4038,509	16			
Total corregida	39,527	15			

a. R cuadrado = ,959 (R cuadrado corregida = ,913)

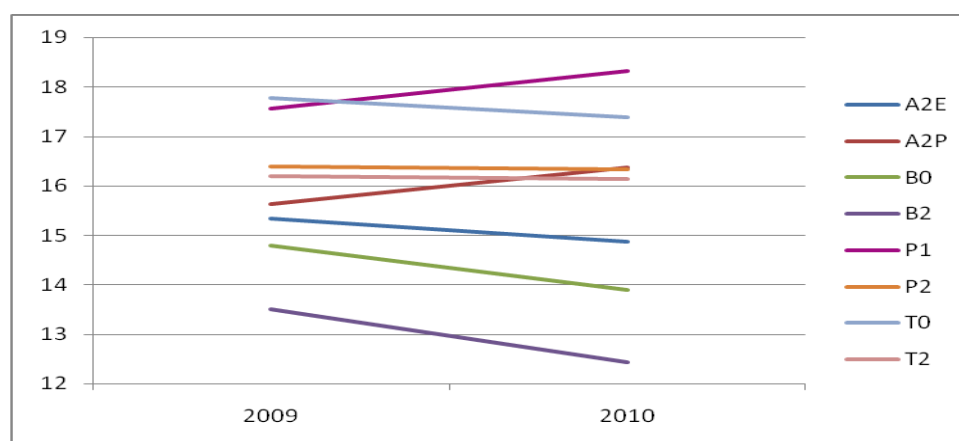


Figura 4. Medidas marginales estimadas de ác. hidroxicinámicos

Según se muestra en la tabla 8 el p-valor del factor vendimia es de 0,473 por lo que no existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de ácidos hidroxicinámicos. Sin embargo el p-valor del factor muestra es menor de 0,05 por lo que en este caso se puede asegurar que son estadísticamente diferentes para este factor.

La figura 4 representa de forma gráfica que el contenido en ácidos hidroxicinámicos de las muestras A2E, B0, B2, P2, T0 y T2 es mayor en 2009 que en 2010, sin embargo este parámetro es mayor en 2010 para las muestras A2E y P1. Las muestras correspondientes a la variedad de uva Cabernet Sauvignon presentan mayor contenido en ácidos hidroxicinámicos que las muestras procedentes de uva Tempranillo.

Variable dependiente: Flavonoles

Tabla 9. Tabla ANOVA dos factores, Flavonoles.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	33,846 ^a	8	4,231	68,828	,000
Intersección	1057,876	1	1057,876	17210,225	,000
vendimia_rec	,001	1	,001	,010	,923
muestra_rec	33,845	7	4,835	78,660	,000
Error	,430	7	,061		
Total	1092,152	16			
Total corregida	34,276	15			

a. R cuadrado = ,987 (R cuadrado corregida = ,973)

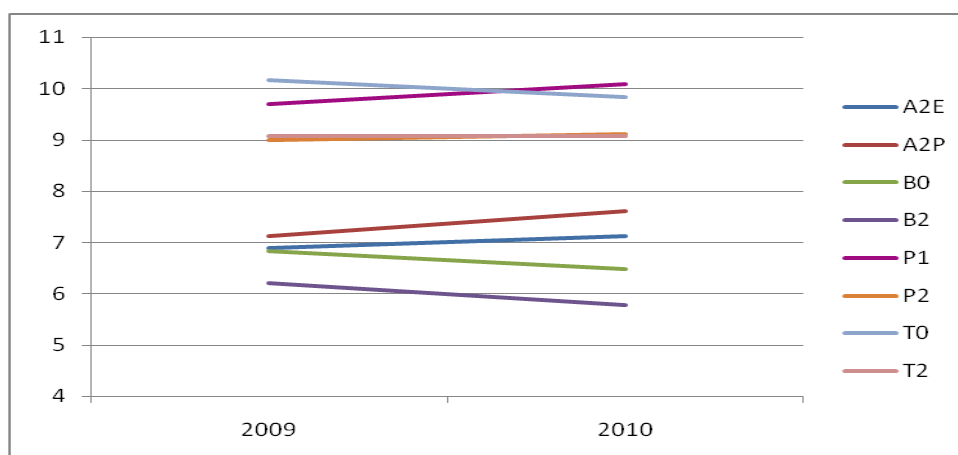


Figura 5. Medidas marginales estimadas de flavonoles

En la tabla ANOVA de dos vías para el parámetro flavonoles (tabla 9), se observa que p-valor para el factor vendimia es igual a 0,923 ($> 0,05$), por lo que se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de flavonoles en función del año de vendimia. El p-valor para el factor muestra es igual a 0,000 ($< 0,05$) por lo que se concluye que el contenido en flavonoles es estadísticamente diferente en función del factor muestra.

En la figura 5 se puede observar que en las muestras A2E, A2P y P1 hay mayor contenido en flavonoles en las muestras de 2010, las muestras B0, B2 y T0 tienen menor contenido para este mismo año. Las muestras correspondientes a la variedad de uva Cabernet Sauvignon presentan mayor cantidad de flavonoles que las muestras procedentes de uva Tempranillo.

Variable dependiente: Antocianos

Tabla 10. Tabla ANOVA dos factores, Antocianos.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	265646,555 ^a	8	33205,819	4,436	,032
Intersección	1534991,940	1	1534991,940	205,054	,000
vendimia_rec	231411,107	1	231411,107	30,913	,001
muestra_rec	34235,448	7	4890,778	,653	,706
Error	52400,448	7	7485,778		
Total	1853038,943	16			
Total corregida	318047,002	15			

a. R cuadrado = ,835 (R cuadrado corregida = ,647)

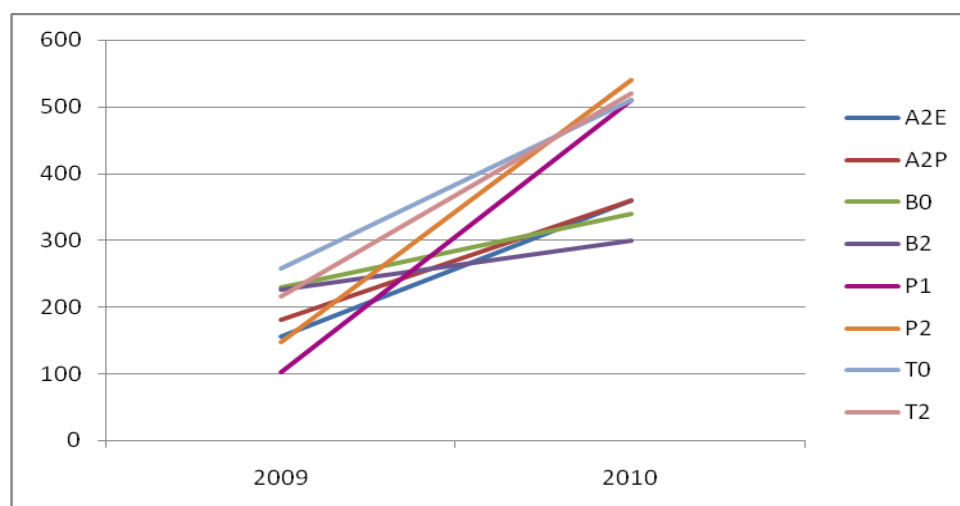


Figura 6. Medidas marginales estimadas de antocianos (mg/L).

Según los datos de la tabla 10 el p-valor para el factor vendimia es de 0,001 por lo que se demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas en función del año de vendimia. El p-valor para el factor muestra es 0,706 por lo que se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de antocianos en función de la muestra.

En la figura 6 se observa que para todas las muestras, la media de antocianos es superior en las muestras correspondientes a la vendimia de 2010. En 2009 todas las muestras contienen cantidades similares de antocianos pero en 2010 las muestras P1, P2, T0 y T2 correspondientes a la variedad de uva Cabernet Sauvignon presentan un fuerte incremento en la cantidad de antocianos en comparación con las muestras A2E, A2P, B0 y B2, procedentes de uva Tempranillo, en las que el incremento en este polifenol es más moderado.

Variable dependiente: Taninos

Tabla 11. Tabla ANOVA dos factores, Taninos.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,399 ^a	8	,050	2,584	,114
Intersección	6,692	1	6,692	346,765	,000
vendimia_rec	,232	1	,232	12,037	,010
muestra_rec	,167	7	,024	1,234	,394
Error	,135	7	,019		
Total	7,227	16			
Total corregida	,534	15			

a. R cuadrado = ,747 (R cuadrado corregida = ,458)

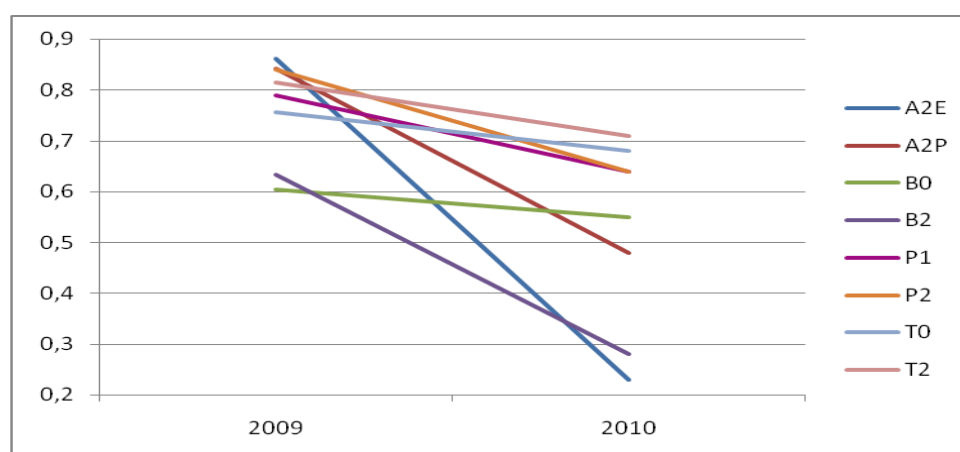


Figura 7. Medidas marginales estimadas de taninos (mg/L).

Según los datos de la tabla 11 el p-valor para el factor vendimia es de 0,010 por lo que se demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas en función del año de vendimia. El p-valor para el factor muestra es 0,394 por lo que se concluye que no existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de taninos en función de la muestra.

En la figura 7 se observa que para todas las muestras, la media de taninos es superior en el año 2009. En todas las muestras de 2009 el contenido en taninos es similar, pero en 2010 las muestras A2E, A2P, B0 y B2, procedentes de uva Tempranillo presentan una fuerte disminución en la cantidad de taninos en comparación con las muestras P1, P2, T0 y T2 correspondientes a la variedad de uva Cabernet Sauvignon, en las que esta disminución es más moderada.

Variable dependiente: DPPH

Tabla 12. Tabla ANOVA dos factores, DPPH.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,009 ^a	8	,001	2,452	,127
Intersección	,125	1	,125	264,461	,000
vendimia_rec	,002	1	,002	4,632	,068
muestra_rec	,007	7	,001	2,140	,168
Error	,003	7	,000		
Total	,137	16			
Total corregida	,013	15			

a. R cuadrado = ,737 (R cuadrado corregida = ,436)

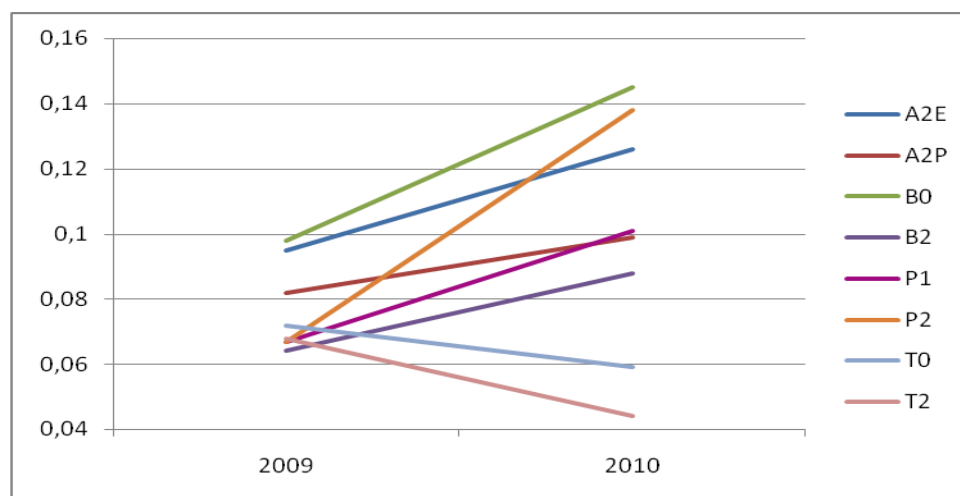


Figura 8. Medidas marginales estimadas de DPPH (mM Trolox)

En la tabla 12 se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas en la media del parámetro DPPH en función del año de vendimia ni del tipo de muestra (p-valor =0,068 y p-valor=0,168, respectivamente).

En la figura 8 se observa que para las muestras T2 y T0 los niveles de DPPH han disminuido de 2009 a 2010 mientras que para el resto de muestras los niveles de este parámetro han aumentado.

Variable dependiente: FRAP

Tabla 13. Tabla ANOVA dos factores, FRAP.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	,051 ^a	8	,006	4,741	,027
Intersección	1,501	1	1,501	1118,783	,000
vendimia_rec	,048	1	,048	35,661	,001
muestra_rec	,003	7	,000	,324	,920
Error	,009	7	,001		
Total	1,562	16			
Total corregida	,060	15			

a. R cuadrado = ,844 (R cuadrado corregida = ,666)

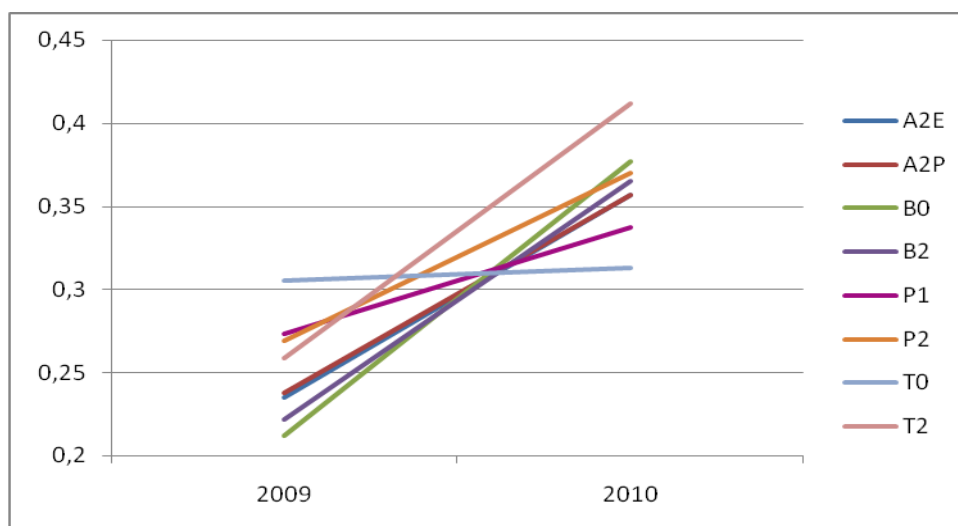


Figura 9. Medidas marginales estimadas de FRAP (mM Fe(II)).

Según los datos de la tabla 13 el p-valor para el factor vendimia es de 0,001 por lo que se demuestra que existen diferencias estadísticamente significativas en función del año de vendimia. El p-valor para el factor muestra es 0,920 por lo que se demuestra que no existen diferencias estadísticamente significativas en las medias de FRAP en función de la muestra.

En la figura 9 se observa que para todas las muestras, la media de FRAP es inferior en las muestras correspondientes al año 2009. La muestra T0 sufre un incremento mínimo en la capacidad antioxidante en comparación con el resto de muestras cuyo incremento en 2010 respecto a 2009 es muy elevado.

Variable dependiente: HRSA

Tabla 14. Tabla ANOVA dos factores, HRSA.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	591,000 ^a	8	73,875	2,955	,086
Intersección	46656,000	1	46656,000	1866,240	,000
vendimia_rec	64,000	1	64,000	2,560	,154
muestra_rec	527,000	7	75,286	3,011	,085
Error	175,000	7	25,000		
Total	47422,000	16			
Total corregida	766,000	15			

a. R cuadrado = ,772 (R cuadrado corregida = ,510)

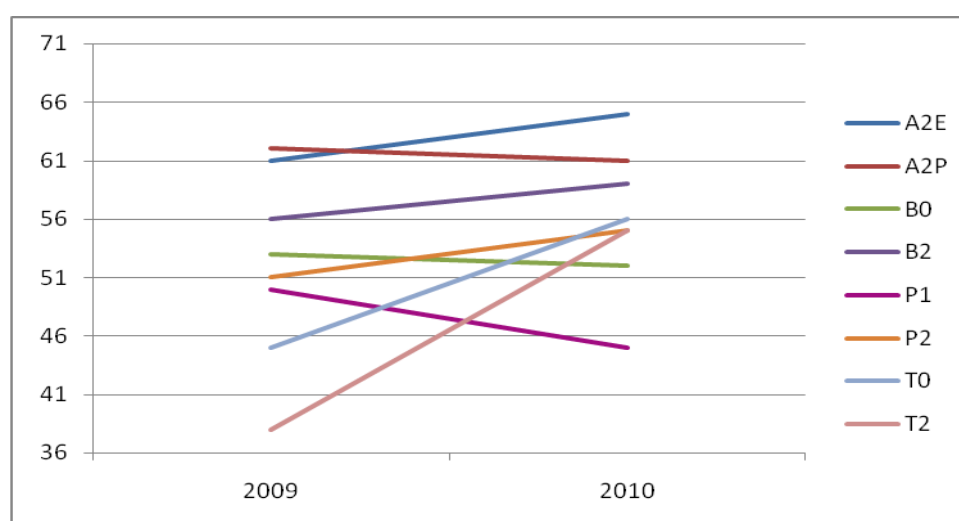


Figura 10. Medidas marginales estimadas de HRSA (% inhibición).

En la tabla 14 se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas en la media del parámetro HRSA en función del año de vendimia ni del tipo de muestra (p-valor =0,154 y p-valor=0,085, respectivamente).

En la figura 10 se observa que para las muestras B0 y P1 los niveles de HRSA son mayores en las muestras correspondientes a la vendimia de 2009 que en la de 2010 mientras que para el resto de muestras los niveles de este parámetro son mayores en 2010.

5.4. Comparaciones múltiples. Test de Tukey

El objetivo del test de Tukey es estudiar dos a dos las categorías del factor para determinar en qué par de categorías se producen las diferencias, por tanto sólo tiene sentido cuando el factor tiene más de dos categorías. Por lo tanto, en el caso del factor año no tiene sentido realizar este test puesto que sólo tiene dos categorías.

En la tabla 15 se muestra un resumen de los resultados obtenidos tras el análisis del test de Tukey en aquellas variables en las que se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el factor muestras (IPT, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles). En ella se indica entre qué muestras existen diferencias estadísticamente significativas entre las medias a un nivel de significación para cada parámetro de 0,05.

Tabla 15. Tabla resumen test de Tukey.

IPT	A2E	-	A2P	-	B0	-	B2	T0
	P1	-	P2	-	T0	B2	T2	-
Ac. Hidroxicinámicos	A2E	B2 P1 T0	A2P	B2 P1	B0	P1 P2 T0	B2	A2E A2P P1 P2 T0 T2
	P1	A2E A2P B0 B2	P2	B0 B2	T0	A2E B0 B2	T2	B2
Flavonoles	A2E	B2 P1 P2 T0 T2	A2P	B2 P1 P2 T0 T2	B0	P1 P2 T0 T2	B2	A2E A2P P1 P2 T0 T2
	P1	A2E A2P B0 B2	P2	A2E A2P B0 B2 T0	T0	A2E A2P B0 B2 P2 T2	T2	A2E A2P B0 B2

Según se muestra en la tabla, para el parámetro IPT existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras B2 frente a T0. En cuanto al contenido de ácidos hidroxicinámicos, existen diferencias estadísticamente significativas entre las muestras A2E frente a B2, P1 y T0; entre A2P frente a B2 y P1; entre B0 frente a P1, P2 y T0 y entre la muestra B2 frente a todas las muestras salvo la muestra B0. Por último, en cuanto al contenido en flavonoles, existen diferencias entre la mayoría de las muestras salvo A2E frente a A2P y B0; A2P frente a B0; B0 frente a B2; P1 frente a P2, T0 y T2; P2 frente a T0 y entre T0 frente a T2.

5.5. Análisis de Componentes Principales (ACP)

El Análisis de Componentes Principales (ACP) es una técnica estadística de síntesis de información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un banco de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Las nuevas componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí.

Un aspecto clave en ACP es la interpretación de los factores, ya que ésta no viene dada a priori, sino que será deducida tras observar la relación de los factores con las variables iniciales (se estudiará tanto el signo como la magnitud de las correlaciones).

Se emplea la técnica multivariante de componentes principales para la reducción de la información de los 9 parámetros químicos estudiados, a dos factores y se representa gráficamente en un plano 2x2.

Tabla 16. Varianza total explicada.

	Autovalores iniciales			Sumas de las saturaciones al cuadrado de la extracción			Suma de las saturaciones al cuadrado de la rotación		
	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado	Total	% de la varianza	% acumulado
IFC	3,647	40,523	40,523	3,647	40,523	40,523	3,592	39,913	39,913
IPT	3,066	34,072	74,594	3,066	34,072	74,594	3,121	34,682	74,594
HID	,726	8,068	82,663						
FLA	,674	7,487	90,149						
ANT	,423	4,704	94,854						
TAN	,289	3,208	98,062						
DPPH	,127	1,414	99,476						
FRAP	,043	,475	99,951						
HRSA	,004	,049	100,000						

En la tabla 16 se observa que la varianza explicada por el primer factor es del 40,52% y la del segundo factor 34,07%, la varianza total explicada supera el 70%.

Se llevó a cabo una rotación varimax para conseguir una mejor representación de los datos en el plano, tal y como se muestra en las siguientes tablas.

Tabla 17. Matriz de componentes.

	Componente	
	1	2
IFC	-,385	,727
IPT	,752	,635
Ac. Hidroxicinámicos	,895	,218
Flavonoles	,942	,283
Antocianos	,113	,853
Taninos	,695	-,486
DPPH	-,516	,421
FRAP	-,098	,917
HRSA	-,687	,159

Tabla 18. Matriz de transformación de las componentes.

Componente	1	2
1	,952	-,307
2	,307	,952

Tabla 19. Matriz de componentes rotadas.

	Componente	
	1	2
IFC	-,143	<u>.810</u>
IPT	<u>.910</u>	,373
Ac. Hidroxicinámicos	<u>.919</u>	-,068
Flavonoles	<u>.984</u>	-,020
Antocianos	,370	<u>.777</u>
Taninos	,512	<u>-,677</u>
DPPH	-,362	<u>.560</u>
FRAP	,188	<u>.903</u>
HRSA	<u>-,605</u>	,362

En la tabla 19 se observa que la componente 1 (eje X), está más representada por las variables IPT, ác. hidroxicinámicos, flavonoles y HRSA, la componente 2 (eje Y) está más representada por las variables IFC, antocianos, taninos, DPPH y FRAP. En la figura 11 se representa gráficamente mediante un eje de coordenadas las muestras y el año de vendimia en función de los parámetros químicos analizados.

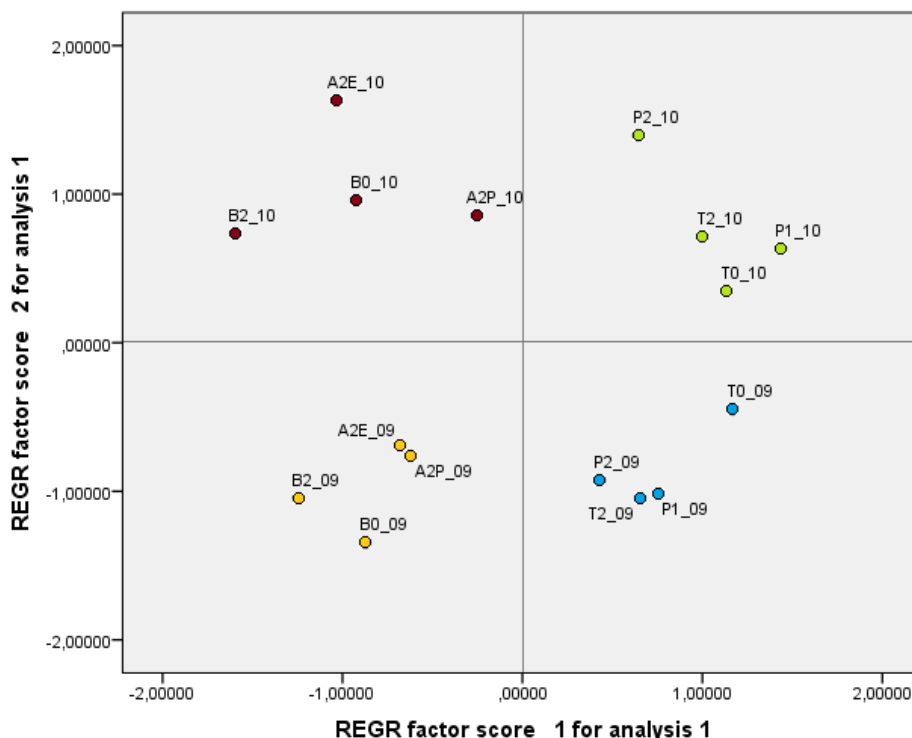


Figura 11. Gráfico de las muestras a través de las nuevas componentes.

Al dividir la gráfica en cuatro sectores se observa que las muestras quedan agrupadas en grupos de cuatro muestras por sector.

En el sector superior izquierdo se encuentran las muestras A2E, A2P, B0 y B2 correspondientes a la vendimia de 2010 y marcadas en color rojo. Las características comunes de estos vinos son; el año de vendimia, la variedad de uva (Tempranillo), valores más elevados en IFC, antocianos, DPPH y FRAP y HRSA, y valores menores en IPT, ác. hidroxicinámicos, flavonoles y taninos.

En el sector superior derecho se encuentran las muestras P1, P2, T0 y T2 correspondientes a la vendimia de 2010 y marcadas en color verde. Las características comunes de estos vinos son; el año de vendimia, la variedad de uva (Cabernet Sauvignon), valores más elevados en IFC, IPT, ác. hidroxicinámicos, flavonoles, antocianos, DPPH y FRAP, y valores menores en taninos y HRSA.

En el sector inferior izquierdo se encuentran las muestras A2E, A2P, B0 y B2 correspondientes a la vendimia de 2009 y marcadas en color naranja. Las características comunes de estos vinos son; el año de vendimia, la variedad de uva (Tempranillo), valores más elevados en taninos y HRSA, y valores menores en IFC, IPT, ác. hidroxicinámicos, flavonoles, antocianos, DPPH y FRAP.

En el sector inferior derecho se encuentran las muestras P1, P2, T0 y T2 correspondientes a la vendimia de 2009 y marcadas en color azul. Las características comunes de estos vinos son; el año de vendimia, la variedad de uva (Cabernet Sauvignon), valores más elevados en IPT, ác. hidroxicinámicos, flavonoles y taninos, y valores menores en IFC, antocianos, DPPH, FRAP y HRSA.

6. Conclusiones

Tras el análisis de los datos anteriormente expuestos se puede concluir que existen evidencias de la relación entre el año de vendimia y la variedad de uva empleada con el contenido en polifenoles y por lo tanto con su capacidad antioxidante.

En cuanto al año de vendimia se puede observar que los vinos elaborados en 2010 presentan mayor IFC y mayor contenido en antocianos aunque por el contrario disminuye el contenido en taninos. Al estudiar la capacidad antioxidante según los métodos DPPH y FRAP se demuestra que los vinos elaborados en la vendimia de 2010 presentan mayor capacidad antioxidante que los vinos de la vendimia anterior.

En cuanto al factor muestra, las muestras de vino elaboradas a partir de uva de la variedad Cabernet Sauvignon presentan mayor contenido en polifenoles según los análisis de IPT, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles. Según el estudio de la capacidad antioxidante se demuestra que los vinos elaborados a partir de uva de la variedad Cabernet Sauvignon presentan una mayor capacidad antioxidante que los vinos elaborados con uva de variedad Tempranillo.

A partir de estos datos se puede concluir que los vinos tintos secos con mayor capacidad antioxidante, coinciden con los vinos de mayor contenido en sustancias fenólicas y son los vinos elaborados a partir de uva de la variedad Cabernet Sauvignon en la vendimia de 2010. Del mismo modo, los vinos elaborados a partir de uva de la variedad Tempranillo en la vendimia de 2009 presentan una menor capacidad antioxidante y un menor contenido en polifenoles que el resto de los vino objeto de estudio.

7. Referencias bibliográficas

Abu-amsha, R., Croft, K.D., Puddey, I.B., Proudfoot, J.M., Beilin, L.J. (1996). Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of serum and low-density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine. *Clin Science*. 91: 449-458.

Andres-Lacueva, C., Lamuela-Raventós, R.M., Buxaderas, S., Torre-Boronat, M.C. (1997). Influence of variety and aging on foaming properties of cava (sparkling wine) – 2. *J Agric Food Chem.* 45: 2520-5.

Bate-Smith, (1981). Astringent tannins of the leaves of Germaine species. *Phytochem.* 20: 211-216.

Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1987). The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239: 70-76.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 28: 25-30.

Carbonneau, A. (1987). Stress moderes sur feuillage induits par le système de conduite et régulation photosynthetique de la vigne. *Symposium International sur la Physiologie de la Vigne.* 24-27 Juin. Bordeaux (France). 4: 378-385.

Halliwel, B., Gutteridge, J. M. C., Aruoma, O. I. (1987). The deoxyribose method: A simple, test-tube. assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals. *Anal. Biochem.* 165: 215-219.

Hepner, Y., Bravdo, B., Loinger, C., Cohén, S. y Tabacman, H. (1985). Effect of drip irrigation schedules on growth, yield, must composition and wine quality of Cabemet Sauvignon. *Am. J. Enol. Vitic.* 36: 77-85.

Hidalgo, P., Pueyo, E., Pozo-Bayón, M.A., Martínez-Rodríguez, A.J., Martín-Alvarez, P., Polo, M.C. (2004). Sensory and analytical study of rose sparkling wines manufactured by second fermentation in the bottle. *J. Agric. Food Chem.* 52: 6640–6645.

Julkunen-Tiito, R. (1985). Phenolic constituents in the leaves of Nothern willows: Methods for the analysis of certain phenolics, *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 33: 213-217.

Kinsella, J.E., Frankel, E., German, B. & Kanner, J. (1993). Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plants foods, in *Food Technology.* 47: 85-89.

Koundouras, S., Van Leeuwen, C., Seguin, G. y Glorie,s Y. (1999). Influence de l'alimentation eneau sur la croissance de la vigne, la maturation des raisins et les caractéristiques des vins en zone méditerranéenne. (Exemple de Némée, Grèce, cépace Saint-Georges). *J. Int.Sci. Vigne. Vin.* 33: 149-160.

Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. 113: 71-88.

Morris, J.R. y Cavrthon, D.L. (1982). Effects of irrigation, fruit load and potassium fertilization on yield, quality and petiole analysis of Concord grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 33: 277-294.

Neja, R.A., Wildman, W.E., Ayers, R.S. y Kasimatis, A.N. (1977). Grapevine response to irrigation and trellis treatments in Salinas Valley. *Am. J. Enol. Vitic.* 28: 16-26.

Peterson, G.L. (1979). Review of the Folin protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall, *Analytical biochemistry.* 100: 201-220.

Pratico, D., Delanty, N. (2000). Oxidative injury in diseases of the central nervous system: focus on Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* 109: 577-585.

Ribereau-Gayon, P., Stonestreet, E., (1965). Le dosage des anthocyanes dans le vins rouge. *Bull. Soc.Chim.* 9: 2649-2652.

Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant. Science.* 2: 152-159.

Sato, M., Ramarathnam, N., Suzuki, Y., Ahkubo, T., Takeuchi, M., Ochi, H. (1996). Varietal differences in the phenolic content and superoxide radical scavenging potential of wines from different sources. *J Agric Food Chem.* 44: 37-41.

Schulze, E. (1986). Whole-plant responses to drought. In: *Plant growth and salinity*, Turner N. Passioura J., ed., CSIRO Australia. 13: 127-141.

Smart, R.E. (1987). Influencia de la luz en la composición y calidad de las uvas. *Acta Hort.* 206: 37-47.

Spiegel-Roy, P. y Bravdo B. (1964). El régimen hídrico de la viña. *Buoletin de L'O.I.V.* 37: 232-248.

Van Leeuwen, C. y Seguin G. (1994). Incidences de l'alimentation en eau de la vigne, appréciée par Tetat hydrique du feuillage, sur le développement de l'appareil végétatif et la maturation du raisin (*Vitis vinifera* variété Cabemet franc, Saint Emilion 1990). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin.* 28: 81-110.

Visioli, F., Borsani, L., Galli, C. (2000). Diet prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc. Res.* 47: 419-425.

Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos.* AMV Ediciones.