



Universidad de Valladolid

Campus de Palencia

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA AGRARIAS

Grado en Enología

**Efecto del estado nutricional e hídrico en el
viñedo sobre la composición fenólica y el
perfil antioxidante del vino**

Alumno: M^a Aránzazu Arnaiz Cuadrado

Tutor: José Manuel Rodríguez Nogales

Cotutor: M^a Rosa González García

Cotutor: Pedro Martín Peña

Mayo de 2021

Copia para el tutor/a

Índice

1.	Resumen	1
2.	Antecedentes.....	1
2.1	Compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante	1
2.2	Influencia del estado hídrico y nutricional del viñedo en la calidad del vino	3
3.	Objetivo	5
4.	Material y muestras	5
4.1	Zona de estudio.	5
4.2	Material vegetal.....	6
4.3	Controles y observaciones en el viñedo	7
4.3.1	Contenido de clorofila foliar	7
4.3.2	Potencial hídrico foliar	7
4.3.3	Rendimiento.....	7
4.3.4	Peso de 100 bayas	7
4.3.5	Peso medio del sarmiento.....	7
4.3.6	Peso de madera de poda	7
4.3.7	°Brix	7
4.3.8	Contenido peciolar de nutrientes	7
4.4	Microvinificaciones	8
4.5	Análisis de la composición fenólica y color del vino.....	8
4.5.1	Contenido en taninos	8
4.5.2	Antocianos	9
4.5.3	Índice de polifenoles totales	9
4.5.4	Características cromáticas	9
4.5.4.1	Método de CIELab.....	9
4.5.4.2	Método de Glories	10
4.5.5	Índice de gelatina	10
4.6	Análisis del perfil antioxidante del vino	11
4.6.1	Método DPPH	11
4.6.2	Método FRAP	11
4.6.3	Método SRSA	12
4.6.4	Método HRSA	14
4.7	Análisis de datos.....	14
5.	Resultados y discusión	15
5.1	Composición fenólica y perfil antioxidante del vino en función del estado hídrico y el contenido foliar de clorofila en el envero.	15
5.2	Efectos del contenido nutricional peciolar en la composición fenólica y perfil antioxidante del vino.....	19
5.3	Correlaciones de las variables de composición del vino y perfil antioxidantes, con el rendimiento, vigor, peso medio del sarmiento, peso de cien bayas y °Brix del mosto.	24
5.4	Correlaciones de la capacidad antioxidante del vino con su color y composición fenólica.	25
6.	Conclusiones	26
7.	Referencias bibliográficas.....	26

1. Resumen

El estado nutricional e hídrico en el viñedo afecta directamente a varias funciones fisiológicas y del metabolismo de la vid, por lo que un cambio en la disponibilidad de agua y nutrientes puede afectar al rendimiento y a la calidad tecnológica de las uvas y por lo tanto a la composición final del vino. La composición fenólica del vino se ve influenciada por varios factores agronómicos, como son la ubicación geográfica, el suelo, las condiciones climáticas y la variedad de vid, y estos factores afectan directamente al desarrollo y composición de las uvas.

El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado es evaluar el efecto del estado nutricional e hídrico de viñedos de la variedad Tempranillo de la D.O. Ribera del Duero sobre la composición fenólica y el perfil antioxidante del vino. Para ello se ha llevado a cabo un seguimiento de diversos parámetros fisiológicos y agronómicos en 20 subparcelas de viñedo, como son la composición de los nutrientes de los peciolo, nivel foliar de clorofila, vigor y rendimiento del viñedo. Estas variables se han relacionado con la composición fenólica y el perfil antioxidante de los vinos elaborados con las uvas procedentes de las 20 subparcelas estudiadas durante el año 2019.

Los resultados del estudio han puesto de manifiesto la importancia del estado nutricional e hídrico del viñedo sobre la composición fenólica y el perfil antioxidante del vino. Se ha observado una disminución del vigor, rendimiento y peso de las bayas en subparcelas con niveles bajos de clorofila, mientras que en subparcelas con estrés hídrico se observa una reducción del peso de bayas, lo que se traduce en un aumento del contenido de azúcar en las uvas. También, se ha observado un mayor contenido en la intensidad colorante y el perfil antioxidante del vino procedentes de las subparcelas con un nivel de clorofila bajo. Se han encontrado relaciones negativas del nivel nutricional peciolar de N, K, Cu y Zn con los polifenoles, el color y la capacidad antioxidantes del vino. Además, se ha observado una relación negativa del contenido de polifenoles y el color de los vinos con el vigor y el rendimiento de la viña, y una mejora en los parámetros cromáticos del vino debido a la adecuada madurez de la uva. Los vinos que presentan mayor capacidad antioxidante son los que poseen mayor intensidad de color y menor luminosidad.

2. Antecedentes

2.1 Compuestos fenólicos y su capacidad antioxidante

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios naturales de las plantas con estructuras químicas muy heterogéneas, caracterizados por presentar un grupo fenol con al menos un grupo hidroxilo y una cadena lateral funcional. Se han descrito más de 500 polifenoles en alimentos y bebidas comunes (Neveu et al., 2010).

Según su esqueleto de carbono, los polifenoles se clasifican en compuestos no flavonoides y compuestos flavonoides (Paixão et al., 2007).

- No flavonoides: Están compuestos por un anillo y 6 átomos de carbono. Pertenecen a este grupo los siguientes compuestos: fenoles no carboxílicos y ácidos fenoles (estilbenos, ácidos hidroxicinámicos y ácidos benzoicos).
- Flavonoides: Están compuestos por dos anillos con 6 átomos de carbono unidos por un puente tricarbonado. A este grupo pertenecen los siguientes compuestos: antocianos, flavonas, flavonoles y taninos condensados (Paixão et al., 2007). Las diferencias en el grado de oxidación del anillo heterocíclico

(C) y la hidroxilación/metoxilación de los tres anillos dan como resultado una gran familia de estructuras con diferencias en sus propiedades fisicoquímicas y la estabilidad. Los compuestos flavonoides del vino más comunes son flavonoles (kaempferol, quercetina y miricetina), flavan-3-ol (catequina, epicatequina y taninos) y antocianinas (cianidina-3-glucósido, peonidina-3-glucósido, delfinidina-3-glucósido, petunidina-3-glucósido y malvidina-3-glucósido) (Oliveira et al., 2011).

Desde el punto de vista químico poseen un anillo benzoico que contiene uno o varios grupos hidroxilos. Su reactividad se debe al carácter ácido de la función fenólica y al carácter nucleofílico del anillo de benceno (Paixão et al., 2007).

Las uvas contienen compuestos no flavonoides principalmente en la pulpa, mientras que los compuestos flavonoides se encuentran en el hollejo, semillas y raspón (Paixão et al., 2007). Se encuentran altas cantidades de compuestos fenólicos tanto en las uvas como en el vino y la mayoría de estos compuestos fenólicos actúan como antioxidantes en el vino (Rockenbach et al., 2011).

En cuanto a su importancia en enología los compuestos fenólicos no flavonoides son los responsables de sabor amargo en los vinos, mientras que los flavonoides intervienen en la composición fenólica del vino y son los que poseen la propiedad antioxidante.

Los compuestos fenólicos protegen a múltiples órganos de la oxidación y, por tanto, deben considerarse antioxidantes naturales, intervienen en las reacciones de terminación de las cadenas de radicales libres, impidiendo la oxidación de los lípidos y otras moléculas y cediendo átomos de hidrógeno de forma que neutralizan los radicales libres. Se ha descrito que los compuestos antioxidantes tienen la capacidad de inhibir las reacciones de los radicales libres y retrasar e inhibir el daño celular (Nimse y Pal, 2015).

Los compuestos antioxidantes se pueden clasificar de varias formas, según su función (eliminadores de radicales libres, eliminadores de agentes oxidantes no radicales, compuestos que inhiben la generación de oxidantes, agentes quelantes de metales de transición y compuestos que pueden estimular la producción de compuestos antioxidantes endógenos) (Granato et al., 2018). También se pueden clasificar en enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes enzimáticos actúan descomponiendo y eliminando los radicales libres, convirtiendo los productos oxidativos en peróxido de hidrógeno y luego en agua, en un proceso de varios pasos en presencia de cofactores como Cu, Zn, Mn y Fe. Los antioxidantes no enzimáticos funcionan interrumpiendo las reacciones en cadena de los radicales libres (Nimse y Pal, 2015). La capacidad antioxidante de los fenoles depende más de su estructura y conformación que de su concentración (Giovinazzo et al., 2019). Los compuestos fenólicos del vino tinto que se correlacionan significativamente con la capacidad antioxidante son los flavonoides, especialmente los que poseen las fracciones de flavanol y antocianinas (Rivero-Peréz et al., 2007).

Los flavonoides poseen una fuerte actividad antioxidante, uno de los mecanismos que explica el efecto protector de los flavonoides sobre el ADN es la participación de los iones metálicos quelantes, como el Cu o el Fe, que previenen la

generación de radicales libres (ROS) (Nimse & Pal, 2015). Además, poseen propiedades biológicas de interés como es la capacidad antioxidante (Paixão et al., 2007). Se ha demostrado fuertes efectos antioxidantes de los compuestos polifenólicos considerándoles los responsables de reducir el riesgo de algunas enfermedades asociadas al estrés oxidativo (Muselík et al., 2007).

Los métodos para medir la capacidad antioxidante del vino se diferencian en su mecanismo de reacción. Los antioxidantes pueden neutralizar la acción de las especies reactivas en las membranas celulares por los siguientes mecanismos: por la transferencia de átomos de hidrógeno (HAT), transferencia de un solo electrón (SET) y la capacidad de quelar metales de transición (Granato et al., 2018).

Por lo tanto, las propiedades beneficiosas del vino tinto se deben principalmente a las propiedades antioxidantes de los flavonoides que interfieren directamente en la eliminación de radicales (Paixão et al., 2007). Se ha demostrado que esta clase de compuestos ejercen importantes efectos sobre la salud eliminando las especies ROS, que se consideran la principal causa de diferentes enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas. (Giovinazzo et al., 2019).

2.2 Influencia del estado hídrico y nutricional del viñedo en la calidad del vino

La composición fenólica en el vino se ve influenciada por factores agronómicos, como son la ubicación geográfica, el tipo de suelo, las condiciones climáticas y la variedad de vid, factores que afectan directamente en el desarrollo y composición de las uvas (Paixão et al., 2007). Además de los factores agronómicos existen factores asociados a las técnicas de vinificación que influyen en la composición fenólica del vino. Las técnicas de vinificación juegan un papel importante en la extracción de polifenoles de las uvas y la estabilidad de los vinos, ya que la concentración de flavonoides en el vino se ve afectada por los procesos de vinificación como el prensado y la maceración, que afectan al grado de extracción de los hollejos y especialmente de las semillas que son ricas en unidades de flavan-3-ol (Oliveira et al., 2011). Durante la maceración y fermentación alcohólica se producen reacciones de condensación de algunas moléculas como las catequinas, antocianinas y procianidinas, dando como resultado nuevos pigmentos poliméricos que son los responsables de cambios de color en el vino (Paixão et al., 2007).

El estrés hídrico disminuye la actividad fotosintética provocando el cierre estomático y reduciendo la disponibilidad de CO₂ en el mesófilo foliar, la pérdida de la capacidad fotosintética reduce la síntesis y la acumulación de sustancias en la uva durante su maduración (Ojeda et al., 2002). Algunos autores como Zoecklein et al. (1990) demostraron que niveles moderados de estrés en la vid tienen efectos positivos en la calidad de la uva, ya que ayudan a regular el crecimiento vegetativo, obteniendo menores rendimientos y bayas más pequeñas. Esto provoca una concentración de los compuestos fenólicos, responsables del color, astringencia y amargor de los vinos tintos (Ribéreau-Gayon y Glories, 1987). Por lo tanto, la fertilización afecta a la concentración y a la cantidad de compuestos fenólicos en las uvas, incluidas las antocianinas y los ácidos fenólicos.

La nutrición mineral tiene efectos importantes sobre el rendimiento y la calidad de la uva. Entre los nutrientes hay que destacar el N, ya que tiene gran influencia

sobre el crecimiento vegetativo de la vid, afectando al rendimiento y a la composición de los tejidos (Karimi et al., 2019).

El N mejora el rendimiento y el vigor de la vid, pero puede retrasar la maduración de la uva y reducir su calidad, ya que disminuye el contenido en sólidos solubles y antocianinas cuando su disponibilidad es excesiva (Bavaresco et al., 2010). Además, el N interactúa con otros nutrientes, ya que un incremento en la concentración de N aumenta los niveles de Fe y P, mientras que disminuye los niveles de Mg y Ca. El estrés hídrico y la deficiencia de N reducen el crecimiento vegetativo de la vid y aumentan la estimulación de la biosíntesis de polifenoles de la uva. Además, se ha demostrado que contenidos bajos de N con un moderado estrés hídrico durante el periodo de crecimiento vegetativo tienen efectos positivos sobre el contenido fenólico de las bayas y en la calidad del vino (Keller et al., 2001).

El P es un elemento móvil en las plantas y es esencial para la fotosíntesis, la respiración y la regulación de procesos metabólicos, participa en los sistemas de almacenamiento y transferencia de energía y azúcares (Keller et al., 2001). Existen interacciones del P con otros nutrientes; un contenido alto de P provoca deficiencias de Zn y Fe mientras que la deficiencia de P reduce el rendimiento debido a que afecta al ciclo reproductivo, disminuyendo el número de bayas por racimo, el peso de la baya, peso del racimo y el número de racimos por planta (Catalina, 2015). El exceso de P bloquea oligoelementos como el Fe, Mn y Zn, manifestándose en forma de clorosis y disminuyendo el vigor.

El K mejora el crecimiento de brotes, la acumulación de azúcares y de almidón tanto en las bayas como en los órganos leñosos y favorece la resistencia al estrés hídrico (Bavaresco et al., 2010). El exceso de K disminuye la concentración de Mg y Ca en la hoja. El K se acumula principalmente en los tejidos del hollejo durante la maduración, como resultado de la retranslocación del ion desde las hojas adultas. El catión K neutraliza los ácidos orgánicos y desempeña un papel importante en el control de la acidez y el pH del mosto (Catalina, 2015). La nutrición potásica también influye en el contenido de sólidos solubles ya que aumentan con un aumento de K y en la concentración de antocianinas en el mosto (Catalina et al., 2012).

El Mg aumenta la síntesis de azúcar en la uva e incrementa la translocación de las moléculas sintetizadas por la fotosíntesis de la hoja al fruto (Catalina, 2015). Un aumento de Mg incrementa el rendimiento y el peso de la baya.

La clorosis férrica es muy frecuente en el viñedo, el déficit de Fe disminuye el crecimiento vegetativo, la eficiencia fotosintética y la acumulación de materia seca. Esto se traduce en una pérdida de calidad de los mostos, debido a que se reduce la cantidad de azúcar y de antocianos acumulados en las bayas durante la maduración e incrementando la acidez total (Karimi et al., 2019). Se ha demostrado que una deficiencia moderada de Fe, provoca una depresión de la actividad peroxidasa en las uvas, provocando un aumento de la concentración de resveratrol, promoviendo la acumulación de antocianinas y polifenoles (Bavaresco et al., 2010).

El Mn incrementa la fertilidad de las yemas, el cuajado del fruto y favorece la lignificación de la madera, contribuyendo positivamente sobre la calidad del vino (Bavaresco et al., 2010). Mientras que el Cu interviene en la formación del polen, la

fecundación, la lignificación de los tejidos y la defensa frente a las enfermedades (Bavaresco et al., 2010). El Mn es un antagonista del Fe y en altas concentraciones puede bloquear algunas rutas metabólicas en las que interviene el Fe.

Tanto el Fe como el N desempeñan importantes funciones fisiológicas como cofactores de algunas proteínas e inhibidores de las especies ROS (Keller et al., 2001). El Fe es un cofactor de muchas enzimas antioxidantes y mejora la estabilidad y actividad de las enzimas (Zhu et al., 2016). Según el estudio realizado por González et al. (2019), un suministro suficiente de Fe y N puede mejorar la capacidad antioxidante de las uvas, por una mayor acumulación de compuestos fenólicos. Además la aplicación foliar de urea antes y después de la floración, aumenta la concentración de resveratrol (Karimi et al., 2019), por lo que la fertilización de N favorece la síntesis de aminoácidos como la fenilalanina, que es un precursor de compuestos fenólicos como los estilbenos.

En resumen, tanto el estado nutricional e hídrico de la planta, afecta directamente a varias funciones fisiológicas y del metabolismo de la vid y un cambio en su disponibilidad puede afectar al rendimiento y la calidad nutricional de las uvas y por lo tanto en la composición final del vino.

3. Objetivo

El objetivo del presente Trabajo Fin de Grado es estudiar el efecto del estado nutricional e hídrico de viñedos de la variedad Tempranillo de la D.O. Ribera del Duero sobre la composición fenólica y el perfil antioxidante del vino.

4. Material y muestras

En este estudio se ha llevado a cabo un seguimiento de diversos parámetros fisiológicos y agronómicos en 20 subparcelas de viñedo en el año 2019, como el estado nutricional, nivel foliar de clorofila, vigor y rendimiento, para poder relacionar estos datos con la composición fenólica y el perfil antioxidante del vino elaborado.

4.1 Zona de estudio.

Las 20 subparcelas del estudio pertenecen a la Bodega Emilio Moro S.L., se encuentran en la zona oeste de la D.O. Ribera del Duero, en la localidad de Pesquera de Duero (Valladolid), a una altitud media de 800 metros sobre el nivel del mar. En la Tabla 1 se observa el paraje y localización de cada subparcela.

Tabla 1. Localización de las parcelas

Número	Paraje	Parcela	Latitud	Longitud
1	CAMINO	VH11-1	41.6565440	-4.1631387
2	CAMINO	VH11-5	41.6565694	-4.1634587
3	CHOZO	VH14-1	41.6561122	-4.1648545
4	CHOZO	VH14-5	41.6556935	-4.1646035
5	CHOZO	VC19-5	41.6560313	-4.1663320
6	CHOZO	VC19-6	41.6558372	-4.1654518
7	CHOZO	VH36	41.6552361	-4.1658278
8	HONTANILLA	VH10-1	41.6533993	-4.1750898
9	HONTANILLA	VH10-5	41.6535117	-4.1752565
10	HONTANILLA	VH31	41.6534858	-4.1755532
11	HONTANILLA	VH15-1	41.6530058	-4.1761190
12	HONTANILLA	VC32	41.6529948	-4.1766270
13	CORNALVO	VC21-1	41.6577073	-4.1777572
14	CORNALVO	VC22-1	41.6577392	-4.1774133
15	CORNALVO	VC22-5	41.6577778	-4.1766666
16	CORNALVO	VC18-1	41.6577772	-4.1762960
17	CORNALVO	VC18-5	41.6579713	-4.1764295
18	CORNALVO	VC35	41.6582721	-4.1755680
19	CORNALVO	VH34	41.6572288	-4.1743963
20	CORNALVO	VC33	41.6571578	-4.1750360

Para la elección de las subparcelas se siguieron los siguientes criterios:

- Deben ser representativas del cultivo en la zona, además deben corresponder al viñedo tipo en cuanto a sistemas de conducción y material vegetal.
- La dimensión de las subparcelas debe ser aproximadamente de 10 x 10 m².
- Las características del suelo de las subparcelas deben generar la máxima variabilidad posible en el estado hídrico y nutricional de las plantas. Se han elegido parcelas con distinta topografía, profundidad útil de suelo, etc., realizando previamente analíticas sobre la composición del suelo.

4.2 Material vegetal

Las subparcelas estudiadas corresponden a la variedad Tempranillo injertada sobre el portainjerto 110-Richter. Son viñedos con una edad entre 20 y 30 años. Se encuentra en plena producción y en secano, el sistema de conducción es de espaldera en doble cordón Royat, con un marco de plantación para las parcelas designadas con el número 18, 19 y 20 (Tabla 1) de 3 x 1,30 m, para el resto de las parcelas es de 3 x 1,50 m, con lo que la densidad de plantación está entre 2.300 y 2.600 plantas/ha, siendo la carga aproximada de 36.000 yemas/ha, con 16 yemas/planta.

La variedad Tempranillo es la principal en Ribera del Duero, agrónomicamente, presenta un porte erguido, con un potencial productivo medio-alto en función del terreno, sensible a la sequía extrema y al oídio y medianamente sensible a excoriosis. Desde el punto de vista de la fenología, posee un desborre y una maduración temprana.

En cuanto al portainjerto utilizado es 110 Richter (*Vitis berlandieri* cv. Ressaygues nº2 x *Vitis rupestris* cv. Martin), es vigoroso y retrasa la maduración. Su resistencia a la clorosis férrica es media, tiene buena tolerancia a la sequía, pero es sensible al exceso de humedad (Hidalgo et al., 2011).

4.3 Controles y observaciones en el viñedo

El contenido de clorofila foliar (CLENV) y el potencial hídrico de la hoja antes de amanecer (PHAENV) se registra en el envero, cuando el promedio de bayas coloreadas es del 75% en todas las subparcelas del estudio.

4.3.1 Contenido de clorofila foliar

El contenido de clorofila foliar se determina con un medidor portátil de clorofila CL-01 (Hansatech). Para ello se tomaron 20 medidas de cada una de las subparcelas, sobre hojas adultas y sanas, de la zona media del pámpano.

4.3.2 Potencial hídrico foliar

El potencial hídrico foliar se midió en cada subparcela en las dos horas antes del amanecer, los valores se tomaron con una cámara de presión Scholander (Solfranc Tecnología) en seis hojas completamente expandidas en cada subparcela, ubicadas en el cuarto o quinto nudo desde el ápice.

4.3.3 Rendimiento

Se vendimió cada subparcela y se pesó la cosecha, así tenemos el peso por unidad de superficie o rendimiento (kg uva/m²).

4.3.4 Peso de 100 bayas

Se obtuvo realizando un muestreo de 100 bayas en el momento de la vendimia en cada subparcela.

4.3.5 Peso medio del sarmiento

Es el coeficiente entre el peso de la madera de poda y el número de sarmientos totales.

4.3.6 Peso de madera de poda

Se pesa el material de poda en una báscula digital de campo con un error de ± 5 g, se expresa en kg madera/m².

4.3.7 °Brix

El °Brix mide la cantidad de azúcar disuelta en el mosto, se miden las muestras a través de un refractómetro digital calibrado DR-101 BRIX (Optic Ivymen), siguiendo la metodología oficial de la UE (CE, 1990).

4.3.8 Contenido peciolar de nutrientes

Se realizó un muestreo en cada subparcela de 60 peciols de las hojas opuestas al primer racimo, situado en la zona media de las cepas en la época de envero. Para

analizar el contenido de nutrientes peciolar se siguen las recomendaciones dadas por la OIV (OIV, 1996). Las muestras fueron analizadas en el Centro Tecnológico Agrario y Agroalimentario Itagra.CT. El contenido en N se determinó con el método Kjeldahl y el resto de contenido se determinaron por espectrometría atómica tras realizar la acenización de las muestras en un horno a 450°C.

4.4 Microvinificaciones

La vinificación de la vendimia de las 20 subparcelas se realizó, por duplicado, en la Escuela Técnica Superior de Ingenierías Agrarias (ETSIIAA). Tras la recepción de la vendimia, los racimos de uva fueron despalillados y estrujados mediante una despalilladora-estrujadora con rodillo de perfiles conjugados horizontales. A continuación se encubaron 12 kg de pasta en depósitos de acero inoxidable de 20 l, se sulfitó a una dosis de 6 g/Hl de SO₂ total y se homogenizó. Para realizar la fermentación alcohólica (FAL) se inocularon levaduras secas activas comerciales de *Saccharomyces cerevisiae* (Zymaflore RX60, Laffor), previa rehidratación a la dosis de 16 g/Hl. Se controló diariamente la evolución de la FAL midiendo la densidad y la temperatura, considerándose finalizada la FAL con densidades menores de 995 g/Hl y se confirmó mediante el análisis de azúcares residuales, siendo este valor inferior de 5 g/l. Finalizada la FAL se realizó el descube y prensado con una presa vertical neumática a presiones inferiores a 2 bar. Posteriormente se realizó un trasiego a los 7 días para eliminar las lías gruesas.

La fermentación maloláctica (FML) se realizó en recipientes de vidrio de 4 l a una temperatura de unos 20-22°C, se inocularon bacterias de la especie *Oenococcus oeni* (SB3 instat Laffort) que se acondicionaron siguiendo el protocolo marcado por la casa comercial. Se confirmó la degradación del ácido málico mediante una cromatografía en papel. Una vez finalizada la FML se realizó un trasiego y se sulfitó con metabisulfito potásico a una dosis de 30 mg/l de SO₂ libre. A continuación se realizó una estabilización del vino en una cámara a 10-13°C durante un mes, finalmente antes de embotellar el vino se trasegó, homogeneizó y se comprobó el SO₂ libre para dejarlo a 30 mg/l.

4.5 Análisis de la composición fenólica y color del vino

4.5.1 Contenido en taninos

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

Procedimiento

- Previamente realizaremos en un matraz aforado de 10 ml, una dilución a 1:10 de la muestra de vino tinto.
- Se preparan 2 tubos, en el tubo A se añade 1 ml de muestra diluida 1:10, 0,5 ml de agua destilada, 3 ml de HCl al 37 %, a continuación, se tapa el tubo y se protege de la luz, se calienta a 90°C durante 30 minutos, se enfría rápidamente y se añade 0,5 ml de etanol. Mientras que el tubo B se realizan los pasos anteriores menos el calentamiento a 90°C.

- Se mide la absorbancia a 550 nm en cubeta de vidrio con un paso óptico de 1 cm.
- La concentración de taninos viene dada por la expresión:

$$\text{Taninos totales(g/l)} = (A_1 - A_2) \times 19,33$$

4.5.2 Antocianos

El método empleado para la determinación de los antocianos totales presentes en un vino es el de decoloración mediante bisulfito de sodio (Ribéreau-Gayon y Stonestreet, 1965), donde la decoloración es proporcional a la concentración de antocianos libres.

Procedimiento

- Se prepara una muestra inicial de 0,5 ml de vino, 0,5 ml de etanol y 10 ml de HCl al 2%.
- Se preparan dos tubos, en el tubo A se añade 5 ml de la mezcla inicial y 2 ml de agua destilada, mientras que el tubo B se añade 5 ml de la mezcla inicial y 2 ml de NaHSO₃ al 15%.
- Se espera 15 minutos y se mide la absorbancia a 520 nm en cubeta de vidrio 1 cm de paso óptico.
- La concentración de antocianos se calcula con la siguiente expresión:

$$C(\text{mg/l}) = (A_1 - A_2) \times 875$$

4.5.3 Índice de polifenoles totales

Los anillos bencénicos característicos de los compuestos fenólicos absorben en el ultravioleta con un máximo a 280 nm (Zamora, 2003).

Procedimiento

- Se diluye la muestra 1:50 y se mide su absorbancia a 280 nm en cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico.
- El índice de Polifenoles Totales (IPT) se calcula con la siguiente expresión:

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

4.5.4 Características cromáticas

4.5.4.1 Método de CIELab

Para determinar las características cromáticas de las muestras de vino, se emplea el método CIELab (OIV, 2006), obteniendo los siguientes parámetros:

L*: Luminosidad o claridad

a*: Componente de color rojo/verde

b*: Componente de color amarillo/azul

C*: Cromaticidad o saturación

h*: Tonalidad

Para realizar las medidas se utiliza un espectrofotómetro UV-VIS Genesys (Thermo Scientific) empleando cubetas de vidrio de 1 mm de paso óptico, a unas longitudes de onda de 625, 550, 495 y 445 nm.

4.5.4.2 Método de Glories

La intensidad colorante (IC) viene dada por la suma de las absorbancias medidas en cubeta de vidrio 1 mm de paso óptico a las longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm. La tonalidad (N) se expresa por la relación entre la absorbancia a 420 nm y la absorbancia a 520 nm (Zamora, 2003).

$$I.C = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$
$$\text{Tonalidad} = \frac{A_{420}}{A_{520}}$$

4.5.5 Índice de gelatina

Se basa en la propiedad de los taninos de formar con las proteínas combinaciones estables (Zamora, 2003).

Se considera que los taninos son duros y astringentes si el índice de gelatina es mayor del 60 %, si es del 40 al 60 % son taninos complejos y son taninos débiles si el índice se encuentra entre el 20 al 40 %.

Procedimiento

- Se preparan dos tubos falcón, en el tubo A se añade 40 ml de vino y 4 ml de una solución fría de gelatina soluble de 70 g/l, se deja reposar durante 3 días a 4°C, mientras que el tubo B se añade 4 ml de agua destilada en lugar de la gelatina.
- Los tubos se centrifuga a 4.000 rpm durante 10 minutos y se ensaya la concentración de taninos en ambos sobrenadantes.
- A partir de estos valores se calcula el índice de gelatina:

$$\text{Índice de gelatina} = \frac{(C_B - C_A)}{C_B} \times 100$$

Siendo:

C_B: concentración de taninos en el tubo B

C_A: concentración de taninos en el tubo A

4.6 Análisis del perfil antioxidante del vino

4.6.1 Método DPPH

Mediante este método se determina la capacidad antioxidante de una muestra, por medio de la reducción del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) (Brans-Williams et al., 1995). La presencia de un antioxidante en el vino produce una pérdida de color violáceo del radical a 517 nm (Rivero-Pérez et al., 2007).

Procedimiento

- Diluir la muestra de vino tinto 1:50.
- Preparación de las muestras. En una placa de 96 pocillos se añaden en cada pocillo, por triplicado, 196 μL de la dilución de DPPH 60 μM en metanol y 4 μL de la muestra de vino diluido.
- Preparación del blanco. Añadir en cada pocillo por triplicado, 196 μL de la dilución de DPPH 60 μM en metanol y 4 μL de agua destilada.
- Se prepara la recta de calibrado con Trolox (10mM en metanol), a las siguientes concentraciones: 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 y 1,0 mM. Se toman 4 μL de cada patrón y se mezclan con 196 μL de la dilución de DPPH.
- Dejar 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y medir la absorbancia a 517 nm en un espectrofotómetro UV-VIS con un lector de placas.

Cálculos

- Construir la recta de calibrado con las distintas concentraciones de Trolox.
- Calcular la diferencia de absorbancia entre el blanco y la muestra. Esta diferencia se lleva a la recta de calibrado para obtener la concentración de mM Trolox y se multiplica por el factor de dilución.
- Los resultados se expresan en mM de Trolox, usando la siguiente recta de calibrado.

$$\text{Abs } 517 \text{ nm} = 0,2322 \cdot \text{Concentración de Trolox} - 0,0033$$

$$R^2 = 0,9921$$

4.6.2 Método FRAP

Este método evalúa la capacidad antioxidante de una muestra de acuerdo con su capacidad para reducir el Fe(III) presente en un complejo con la 2,4,6-tri(2-piridel)-s-triazina (TPTZ) hasta Fe(II) (Benzie y Strain, 1996, Rivero-Pérez et al., 2007). Mediante la donación de electrones del antioxidante se forma un compuesto de color azul (Fe (II)-TPTZ), que presenta un máximo de absorbancia a 593 nm. La medida a esa longitud de onda es proporcional a la capacidad reductora de la muestra.

Procedimiento

- Diluir las muestras de vino 1:50.
- Preparación del reactivo TPTZ. Añadir 25 ml de acetato de sodio 0,3 M a pH 3,6, 2,5 ml de TPTZ 10 mM, 2,5 ml de FeCl₃ 20 mM y 3 ml de agua destilada.
- Preparación de las muestras. En una placa de 96 pocillos se añaden, en cada pocillo, por triplicado, 194 µL del reactivo TPTZ y 6 µL de la muestra de vino diluido.
- Preparación del blanco. Añadir en cada pocillo por triplicado, 194 µL del reactivo TPTZ y 4 µL de agua destilada.
- Recta de calibrado con Trolox (10 mM en etanol) con las siguientes concentraciones: 0,0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 y 1,0 mM. Se toman 6 µL de cada patrón y se mezclan con 194 µL del reactivo TPTZ.
- Incubar a 37°C durante 30 minutos en oscuridad y medir las absorbancias a 593 nm en un espectrofotómetro UV-VIS con un lector de placas.

Cálculos

- Construir la recta de calibrado con las distintas concentraciones de Trolox.
- Calcular la diferencia de absorbancia entre la muestra y el blanco. Esta diferencia se lleva a la recta de calibrado para obtener la concentración de mM Trolox y se multiplica por el factor de dilución.
- Los resultados se expresan en mM de Trolox, usando la siguiente curva patrón lineal.

$$\text{Abs } 593 \text{ nm} = 0,9113 \cdot \text{Concentración de Trolox} - 0,0125$$

$$R^2 = 0,9901$$

4.6.3 Método SRSA

La actividad estabilizadora frente al radical superóxido se ensaya mediante el método propuesto por Li et al. (2013).

El radical superóxido (O₂⁻) es un radical libre cargado, formado como consecuencia de una reducción monovalente del oxígeno molecular. Puede actuar como oxidante débil o como agente reductor de iones metálicos. La adición de un H⁺ da lugar a la formación de HO₂⁻ convirtiéndose en un agente oxidante muy activo, selectivo y específico.

El método para la evaluación de la actividad estabilizadora del radical O₂⁻ se basa en el sistema PMS-NADH-NBT, compuesto por N-metilfenacil metosulfato (PMS), nitroazul tetrazolio (NBT) y NADH. Como se muestra en la Figura 1, el radical O₂⁻ producido por la reacción de PMS y NADH en presencia de O₂ reduce al NBT, produciendo un compuesto (formazán) con absorbancia a 560 nm.

En presencia de un antioxidante se reduce la cantidad del radical O_2^- presente en el medio de reacción y, por lo tanto, se reduce la cantidad de formazán formado registrándose un descenso de la absorbancia a 560 nm (Robak y Gryglewski, 1988).

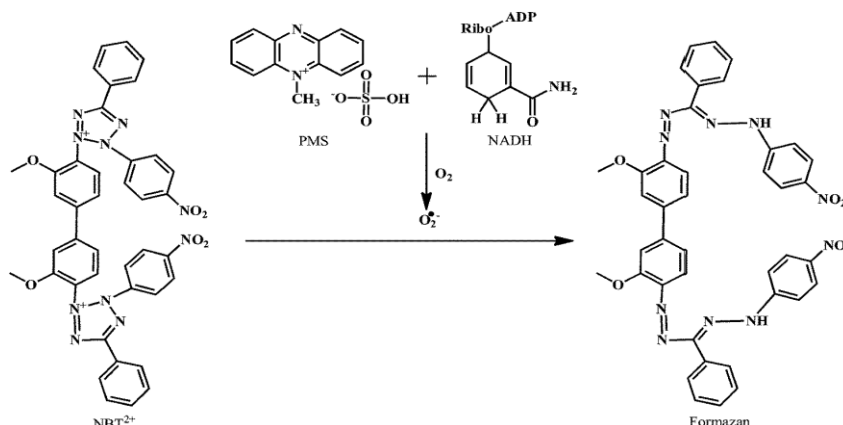


Figura 1. Reducción del NBT por el radical anión superóxido (O_2^-) producido en la reacción PMS-NADH (Nimse y Pal, 2015).

Reactivos

- Diluir la muestra de vino 3:50 con agua destilada.
- Preparar los siguientes reactivos: 179 μ M NADH, 115 μ M NBT, 77 μ M PMS en tampón Tris-HCl 16 mM a pH =8.

Procedimiento

- Añadir en cada pocillo el volumen de reactivos mostrados en la tabla 2, tanto el control como la muestra se hace por triplicado, mientras que el blanco de la muestra se hace por duplicado.

Tabla 2. Preparación de las muestras.

Volumen (μ L)	Control	Muestra	Blanco de muestra
Tris-HCl	10	-	105
NADH	50	50	-
NBT	50	50	-
PMS	5	5	-
Muestra	-	10	10

- Incubar durante 5 minutos en agitación y leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 560 nm.
- Los resultados se expresan como % de inhibición:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(A - A_1)}{A} \times 100$$

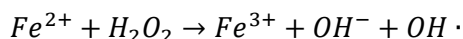
Siendo:

A = Abs del control

A₁ = Abs de muestra - Abs blanco de muestra

4.6.4 Método HRSA

El radical hidroxilo (OH·) es el radical libre más reactivo en sistemas biológicos y puede reaccionar con casi cualquier molécula, DNA, proteínas y lípidos. El método para medir la capacidad estabilizadora del radical OH· se basa en generar el radical OH· a través de la reacción de Fenton empleando Fe (II) y H₂O₂.



Este radical provoca una hidroxilación aromática del ácido salicílico para producir diversos compuestos hidroxilados, principalmente isómeros dihidroxibenzoatos con absorbancia a 593 nm (Smirnov y Cumbres, 1989). Muchos antioxidantes pueden actuar estabilizando el radical OH· e impidiendo la hidroxilación aromática del ácido salicílico (Tremel y Šmejkal, 2016).

Procedimiento

- Para generar el radical OH· se mezclan 120 µL de sulfato ferroso (20 mM), 54 µL de peróxido de hidrógeno (0,15 %) y 4,8 mL de agua destilada.
- Las muestras de vino (A1) se preparan mezclando 40 µL de muestra de vino (1:50), 166 µL de la mezcla de reactivos del radical OH· y 40 µL de ácido salicílico 8 mM.
- Se prepara un primer blanco (A0), por triplicado, añadiendo 40 µL de agua destilada, 166 µL de la mezcla de reactivos del radical OH· y 40 µL de ácido salicílico 8 mM.
- Se prepara un segundo blanco (A2), por triplicado, añadiendo 40 µL de la muestra de vino (1:50), 166 µL de la mezcla de reactivos del radical OH· y 40 µL de agua destilada.
- La mezcla se incuba durante 30 minutos a 37°C y se mide la absorbancia a 593 nm.
- El resultado se expresa como porcentaje de inhibición (%) (Li et al., 2013).

$$\% \text{ de inhibición} = \left[\frac{(A0 - (A1 - A2))}{A0} \right] \times 100$$

4.7 Análisis de datos

Para realizar el estudio de los efectos significativos del contenido de nutrientes peculiar sobre la composición fenólica y antioxidantes del vino, se realizó un análisis de regresión lineal. La correlación entre los diferentes parámetros agronómicos y la

composición fenólica y antioxidante del vino se analizó mediante los coeficientes de Pearson.

Además, se realizó un análisis factorial de varianza (ANOVA) de los distintos parámetros del vino en función del estado nutricional, analizando las diferencias entre las medias con el Test de Tukey ($p < 0,05$). Para ello las subparcelas se clasificaron en grupos de alto y bajo nivel de clorofila, y de alto y bajo estado hídrico, considerando las medianas de los valores de contenido clorofílico foliar ($110 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) y potencial hídrico foliar ($-0,810 \text{ MPa}$) en enero, respectivamente.

El análisis y tratamiento de los datos se ha realizado mediante el paquete estadístico SAS (SAS Institute INC, 2004).

5. Resultados y discusión

5.1 Composición fenólica y perfil antioxidante del vino en función del estado hídrico y el contenido foliar de clorofila en el enero.

La Tabla 3 presenta los datos del análisis de varianza (ANOVA) de los distintos parámetros del vino en función del estado hídrico y nutricional en el enero. Se ve que hay diferencias significativas entre las medias del rendimiento, vigor, peso de cien bayas, peso medio del sarmiento e intensidad colorante con el nivel de clorofila, también se ven diferencias entre el peso de cien bayas y el °Brix con respecto al potencial hídrico. La interacción entre el contenido de clorofila y el potencial hídrico de base en el enero no es significativa salvo en el parámetro de taninos. Para comparar las medias significativas del análisis de varianza (ANOVA) se realiza el Test Tukey, $p > 0,05$.

Tabla 3 Valores de la F de Fisher y nivel de significación del análisis factorial de la varianza (ANOVA) de los parámetros de composición y características antioxidantes en función del estado hídrico (potencial hídrico de base en envero) y nutricional (contenido de clorofila en envero).

Parámetros	CLENV	PHAENV	CL*PHAENV
Rendimiento (Kg uva/m ²)	5,10 *	0,84	0,04
Vigor (Kg madera poda/m ²)	9,00 **	0,88	0,58
P 100 (g)	4,59 *	7,70 **	0,47
PMS (g)	5,63 *	0,75	0,26
°Brix	4,30	5,22 *	0,23
IPT	1,66	1,35	0,01
L* (Luminosidad)	4,18	0,42	0,01
C* (Cromaticidad)	1,39	0,00	0,32
h* (Tonalidad)	0,71	0,73	0,67
a* (Componente de color rojo/verde)	1,22	0,00	0,32
b* (Componente de color amarillo/azul)	0,21	0,06	1,10
Intensidad colorante	6,12 *	0,52	0,17
Tonalidad	0,19	0,04	3,58
Antocianos (mg/l)	0,07	0,18	0,10
Taninos (g/l)	0,35	1,55	6,75 *
I. gelatina %	0,05	0,73	0,80
DPPH (mM)	5,38 *	1,12	1,11
FRAP (mM)	0,10	0,03	0,31
SRSA (%)	0,02	0,00	0,24
HRSA (%)	0,00	0,66	3,65

Niveles de significación: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001

CLENV (µg/cm²) contenido de clorofila en el envero, PHAENV (MPa) potencial hídrico de base en el envero, CL*PHAENV interacción entre el contenido de clorofila y el potencial hídrico de base en el envero, P 100 (g) peso de cien bayas, PMS (g) peso medio del sarmiento.

En las Figuras 2 y 3 se observa una disminución del peso de las bayas y el °Brix en subparcelas con bajos niveles de potencial hídrico foliar, mientras que en la Figuras 4 se ve una disminución del rendimiento, vigor, peso medio del sarmiento y peso de las bayas en subparcelas con bajos niveles de clorofila foliar. El peso de poda disminuye en las subparcelas con bajos niveles de clorofila como consecuencia de la disminución de la capacidad fotosintética, la deficiencia de hierro reduce el crecimiento vegetativo anual de la vid (González et al., 2019).

En la Figura 5 se observa una mayor intensidad colorante de los vinos procedentes de las subparcelas con bajos niveles de clorofila foliar. Esto se debe a que valores bajos de clorofila se asocian con una disminución del rendimiento, vigor y peso de la baya, lo que se traduce en mejores índices de maduración (González et al., 2019)

En la Figura 6, se observa un aumento de la actividad antioxidante, medida por DPPH, de los vinos procedentes de las subparcelas con bajos niveles de clorofila foliar, por lo que estos vinos tienen mayor capacidad de eliminar los radicales libres. En un estudio realizado por Karimi et al. (2019), se observó una menor capacidad antioxidante del mosto de uva, medida por DPPH, al incrementarse la dosis de Fe suplementando al viñedo.

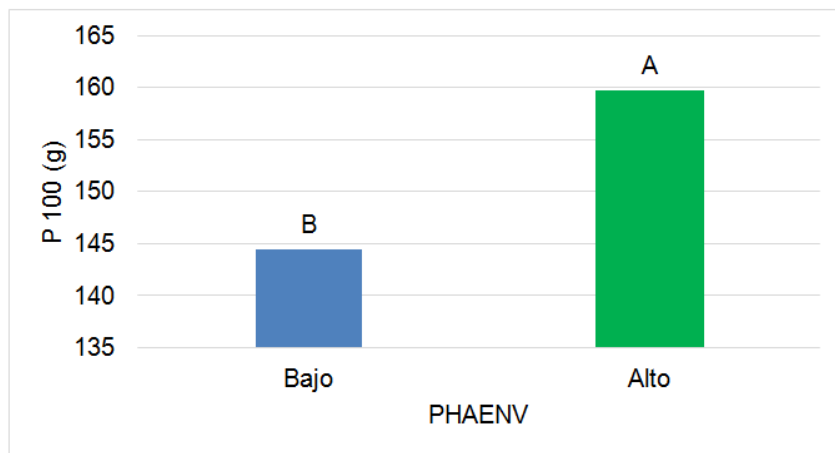


Figura 2. Comparación de las subparcelas con alto y bajo potencial hídrico de base en el envero con P 100 (g) (Test Tukey, $p > 0,05$).

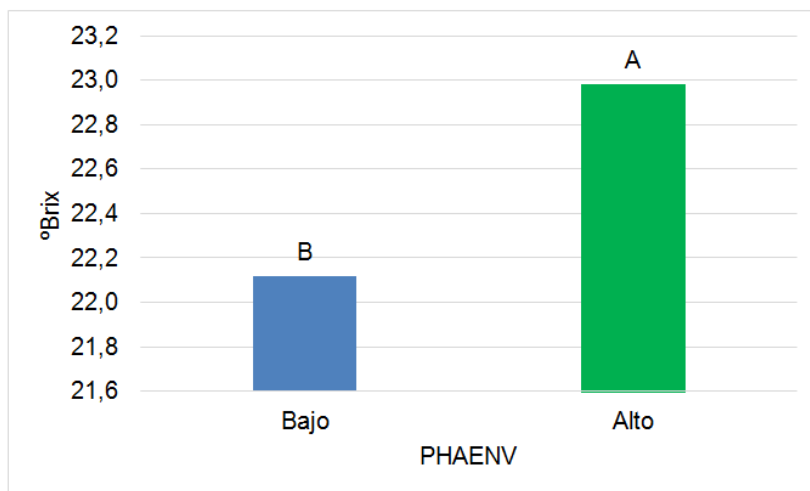


Figura 3. Comparación de las subparcelas con alto y bajo potencial hídrico de base en el envero con °Brix (Test Tukey, $p > 0,05$).

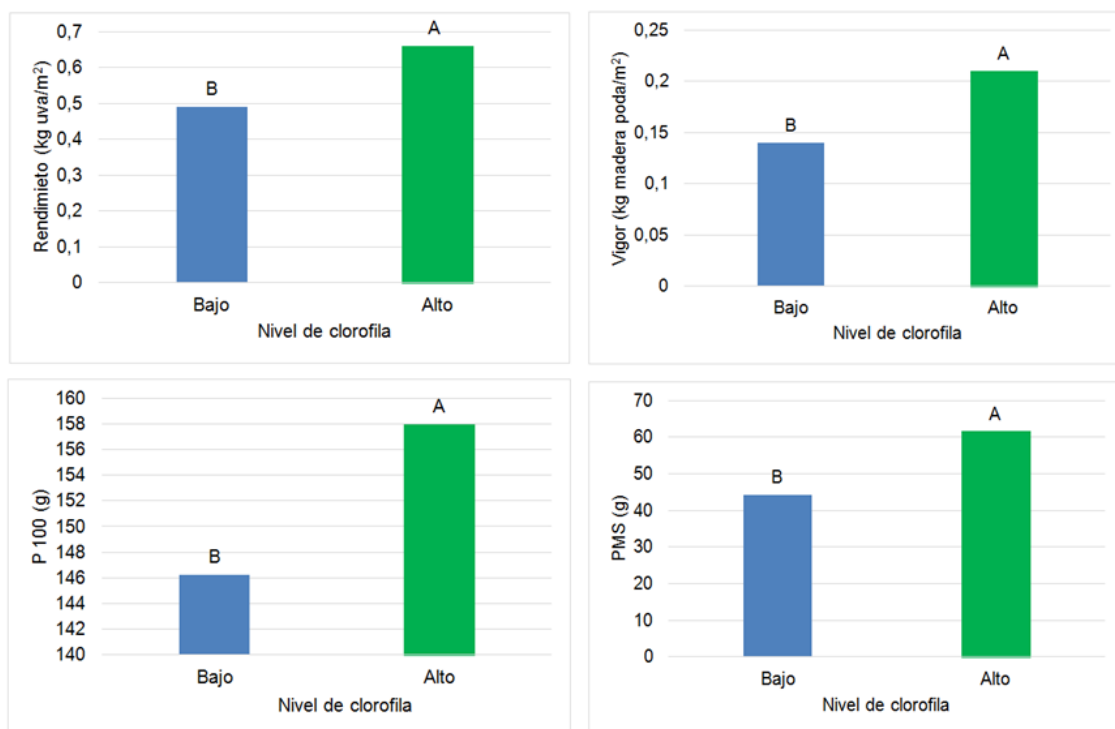


Figura 4 Comparación de las subparcelas con alto y bajo contenido foliar de clorofila con el rendimiento (kg uva/m²), vigor (kg madera poda/m²), P 100 (g) y PMS (g) (Test Tukey, p>0,05).

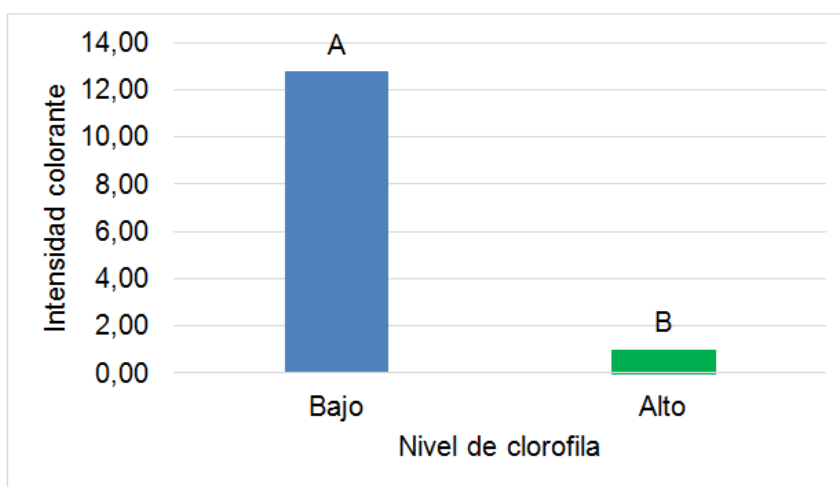


Figura 5. Comparación de la intensidad colorante del vino de subparcelas con alto y bajo contenido foliar de clorofila (Test Tukey, p>0,05).

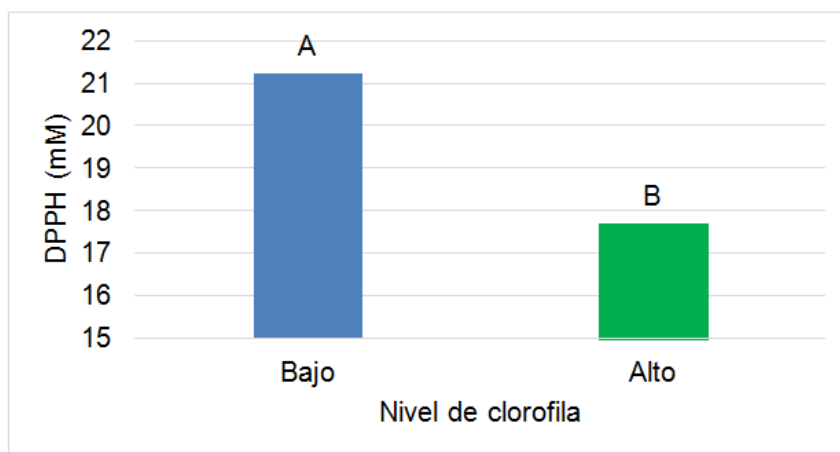


Figura 6. Comparación de la capacidad antioxidante del vino (método DPPH) de subparcelas con alto y bajo contenido foliar de clorofila (Test Tukey, $p > 0,05$).

5.2 Efectos del contenido nutricional peciolar en la composición fenólica y perfil antioxidante del vino.

La mayor parte de las relaciones lineales significativas (Tabla 4) se dan entre los contenidos peciolar de N, K, Cu con el IPT, los parámetros de color y el perfil antioxidante (método DPPH) de los vinos.

Existe una correlación negativa del N, K y Cu con el IPT, la cromaticidad (C^*), la intensidad de color (IC), y el perfil antioxidante medido por el método DPPH, mientras que la relación de la componente de color rojo/verde (a^*) es negativa para el N y Cu y positiva para el K. Se podría deducir que al incrementarse la nutrición de N y K, el rendimiento y el tamaño de la uva aumenta, lo que reduce el contenido de IPT y por lo tanto el perfil antioxidante del vino (Catalina et al. 2012).

Se observa una relación positiva del N, K y Cu con la luminosidad del vino. Esto puede ser, debido a que un aumento de la nutrición de N y K provoca un aumento del rendimiento y tamaño de la uva, por lo que se reduce la concentración de antocianos, afectando de forma negativa sobre la IC, la cromaticidad (C^*) y positivamente sobre la luminosidad del vino.

En la Tabla 4 se observan relaciones significativamente negativas entre el contenido de B en relación con la cromaticidad (C^*), intensidad de color (IC) y la componente del color rojo/verde (a^*). Estos resultados confirman los estudios de Ekbc et al. (2018) que demostraron que un aumento de B, provoca un mayor rendimiento y un aumento en el tamaño de la baya, provocando una disminución en la intensidad de color y en los parámetros de color de cromaticidad (C^*) y componente de color rojo/verde (a^*).

También existen correlaciones negativas entre el contenido de K/Mg con la cromaticidad (C^*), intensidad de color (IC) y el perfil antioxidante medido por el método DPPH, mientras que la relación es positiva para la luminosidad del vino. Estos

resultados están relacionados con los resultados obtenidos para el K, donde se observaron correlaciones negativas con estos parámetros de calidad del vino y positiva para la luminosidad del vino (Tabla 5).

Además se observa como el nivel de Zn en el peciolo tiene una relación negativa con la intensidad colorante (IC) y la capacidad antioxidante (método DPPH) del vino, sin embargo, los estudios realizados por algunos autores sobre tratamientos con Zn, detectaron que un aumento de Zn favorecía la acumulación de sólidos solubles totales, fenoles totales, flavonoides, taninos y antocianinas en las uvas (Catalina, 2015).

En la Tabla 6 se muestran correlaciones negativas del P/Fe con IPT, cromaticidad (C^*) e intensidad colorante (IC), y en caso del $[(10 \times P)+K] \times 50/Fe$ con IPT, cromaticidad (C^*), componente de color rojo/verde (a^*) e intensidad colorante (IC). Se ha demostrado que una deficiencia moderada de Fe, provoca una depresión de la actividad peroxidasa en las uvas, provocando un aumento de la concentración de trans-resveratrol, promoviendo la acumulación de antocianinas y polifenoles (Bavaresco et al., 2010).

Además se observaron relaciones negativas de K/Ca y K/(Ca+Mg) con IPT, cromaticidad (C^*), componente de color rojo/verde (a^*), intensidad colorante (IC) y el perfil antioxidante del vino (método DPPH) y positiva para la luminosidad. Esto puede ser debido a que las relaciones K/Ca, K/(Ca+Mg) provocan un aumento del vigor de la planta, por lo que se puede producir un aumento del rendimiento y el tamaño de la uva, provocando una dilución de la materia colorante, ya que se reduce la cantidad de polifenoles acumulados en las bayas durante la maduración.

Tabla 4. Valores del coeficiente de determinación R^2 , nivel de significación y pendiente de la regresión de los parámetros de la composición fenólica y antioxidante del vino, sobre la relación nutricional peciolar.

Parámetros	N	P	K	Ca	Mg	Fe	Cu
IPT	(-) 0,36 **	(-) 0,20 *	(-) 0,20 *	(+) 0,23	(+) 0,02	(+) 0,01	(-) 0,23 *
L* (Luminosidad)	(+) 0,40 **	(+) 0,17	(+) 0,52 ***	(-) 0,01	(-) 0,07	(+) 0,02	(+) 0,41 **
C* (Cromaticidad)	(-) 0,29 *	(-) 0,17	(-) 0,34 **	(+) 0,04	(+) 0,05	(-) 0,01	(-) 0,20 *
h* (Tonalidad)	(+) 0,10	(+) 0,04	(+) 0,03	(+) 0,10	(-) 0,28	(+) 0,00	(+) 0,07
a* (Componente de color rojo/verde)	(-) 0,28 *	(+) 0,16	(+) 0,32 **	(+) 0,04	(-) 0,05	(+) 0,01	(-) 0,19
b* (Componente de color amarillo/ azul)	(-) 0,02	(+) 0,02	(-) 0,00	(-) 0,01	(+) 0,02	(+) 0,01	(-) 0,00
Intensidad colorante	(-) 0,36 **	(-) 0,14	(-) 0,53 ***	(+) 0,01	(+) 0,09	(-) 0,01	(-) 0,43 **
Tonalidad	(-) 0,01	(+) 0,07	(-) 0,02	(-) 0,10	(+) 0,09	(+) 0,02	(-) 0,01
Antocianos (mg/l)	(+) 0,01	(-) 0,04	(-) 0,03	(+) 0,05	(+) 0,00	(-) 0,01	(-) 0,02
Taninos (g/l)	(-) 0,21 *	(-) 0,04	(-) 0,05	(+) 0,04	(+) 0,00	(+) 0,00	(-) 0,05
Índice de gelatina (%)	(-) 0,37 **	(-) 0,18	(-) 0,14	(+) 0,03	(+) 0,03	(-) 0,03	(-) 0,12
DPPH (mM)	(-) 0,41 **	(-) 0,02	(-) 0,42 **	(-) 0,00	(+) 0,04	(-) 0,01	(-) 0,42 **
FRAP (mM)	(-) 0,19	(-) 0,02	(-) 0,10	(+) 0,12	(-) 0,00	(-) 0,15	(-) 0,20 *
SRSA (%)	(+) 0,00	(+) 0,00	(+) 0,00	(-) 0,08	(+) 0,04	(+) 0,01	(+) 0,03
HRSA (%)	(-) 0,08	(-) 0,32 **	(-) 0,02	(+) 0,22 *	(+) 0,03	(-) 0,17	(-) 0,02

Niveles de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

Tabla 5. Valores del coeficiente de determinación R^2 , nivel de significación y pendiente de la regresión de los parámetros de la composición fenólica y antioxidante del vino, sobre la relación nutricional peciolar.

Parámetros	Zn	Mn	B	N/K	P/K	P/N	K/Mg
IPT	(-) 0,08	(+) 0,08	(-) 0,10	(+) 0,03	(-) 0,13	(-) 0,15	(-) 0,11
L* (Luminosidad)	(+) 0,38 **	(-) 0,25 *	(+) 0,31 *	(-) 0,38 **	(+) 0,01	(+) 0,09	(+) 0,29 *
C* (Cromaticidad)	(-) 0,18	(+) 0,23 *	(-) 0,31 *	(+) 0,29 *	(-) 0,03	(-) 0,11	(-) 0,20 *
h* (Tonalidad)	(+) 0,01	(+) 0,01	(+) 0,09	(+) 0,00	(+) 0,05	(+) 0,04	(+) 0,07
a* (Componente de color rojo/verde)	(-) 0,16	(+) 0,22 *	(-) 0,32 **	(+) 0,28 *	(-) 0,03	(-) 0,11	(-) 0,19
b* (Componente de color amarillo/ azul)	(+) 0,03	(+) 0,01	(-) 0,16	(-) 0,00	(+) 0,01	(+) 0,02	(-) 0,00
Intensidad colorante	(-) 0,44 **	(+) 0,22 *	(-) 0,30 *	(+) 0,46 **	(-) 0,00	(-) 0,07	(-) 0,31 *
Tonalidad	(+) 0,00	(+) 0,01	(-) 0,05	(+) 0,00	(+) 0,05	(+) 0,07	(-) 0,02
Antocianos (mg/l)	(-) 0,03	(-) 0,01	(-) 0,00	(+) 0,17	(-) 0,00	(-) 0,05	(-) 0,01
Taninos (g/l)	(+) 0,01	(-) 0,02	(+) 0,00	(-) 0,01	(-) 0,05	(-) 0,01	(-) 0,00
Índice de gelatina (%)	(-) 0,16	(+) 0,15	(-) 0,23 *	(+) 0,04	(-) 0,08	(-) 0,08	(-) 0,07
DPPH (mM)	(-) 0,28 *	(+) 0,40 **	(-) 0,16	(+) 0,15	(+) 0,01	(-) 0,00	(-) 0,27 *
FRAP (mM)	(-) 0,02	(+) 0,17	(-) 0,02	(+) 0,09	(+) 0,00	(-) 0,00	(-) 0,01
SRSA (%)	(-) 0,00	(-) 0,01	(+) 0,00	(+) 0,00	(+) 0,00	(+) 0,00	(-) 0,01
HRSA (%)	(+) 0,01	(+) 0,02	(-) 0,00	(+) 0,02	(-) 0,25 *	(-) 0,32 *	(-) 0,04

Niveles de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

Tabla 6. Valores del coeficiente de determinación R^2 , nivel de significación y pendiente de la regresión de los parámetros de la composición fenólica y antioxidante del vino, sobre la relación nutricional peculiar.

Parámetros	K/Ca	K/(Ca+Mg)	Ca/Mg	Zn /Fe	Fe/Mn	P/Fe	[(10 x P)+K] x 50/Fe
IPT	(-) 0,36 **	(-) 0,27 *	(+) 0,01	(-) 0,05	(-) 0,04	(-) 0,21 *	(-) 0,31 *
L* (Luminosidad)	(+) 0,46 **	(+) 0,44 **	(+) 0,03	(+) 0,22 *	(+) 0,03	(+) 0,13	(+) 0,32 **
C* (Cromaticidad)	(-) 0,33 **	(-) 0,31 *	(-) 0,01	(-) 0,09	(-) 0,01	(-) 0,15 *	(-) 0,29 *
h* (Tonalidad)	(+) 0,00	(+) 0,04	(+) 0,14	(+) 0,01	(+) 0,00	(+) 0,05	(+) 0,06
a* (Componente de color rojo/verde)	(-) 0,31 *	(-) 0,30 *	(-) 0,01	(-) 0,08	(-) 0,01	(-) 0,15 *	(-) 0,28 *
b* (Componente de color amarillo/ azul)	(+) 0,00	(-) 0,00	(-) 0,00	(+) 0,01	(-) 0,05	(+) 0,01	(+) 0,00
Intensidad colorante	(-) 0,45 **	(-) 0,45 **	(-) 0,05	(-) 0,29 *	(-) 0,04	(-) 0,10 *	(-) 0,30 *
Tonalidad	(+) 0,00	(-) 0,00	(-) 0,08	(-) 0,01	(-) 0,07	(+) 0,05	(+) 0,00
Antocianos (mg/l)	(-) 0,05	(-) 0,03	(+) 0,00	(-) 0,01	(-) 0,00	(-) 0,03	(-) 0,02
Taninos (g/l)	(-) 0,07	(-) 0,06	(+) 0,04	(+) 0,01	(-) 0,01	(-) 0,04	(-) 0,06
Índice de gelatina (%)	(-) 0,16	(-) 0,15	(-) 0,00	(-) 0,05	(-) 0,01	(-) 0,11	(-) 0,13
DPPH (mM)	(-) 0,30 *	(-) 0,32 *	(-) 0,05	(-) 0,19	(-) 0,18	(-) 0,01	(-) 0,12
FRAP (mM)	(-) 0,21 *	(-) 0,12	(+) 0,05	(+) 0,01	(-) 0,14	(-) 0,00	(-) 0,01
SRSA (%)	(+) 0,03	(+) 0,00	(-) 0,08	(-) 0,01	(+) 0,04	(-) 0,00	(-) 0,00
HRSA (%)	(-) 0,12	(-) 0,11	(+) 0,01	(+) 0,13	(-) 0,00	(-) 0,25 *	(-) 0,10

Niveles de significación: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,0001$

5.3 Correlaciones de las variables de composición del vino y perfil antioxidantes, con el rendimiento, vigor, peso medio del sarmiento, peso de cien bayas y °Brix del mosto.

Se realizó un análisis de correlación entre diversos parámetros agronómicos y la composición fenólica y perfil antioxidante del vino.

Tabla 7. Valores del coeficiente de correlación de Pearson de la composición fenólica y antioxidante del vino con el rendimiento, vigor, peso medio de sarmientos (PMS), peso de cien bayas (P 100) y °Brix del mosto.

Parámetros	Rendimiento (Kg uva/m ²)	Vigor (Kg madera poda/m ²)	P 100 (g)	PMS (g)	°Brix
IPT	(-) 0,46 *	(-) 0,43 *	(+) 0,25	(-) 0,34	(+) 0,41
L* (Luminosidad)	(+) 0,85 ***	(+) 0,59 **	(-) 0,09	(+) 0,54 *	(-) 0,57 **
C* (Cromaticidad)	(-) 0,16 ***	(-) 0,49 *	(+) 0,07	(-) 0,48 *	(+) 0,54 *
h* (Tonalidad)	(-) 0,16	(+) 0,17	(+) 0,02	(+) 0,26	(+) 0,07
a* (Componente de color rojo/verde)	(-) 0,69 ***	(-) 0,47 *	(+) 0,08	(-) 0,47 *	(+) 0,54 *
b* (Componente de color amarillo/azul)	(-) 0,08	(+) 0,16	(+) 0,36	(+) 0,04	(+) 0,39
Intensidad colorante	(-) 0,88 ***	(-) 0,59 **	(+) 0,03	(-) 0,53 *	(+) 0,60 **
Tonalidad	(-) 0,05	(+) 0,22	(+) 0,18	(+) 0,01	(+) 0,51 *
Antocianos (mg/l)	(-) 0,52 *	(-) 0,06	(+) 0,21	(+) 0,00	(+) 0,40
Taninos (g/l)	(-) 0,01	(-) 0,42	(-) 0,01	(-) 0,24	(-) 0,07
I. gelatina %	(-) 0,30	(-) 0,26	(+) 0,04	(-) 0,30	(+) 0,31
DPPH (mM)	(-) 0,40	(-) 0,50 *	(-) 0,01	(-) 0,42	(+) 0,39
FRAP (mM)	(-) 0,43	(-) 0,03	(+) 0,18	(-) 0,33	(+) 0,35
SRSA (%)	(+) 0,27	(+) 0,38	(-) 0,46 *	(-) 0,01	(-) 0,18
HRSA (%)	(-) 0,04	(-) 0,11	(-) 0,09	(-) 0,41	(-) 0,12

Niveles de significación: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001

Teniendo en cuenta los resultados de la Tabla 7, se observa que tanto el rendimiento como el vigor tienen una influencia significativa sobre los compuestos fenólicos y las características cromáticas del vino. El rendimiento tiene una relación negativa con los antocianos y el IPT, mientras que el vigor tiene una relación negativa con el IPT. También, se observa una correlación negativa del rendimiento y del vigor del viñedo con la cromaticidad (C*), la intensidad de color (IC) y la componente del color rojo/verde (a*). El peso medio de sarmiento se ha correlacionado negativamente con la intensidad colorante (IC), la cromaticidad (C*), y la componente del color rojo/verde (a*) y positivamente con la luminosidad, correlaciones similares a las encontradas para el vigor.

Estos resultados puede deberse a que un aumento del rendimiento y del vigor provoca un incremento del tamaño de la baya y de los racimos (Arnó et al., 2009; González et al., 2019) y un descenso del contenido en polifenoles totales, relacionado con la disminución de los antocianos (Cuadrillero, 2018). Además, estos datos confirman los resultados obtenidos en la Tabla 4, ya que el IPT presenta una correlación negativa con algunos nutrientes (N, P y K) que afectan al rendimiento y vigor del viñedo.

Se ha encontrado correlaciones negativas entre el vigor y la capacidad antioxidante medida con el método DPPH, y el peso de 100 bayas con la capacidad estabilizadora del radical OH[·] por los antioxidantes del vino (método HRSA). La correlación del vigor con el método DPPH podría deberse a un menor IPT en el vino. Se asume que las viñas más vigorosas producen mayores rendimientos, pero uvas de menor calidad (Arnó et al., 2009) y con menor contenido en compuestos fenólicos.

El contenido en sólidos solubles de la uva (°Brix) se correlacionó positivamente con la cromaticidad (C*), la intensidad de color (IC), la componente del color rojo/verde (a*) y la tonalidad, y negativamente con la luminosidad del vino. Es común observar que una adecuada madurez de la uva incide positivamente en la calidad cromática del vino (Pérez-Magariño et al., 2006).

5.4 Correlaciones de la capacidad antioxidante del vino con su color y composición fenólica.

En la Tabla 8 se observan correlaciones positivas entre la intensidad colorante del vino y su capacidad antioxidante (método DPPH y FRAP) y entre la componente de color rojo/verde (a*) con el método FRAP. También, la luminosidad del vino se ha correlacionado negativamente con su capacidad antioxidante (método DPPH y FRAP). Sin embargo, no se han observado correlaciones significativas de la capacidad antioxidante del vino con su contenido de antocianos ($r=-0,15$) ni en taninos ($r=+0,32$). Se ha descrito que el perfil antioxidante de un vino depende más del tipo y nivel individual de cada compuesto fenólico presente en el vino que del contenido global en antocianos y taninos (Rivero-Pérez et al., 2007).

Tabla 8. Valores del coeficiente de correlación de Pearson del color y la composición fenólica con el perfil antioxidantes del vino.

Parámetros	DPPH (mM)	FRAP (mM)	SRSA (%)	HRSA (%)
IPT	(+) 0,41	(+) 0,39	(-) 0,44	(+) 0,24
L* (Luminosidad)	(-) 0,62 **	(-) 0,54 *	(+) 0,26	(-) 0,24
C* (Cromaticidad)	(+) 0,37	(+) 0,55 *	(-) 0,18	(+) 0,44
h* (Tonalidad)	(+) 0,04	(+) 0,22	(-) 0,27	(+) 0,20
a* (Componente de color rojo/verde)	(+) 0,35	(+) 0,55 *	(-) 0,18	(+) 0,44
b* (Componente de color amarillo/azul)	(-) 0,14	(+) 0,08	(+) 0,02	(-) 0,11
Intensidad colorante	(+) 0,61 **	(+) 0,53 *	(-) 0,21	(+) 0,15
Tonalidad	(+) 0,07	(+) 0,03	(+) 0,25	(-) 0,31
Antocianos (mg/l)	(-) 0,15	(+) 0,32	(-) 0,43	(+) 0,34
Taninos (g/l)	(+) 0,33	(+) 0,29	(-) 0,15	(+) 0,03
Índice de gelatina (%)	(+) 0,44	(+) 0,36	(-) 0,14	(+) 0,40

Niveles de significación: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001

6. Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Una clorosis férrica moderada del viñedo mejoró la intensidad de color y la capacidad antioxidante del vino.

- El nivel nutricional del viñedo afectó significativamente a la calidad fenólica, color y capacidad antioxidante del vino. Se observaron relaciones negativas del contenido peciolar en N, K, Cu y Zn con la composición fenólica, el color y la capacidad antioxidante del vino, y del B con la composición fenólica y el color del vino.

- Los vinos elaborados con los viñedos de mayor rendimiento y vigor presentaron un menor contenido en polifenoles y una menor calidad cromática. Además, una adecuada madurez de la uva mejoró el color del vino.

- Los vinos con mayor intensidad de color y menor luminosidad presentaron una mayor capacidad antioxidante.

7. Referencias bibliográficas

- Arnó, J., Martínez-Casasnovas, J. A., Ribes-Dasi, M., & Rosell, J. R. (2009). Revisión. Viticultura de precisión. Líneas de investigación, retos y oportunidades del manejo sitio-específico en viña. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 7(4), 779–790. <https://doi.org/10.5424/sjar/2009074-1092>
- Bate-Smith. (1981). Astringent tannins of the leaves of Germaine species. *Phytochem*, 20, 211–216.

- Bavaresco, L., van Zeller, M.I., Civardi, S., Gatti, M. & Ferrari, F. (2010). Effects of traditional and new methods on overcoming lime-induced chlorosis of grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 186-190.
- Benzie, I.F.F y Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- Brans-Williams, W., Cuvelier, M.E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)
- Catalina, A., Matei, P. M., González, R., González, M. R., & Martín, P. (2012). Correlaciones entre parámetros de composición de la uva y niveles peciolares de nutrientes. *Vida Rural*, 342, 30–34. https://www.miteco.gob.es/app/publicaciones/art_datos.asp?articuloid=4087&codrevista=Vrural.
- Catalina, Á. (2015). Utilización de medida de fluorescencia de la clorofila para monitoriar el estado nutricional y estimar el potencial enológico en viñedos afectados por clorosis férrica. *Tesis doctoral. Universidad de Valladolid*.
- Cuadrillero, M. (2018). Estimación del potencial de calidad de la uva a partir de parámetros del equilibrio vegetativo del viñedo en la Ribera del Duero. *Trabajo de fin de grado. Universidad de Valladolid*.
- Ekbic, H. B., Gokdemir, N., & Erdem, H. (2018). Effects of boron on yield, quality and leaf nutrients of isabella (*Vitis labrusca* L.) grape cultivar. *Acta Scientiarum Polonorum, Hortorum Cultus*, 17(1), 149–157. <https://doi.org/10.24326/asphc.2018.1.14>
- Giovinazzo, G., Carluccio, M. A., & Grieco, F. (2019). Wine polyphenols and health. 1135–1155. https://doi.org/10.1007/978-3-319-78030-6_81
- González, M. R., Hailemichael, G., Catalina, Á., & Martín, P. (2019). Combined effects of water status and iron deficiency chlorosis on grape composition. *Scientia Agricola*, 76(6), 473–480. <https://doi.org/10.1590/1678-992x-2018-0084>
- Granato, D., Shahidi, F., Wrolstad, R., Kilmartin, P., Melton, L. D., Hidalgo, F. J., Miyashita, K., Camp, J. van, Alasalvar, C., Ismail, A. B., Elmore, S., Birch, G. G., Charalampopoulos, D., Astley, S. B., Pegg, R., Zhou, P., & Finglas, P. (2018). Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban in vitro screening methods? *Food Chemistry*, 264, 471–475. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.012>
- Karimi, R., Koulivand, M., & Ollat, N. (2019). Soluble sugars, phenolic acids and antioxidant capacity of grape berries as affected by iron and nitrogen. *Acta Physiologiae Plantarum*, 41(7), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s11738-019-2910-1>
- Keller, M., Kummer, M., & Vasconcelos, M. C. (2001). Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 12-18. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2001.tb00188.x>
- Li, J., Lin, J., Xiao, W., Gong, Y., Wang, M., Zhou, P. & Liu, Z. (2013). Solvent extraction of antioxidants from steam exploded sugarcane bagasse and enzymatic convertibility of the solid fraction. *Bioresource Technology*, 130, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.11.143>
- Muselík, J., García-Alonso, M., Martín-López, M. P., Žemlička, M., & Rivas-Gonzalo, J. C. (2007). Measurement of antioxidant activity of wine catechins, procyanidins, anthocyanins and pyranoanthocyanins. *International Journal of Molecular Sciences*, 8(8), 797–809. <https://doi.org/10.3390/i8080797>
- Neveu, V., Perez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D., & Scalbert, A. (2010). Phenol-Explorer: an

- online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *The Journal of Biological Databases and Curation*, 1–9. <https://doi.org/10.1093/database/bap024>
- Nimse, S. B., & Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, 5(35), 27986–28006. <https://doi.org/10.1039/c4ra13315c>
- OIV. (2006). Determinación de las características cromáticas según CIELab. <https://www.oiv.int/es/normas-y-documentos-tecnicos/metodos-de-analisis/compendio-de-los-metodos-internacionales-de-analisis-de-los-vinos-y-de-los-mostos-2-vol#oiv-ma-as2-11>
- Ojeda, H., Andara, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., & Deloire, A. (2002). Influence of pre- and postveraison water deficit on synthesis and concentration of skin phenolic compounds during berry growth of *vitis vinifera* cv. Syrah. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 261–267. <https://www.ajevonline.org/content/53/4/261.1>
- Oliveira, C., Ferreira, A., De Freitas, V., & Silva, A. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115–1126. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.050>
- Paixão, N., Perestrelo, R., Marques, J. C., & Câmara, J. S. (2007). Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. *Food Chemistry*, 105(1), 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.017>
- Pérez-Magariño, S., & González, M. L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96(2), 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.02.021>
- Ribéreau-Gayon, P., & Stonestreet, E. (1965). Determination of anthocyanins in red wine. *Bulletin de la société chimique de France*, 9, 2649–2652.
- Ribéreau-Gayon, P., & Glories, Y. (1987). Phenolics in grapes and wine. *Proceedings of the sixth Australian wine industry technical conference, Terry Lee, Adelaide, South Australia, 14–17 July, Pp. 247-256.*
- Rivero-Pérez, M. D., Muñoz, P., & González, M. L. (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5476–5483. <https://doi.org/10.1021/jf070306q>
- Robak, J., & Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, 37, 837–841. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90169-4)
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliar, V., Genovese, M. I., de Souza Schmidt Gonçalves, A. E., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127(1), 174–179. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.137>
- Smirnoff, N., & Cumbres, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28, 1057–1060. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7)
- Tremel, J., & Šmejkal, K. (2016). Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. *comprehensive. Food Science and Food Safety*, 15(4), 720–738. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12204>
- Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto. Aspectos científicos y prácticos*. Ed. Mundi-Prensa. Madrid.
- Zhu, X. F., Wang, B., Song, W. F., Zheng, S. J., & Shen, R. F. (2016). Putrescine alleviates iron deficiency via no-dependent reutilization of root cell-wall Fe in arabidopsis. *Plant Physiology*, 170(1), 558–567.

<https://doi.org/10.1104/pp.15.01617>

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., & Nury, F. S. (1990). *Production Wine Analysis*. Van Nostrand-Reinhold, New York.