



Universidad de Valladolid
Campus de Palencia

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR
DE INGENIERÍAS AGRARIAS**

Grado en Enología

Impacto del estado hídrico y nutricional del
viñedo cv. Tempranillo en el contenido
polifenólico y la capacidad antioxidante de
los vinos

Alumno: Giuliano Gallo Viscay

Tutor: Pedro Martín Peña

Cotutor: José Manuel Rodríguez Nogales

M^a Rosa González García

Febrero de 2023

Copia para el tutor/a

Índice:

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. OBJETIVOS	7
4. MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1 ZONA DE ESTUDIO	7
4.2 CONTROLES Y OBSERVACIONES	8
4.2.1 PARÁMETROS DE VIGOR Y RENDIMIENTO	8
4.2.2 ANÁLISIS PECIOLAR DE NUTRIENTES	9
4.2.3 POTENCIAL HÍDRICO FOLIAR.	9
4.2.4 CONTENIDO EN CLOROFILA.	10
4.3 MICROVINIFICACIONES	10
4.4 ANALÍTICAS DE LOS VINOS	11
4.4.1 ÍNDICE DE POLIFENOLES TOTALES (IPT)	11
4.4.2 TANINOS TOTALES	11
4.4.3 ANTOCIANOS TOTALES	12
4.4.4 ÍNDICE DE GELATINA	12
4.4.5 PERFIL ANTIOXIDANTE DE LOS VINOS	12
4.4.5.1. MÉTODO DE REDUCCIÓN DEL RADICAL DPPH	12
4.4.5.2. CAPACIDAD REDUCTORA POR EL MÉTODO FRAP	13
4.4.5.3. ACTIVIDAD ESTABILIZADORA DEL RADICAL HIDROXILO (MÉTODO HRSA)	13
4.4.5.4. ACTIVIDAD ESTABILIZADORA DEL RADICAL SUPERÓXIDO (MÉTODO SRSA)	14
4.4.6 ANÁLISIS DE DATOS	14
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
6. CONCLUSIONES	21
7. BIBLIOGRAFÍA	22

1. Resumen

El potencial antioxidante es uno de los grandes atributos que tiene el vino, que puede ser aprovechado por los consumidores obteniendo beneficios con un consumo moderado, siendo los compuestos fenólicos los principales causantes de esta capacidad antioxidante. La incidencia de la clorosis férrica y el estado hídrico del viñedo, así como la disponibilidad de nutrientes minerales, influyen notablemente en la composición de la uva. En este sentido, los objetivos de este estudio fueron dos: (1) evaluar la influencia del estado hídrico y nutricional del viñedo cv. Tempranillo sobre la composición polifenólica y la capacidad antioxidante de los vinos, y (2) estudiar las relaciones entre el perfil antioxidante del vino con su composición fenólica.

Para alcanzar estos objetivos se ha realizado un seguimiento del estado hídrico y nutricional durante el 2018 de 18 subparcelas de viñedo cv. Tempranillo en la D.O. Ribera del Duero, con unas condiciones de suelo heterogéneas, siendo más o menos afectadas por la clorosis férrica y/o por el déficit hídrico. Se controló el contenido foliar de clorofila, el vigor, el rendimiento y el estado hídrico del viñedo. El diagnóstico nutricional de las parcelas se determinó mediante la composición mineral peciolar. Con la vendimia de cada subzona se realizaron microvinificaciones, determinándose en el vino su composición fenólica, capacidad antioxidante (método DPPH y FRAP) y actividad estabilizadora frente a los radicales hidroxilo y superóxido.

Los resultados de este estudio mostraron que una ligera incidencia de la clorosis férrica se traduce en una mejor capacidad antioxidante del vino sobre el radical DPPH y en la calidad de sus taninos, mientras que la capacidad reductora FRAP, taninos e IPT mejoraron con una menor disponibilidad hídrica en el viñedo. Además, una reducción del rendimiento y del vigor del viñedo mejoró el perfil antioxidante y el IPT del vino. El estado nutricional del viñedo también afectó a la composición polifenólica y al perfil antioxidante del vino, observándose, en general, que los vinos procedentes de viñedos con un menor contenido mineral peciolar en fósforo, potasio, magnesio y hierro presentan mayor IPT y mejor perfil antioxidante.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 COMPUESTOS FENÓLICOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL VINO

Los polifenoles son metabolitos secundarios de las plantas con estructuras químicas muy diversas caracterizadas por presentar más de un grupo fenol. Más de 500 polifenoles se han descrito en alimentos y bebidas comunes (Neveu, et al., 2010). El vino pertenece al grupo de alimentos con alto contenido en polifenoles, como el chocolate negro, que con una media de 4.000 mg/kg es uno de los alimentos con mayor contenido polifenólico (Gutiérrez, 2002), mientras que el vino tinto posee una concentración de entre 1.800-1.060 mg/L (Sancho y Mach, 2015).

Los polifenoles del vino se forman a partir de la acumulación de azúcares en el mosto de la uva que actúan como sustrato. La biosíntesis se realiza por dos vías, principalmente, la vía de las pentosas-fosfato y la vía de las hexosas. La concentración de polifenoles es mayor en el vino tinto que en el blanco (Pasten y Grenett, 2006).

La presencia de polifenoles en la uva y su cantidad están determinadas por muchos factores que pueden ser ambientales, tales como el clima o las condiciones del suelo, o estar relacionados con la variedad y madurez del fruto (Garrido y Borges, 2013). La disponibilidad de agua afecta a la calidad de la uva por su influencia sobre los procesos biológicos de la planta, tales como el cierre/apertura estomática, la fotosíntesis, la acumulación de fotoasimilados, el crecimiento vegetativo y el desarrollo radicular, la senescencia de tejidos, etc. (Downey et al., 2006). La exposición a la luz solar y a la temperatura de hojas y racimos constituyen factores relevantes sobre la composición fenólica de las bayas (Haselgrove et al., 2000; Spayd et al., 2002; Downey et al., 2004). Las prácticas culturales que favorecen la exposición a la luz de los racimos incrementar la acumulación de polifenoles (Cortell y Kennedy, 2006), al promover la expresión de genes implicados en las rutas metabólicas de estos compuestos (Downey et al., 2004; Jeong et al., 2004).

Entre las técnicas culturales que pueden modificar la composición de los compuestos fenólicos en las uvas se encuentran, el sistema de conducción (Haselgrove et al., 2000), el tipo de poda (González-Neves et al., 2002), el aclareo de racimos (Guidoni et al., 2008; Valdés et al., 2009), las labores de poda en verde (desbrote, despunte, deshoje), la fertilización mineral (Delgado et al., 2004) y el manejo del riego (Esteban et al., 2001; Ojeda et al., 2002). La edad del viñedo (Reynolds et al., 2007) y la presencia de enfermedades criptogámicas (Amati et al., 1996) en la uva también son factores importantes en la composición de estos compuestos.

Según su estructura los compuestos fenólicos se pueden agrupar en dos grandes grupos: fenoles flavonoides y fenoles no flavonoides, que a su vez se subdividen, como se puede apreciar en la Figura 1 (Rebolo, 2007).

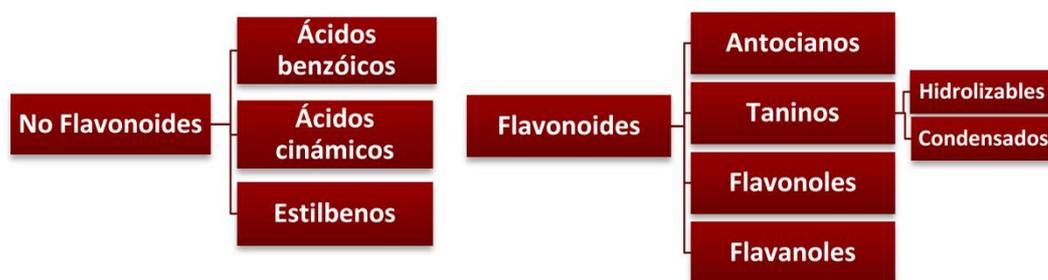


Figura 1: Clasificación de los polifenoles (Rebolo, 2007)

La denominación de compuesto no flavonoide se aplica a todos los compuestos orgánicos que poseen como mínimo una función carboxílica y un hidroxilo fenólico (Bruneton, 1993). Estos compuestos existen de forma predominante como ácidos hidroxibenzóicos, que contienen una estructura de 7 átomos de carbono, y hidroxicinámicos, que contienen 9 átomos de carbono. Ambos están presentes tanto en la uva como en el vino. Como representantes más importantes de los ácidos hidroxibenzóicos se pueden citar los ácidos protocatéquico, vanílico y gálico. Al grupo de ácidos hidroxicinámicos pertenecen los ácidos paracumárico, caféico y felúrico (Neveu et al., 2010). Por otro lado, la característica común de los flavonoides es la estructura básica de flavanos de 15 carbonos ($C_6-C_3-C_6$; figura 2). Estos átomos de carbono están dispuestos en 3 anillos (A, B y C).

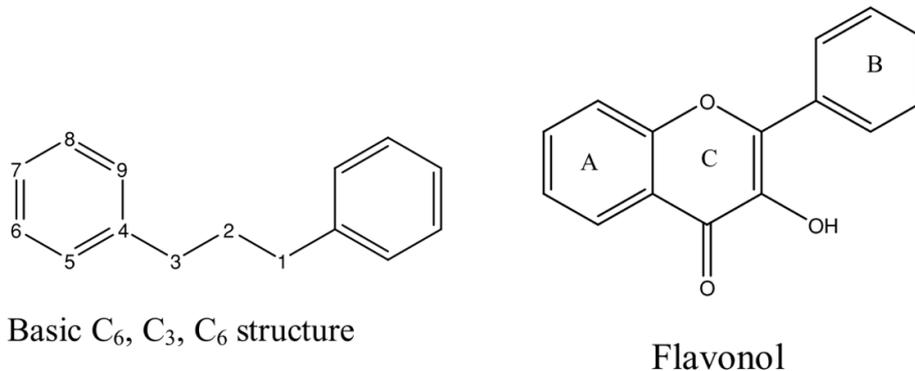


Figura 2: Estructura básica flavonoide y flavonol (Brewer, 2011).

Los compuestos polifenólicos han demostrado tener múltiples aplicaciones terapéuticas, principalmente, relacionadas con su poder antioxidante y son parcialmente responsables del efecto beneficioso derivado del consumo moderado y regular de vino (Rodrigo et al., 2011). También pueden regular funciones metabólicas, absorber radiaciones y además poseen propiedades antimicrobianas o antifúngicas. Debido a esta función de defensa, su localización dentro del vegetal se encuentra principalmente en la piel de los vegetales (Palazón et al., 2012).

Los compuestos fenólicos protegen a las células del estrés oxidativo, que conduce progresivamente a una disfunción celular. El estrés oxidativo en una célula se lleva a cabo por un desequilibrio entre los radicales libres y los sistemas antioxidantes del organismo. Estos radicales libres provocan deterioro oxidativo en ácidos grasos y ADN que, indirectamente, producen daño celular. De manera endógena el organismo posee mecanismos de defensa frente a estas oxidaciones, en forma de enzimas como la superoxidodismutasa, o de moléculas neutralizadoras como las vitaminas C y E (Tomás-Barberán, 2003).

En el caso de los compuestos fenólicos, el mecanismo de la actividad antioxidante parece ser doble, por un lado, actúan como captadores de radicales libres y, por otro lado, como quelantes. La capacidad de inactivar radicales libres se debe a la capacidad de estos compuestos para donar átomos de hidrogeno o electrones, mientras que la capacidad quelante de iones metálicos, como el Fe^{2+} , impide la reacción de Fenton caracterizada por la generación de radicales libres en presencia de H_2O_2 y Fe^{2+} (Di Majo et al., 2008). Los compuestos no flavonoides generalmente actúan como antioxidantes atrapando radicales libres, mientras que los flavonoides pueden eliminar los radicales libres y quelar metales también (Engeseth y Geldof, 2002).

Cada compuesto fenólico contribuye de forma diferente a la capacidad antioxidante del vino. De este modo, el potencial antioxidante de estos compuestos viene determinado por su propia estructura básica, así como por el grado de hidroxilación, sustituciones, conjugaciones y grado de polimerización. Se ha descrito que los grupos hidroxilos tienen capacidad antioxidante y quelante, mientras que la presencia de un doble enlace y una función carbonilo en el heterociclo incrementa su capacidad antioxidante. El grado de polimerización también afecta a la capacidad antioxidante del compuesto, siendo mayor en compuestos poliméricos que en monómeros, comportamiento motivado por un elevado número de grupos hidroxilos en sus estructuras (Heim et al., 2002; Calabrò et al., 2004). Se ha descrito que la colocación de los anillos A y B de los flavonoides influyen en su estabilidad y en sus propiedades antioxidantes (Wojdylo et al., 2007). Además, los flavonoides con múltiples grupos hidroxilo son más efectivos antioxidantes que aquellos con solo uno (Geldof y Engeseth, 2002). Sin embargo, en una mezcla como el vino, la capacidad antioxidante no está dada simplemente por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes, también está determinada por la interacción entre ellos y el estado en el que se encuentren (Rebolo, 2007).

2.2 IMPORTANCIA DEL ESTADO HÍDRICO Y NUTRICIONAL DEL VIÑEDO EN LA CALIDAD DEL VINO

En la vid, el agua es un elemento fundamental para su crecimiento vegetativo y reproductivo y su funcionamiento fisiológico y bioquímico. Por consiguiente, es un factor determinante en el rendimiento y en la calidad de las uvas y en las características antioxidantes de los vinos (Carbonneau, 1998, Deloire et al., 2003a,b, Ojeda et al., 2005).

Los niveles de estrés más o menos severos pueden afectar al estado del viñedo, tanto a nivel de microclima del canopy y crecimiento vegetativo como a nivel de producción, desarrollo de la baya, a su metabolismo y composición de los frutos (Acevedo-Opazo et al., 2010) de acuerdo con el tiempo de actuación e intensidad del estrés. Esta restricción afecta a la calidad de la fruta, debido principalmente a que se producen bayas más pequeñas, aumentando la relación piel/pulpa, además de tener un efecto positivo sobre la síntesis de polifenoles (Kennedy et al., 2002). Sin embargo, si se sobrepasa un cierto nivel de restricción hídrica, la uva deja de ganar en componentes denominados “de calidad” mientras que los rendimientos siguen disminuyendo y puede ocasionar problemas de supervivencia para determinadas variedades si la situación persiste durante años sucesivos (Ojeda et al., 2005).

Con déficit hídrico, la uva acumula proantocianidinas, las cuales son compuestos fenólicos que presentan importantes propiedades para los vinos, participando en las sensaciones de astringencia y amargor y actuando como copigmentos para la estabilización del color del vino. Kennedy et al. (2002) reportaron cambios en la composición de proantocianidinas y la unión entre antocianos y taninos, en cambio Downey et al. (2006) observaron que el déficit hídrico tiene un efecto débil sobre el contenido de estos compuestos.

Los nutrientes son absorbidos por la planta en forma de iones disueltos en la solución del suelo, lo que depende también del flujo de agua a través de la vía suelo-raíz-tallo (Keller, 2005). Existen muchos estudios (Conradie y Saayman, 1989b; Jackson y Lombard, 1993; Hilbert et al., 2003; Keller, 2005; Topalović et al., 2011), donde se han investigado la influencia del tipo de suelo, el clima o el cultivar sobre la calidad de la uva. Sin embargo, son menos abundantes en la literatura estudios sobre correlaciones entre los niveles de nutrición mineral de las plantas y parámetros de composición de las uvas como el contenido de polifenoles. Autores como Van Leeuwen (2010) consideran que el estado hídrico en el cual se encuentre la planta (directamente vinculado a la capacidad de retención y suministro hídrico del medio edáfico), ejercen una mayor influencia en la calidad y estilo del vino resultante que la composición mineral del medio de cultivo.

Con respecto al nitrógeno un exceso de este nutriente se manifiesta mediante un excesivo vigor de la planta, un reducido cuajado y una menor fertilidad de las yemas (Robinson, 1995), un retraso de la maduración (Spayd et al., 1993; Hilbert et al., 2003), una disminución de los compuestos polifenólicos y aromáticos, así como una disminución de la síntesis de azúcares (Keller et al., 2001), en cambio una deficiencia de N junto con la escasez de agua provoca un crecimiento reducido de las plantas y una estimulación de la biosíntesis de polifenoles de la uva y mayor acumulación de azúcares (Hilbert et al., 2003; Castellarin et al., 2007).

El fósforo es un constituyente de la membrana celular, ácidos nucleicos, vitaminas, lecitinas, proteínas y ATP. Incrementa el crecimiento del ápice de los brotes y la raíz y de las hojas, y la concentración de aromas de la uva (Bavaresco et al., 2010b). Por otro lado, un nivel insuficiente de potasio se asocia con una reducción importante en los niveles de azúcares y de la materia colorante de las bayas (polifenoles), además de una acidez excesiva en los mostos. Sin embargo, un exceso de este elemento en las hojas a menudo va ligado a una acidez insuficiente en los mostos (Delas, 2000).

La clorosis férrica es uno de los principales estreses abióticos en la zona mediterránea y otras regiones semiáridas. Se conoce por clorosis férrica un variado conjunto de síntomas relacionados con una nutrición deficiente de hierro, que afecta generalmente a plantas sensibles cultivadas en suelos calcáreos (Rombolà y Tagliavini, 2006). Estos suelos suponen el 39% de la superficie total de suelos en el mundo con un total de 1.000 millones de hectáreas (Çelik y Katkat, 2010). Los síntomas ocasionados por la deficiencia de Fe interfieren en el proceso de síntesis de clorofila y afecta al buen funcionamiento del cloroplasto (Álvarez-Fernández, 2000). La falta de actividad fotosintética se ve reflejada en el equilibrio vegetativo de las plantas, el microclima del racimo, en la calidad de los mostos, y por tanto en la de los vinos. El efecto principal de esta carencia es un descenso en la acumulación de azúcares y antocianos en la baya durante el proceso de maduración (Veilksar et al., 2005), repercutiendo luego en el contenido fenólico total del vino.

Todos los componentes minerales, ya sean macro o micronutrientes, pueden influir de una manera u otra en la composición de la uva y en el rendimiento de la vid (Pearson y Goheen, 1998). Un inadecuado y/o desequilibrado aporte de fertilizantes propicia, en general, un detrimento de la calidad de la uva (García-Escudero et al., 2002a).

3. OBJETIVOS

Los objetivos de este estudio son:

- Evaluar la influencia del estado hídrico y nutricional del viñedo cv. Tempranillo sobre la composición polifenólica y la capacidad antioxidante de los vinos.
- Estudiar las relaciones entre el perfil antioxidante y la composición fenólica del vino.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo los objetivos marcados en este Trabajo de Fin de Grado, se ha realizado un proceso de seguimiento de diversos parámetros fisiológicos y agronómicos para evaluar el estado hídrico y nutricional de un conjunto de 18 subzonas de viñedo de la D.O. Ribera del Duero a lo largo del año 2018, así como la evaluación de la composición fenólica y el perfil antioxidante del vino elaborado con la uva de cada subzona.

4.1 ZONA DE ESTUDIO

El viñedo se sitúa en la zona oeste de la Denominación de Origen Ribera del Duero, a una altitud media de 800 m s. n. m. La totalidad de las subparcelas pertenecen a la Bodega Emilio Moro S.L., en el término municipal de Pesquera de Duero (Valladolid).

Las subparcelas presentan unas dimensiones de 100 m² de superficie, los suelos son poco profundos y pobres en materia orgánica con unos valores inferiores al 1,5%. El pH del suelo es elevado, superior a 8, la textura del suelo es franco-arcillosa, el porcentaje de carbonatos está alrededor del 26% y la caliza activa varía mucho entre subzonas, aunque por norma general se sitúa sobre el 9%. El viñedo de estudio es de la variedad Tempranillo injertado sobre patrón 110-Richter (R110), conducido en espaldera y podado a doble Cordón Royat. Para la selección de las subparcelas (Tabla 1) se siguieron una serie de pautas:

- Las subparcelas estudiadas son representativas del cultivo en la zona, corresponden al “viñedo tipo” de la zona en cuanto al sistema de conducción y material vegetal.
- Se buscó la máxima variabilidad en las características del suelo, con la realización, previa a la selección, de analíticas sobre la composición del suelo para obtener datos más significativos.

Tabla 1: Ubicación por coordenadas de las parcelas estudiadas.

Paraje	Subparcela	Latitud	Longitud
CAMINO	VH11-1	41.6565440	-4.1631387
CAMINO	VH11-5	41.6565695	-4.1634587
CHOZO	VH14-1	41.6561122	-4.1648545
CHOZO	VH14-5	41.6556935	-4.1646035
CHOZO	VC19-5	41.6560313	-4.1663320
CHOZO	VC19-6	41.6558372	-4.1654518
CHOZO	VH36	41.6552361	-4.1658278
HONTANILLA	VH10-1	41.6533993	-4.1750898
HONTANILLA	VH10-5	41.6535117	-4.1752565
HONTANILLA	VH31	41.6534858	-4.1755532
HONTANILLA	VH15-1	41.6530058	-4.1761190
HONTANILLA	VC32	41.6529948	-4.1766270
CORNALVO	VC21-1	41.6577073	-4.1777572
CORNALVO	VC22-1	41.6577392	-4.1774133
CORNALVO	VC22-5	41.6577778	-4.1766666
CORNALVO	VC18-1	41.6577772	-4.1762960
CORNALVO	VC18-5	41.6579713	-4.1764295
CORNALVO	VC35	41.6582721	-4.1755680

4.2 Controles y observaciones

4.2.1 Parámetros de vigor y rendimiento

El rendimiento en kg/m² y el peso de 100 bayas se obtuvieron una vez realizada la vendimia. Se pesaron, en báscula de campo, todos los racimos recogidos en cada subparcela. De esta manera podemos saber el peso medio del racimo, el rendimiento medio de la parcela y el rendimiento medio por cepa. También se realizó un muestreo de 100 bayas que posteriormente fueron pesadas.

El vigor fue estimado por el peso de la madera de poda expresado en kg/m²: se escogieron 5 cepas en cada uno de los líneas de las subzonas a muestrear. En ellos se contaron también los sarmientos. Después de haber realizado la poda se pesó todo el material con una báscula de campo.

La fecha de vendimia (2 octubre 2018) fue escogida realizando un seguimiento de la maduración de las bayas en el campo, cuando el contenido en sólidos solubles del mosto alcanzó un mínimo de 22,8 °Brix en campo.

4.2.2 Análisis peciolar de nutrientes

Siguiendo las recomendaciones de la O.I.V. (O.I.V., 1996), se realizó el muestro foliar de las subzonas, para conocer el contenido mineral en peciolo. Para ello, se recogieron en enero 60 peciolo por subparcela, de las hojas opuestas al primer racimo de uno de los pámpanos, situados en la zona media de cada brazo de las cepas. Las analíticas de los elementos minerales fueron llevadas a cabo por el Centro Tecnológico ITAGRA.CT. El contenido del N se determinó tras realizar la acenización de las muestras en un horno a 450°C, extrayendo los minerales por el método Kjeldahl modificado, el P y B por medio de espectrofotometría, el K por emisión atómica y el resto de los minerales (Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn) por absorción atómica.

4.2.3 Potencial hídrico foliar.

La medida de potencial hídrico se realizó antes del amanecer y al mediodía, con una cámara tipo Scholander. De cada subparcela se eligieron 9 hojas bien expuestas al sol y extendidas, estas hojas se encontraban por encima del racimo. El proceso para medir el estado hídrico antes del amanecer consiste en aplicar presión, sobre una hoja escindida, hasta que se empiezan a ver unas pequeñas gotas de savia sobre el peciolo. En ese momento se deja de aplicar presión y se registra el valor que marca el manómetro de la cámara. Los valores de potencial se expresan en MPa y siempre son negativos.

Tan rápido como sea posible después del embolsado de la hoja, el peciolo embolsada se corta con una cuchilla afilada lo más cerca posible del brote. Luego, el peciolo se coloca rápidamente a través de la tapa de la cámara y se asegura firmemente, con el borde cortado del peciolo hacia afuera y la lámina de la hoja en bolsas dentro de la cámara (Williams y Araujo, 2002; Bogart, 2006). La cámara se sella y luego se presuriza lentamente con gas nitrógeno. Cuando la presión positiva ejercida sobre la hoja en la cámara es igual a la presión negativa dentro de la hoja, el líquido en la lámina de la hoja comenzará a salir del borde del peciolo cortado. Durante la presurización, el operador observa cuidadosamente el borde expuesto del peciolo para detectar la aparición de una gota de agua (savia). Tan pronto como aparece la caída, el usuario lee la presión correspondiente del medidor de la cámara. Este valor de presión es el potencial de agua de la hoja, con valores negativos y expresado en MPa (Williams y Araujo, 2002; Bogart, 2006).

4.2.4 Contenido en clorofila.

Esta medida se toma en el momento de cuajado, para ello ha sido necesario llevar al campo el medidor CL-01 (Hansatech Instruments Ltd., Norfolk, UK). El medidor usa un fotodiodo de silicón para detectar la transmitancia de las hojas desde dos luces emitida por los diodos: una con un pico de emitancia de 650 nm, y la otra de 940 nm.

Se calculó la media de 20 medidas por subparcela, sobre el lóbulo central de cada hoja, adultas, sanas y del tercio superior del pámpano. Las lecturas del CL-01 se correlacionan con la concentración de clorofila (clorofila a+b por unidad de superficie foliar), tal y como se ha podido comprobar para la variedad Tempranillo (González et al., 2005a) con la recta de regresión siguiente:

$$y = (6,0817 \cdot x) + 7,6084$$

Donde:

x = absorbancia medida

y = concentración de clorofila foliar ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

4.3 MICROVINIFICACIONES

Se realizó una vendimia manual en cajas de 20 kg de cada subparcela y la uva se transportó a la ETSSIAA (Palencia) para su vinificación. Todas las cajas de vendimias se marcaron para diferenciar cada zona y microvinificar por separado y duplicado, por lo que si tenemos 18 subzonas obtendremos 36 elaboraciones. La vendimia fue despalillada y estrujada con una despalilladora estrujadora de rodillos cilíndricos con perfiles conjugados horizontales. Una vez encubado en depósitos de acero inoxidable de 20 L, se procedió al sulfitado de la pasta a 6 g/HL SO_2 total con metabisulfito potásico, con un posterior bazuqueo de homogenización.

Se inocularon levaduras secas activas comerciales de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Zymaflore RX60, Laffort), previamente rehidratadas, a una dosis de 16 g/HL. El seguimiento de la fermentación alcohólica (FAL) se realizó con un control diario de densidad y temperatura, obteniendo una FAL con unos rangos de temperatura de entre 18-24°C, dando por finalizada la FAL a una densidad de 995 g/L. Se realizó un análisis de azúcares reductores en el vino para confirmar el final de la FAL. El descube y prensado se realizó cuando se obtuvieron valores en azúcares reductores por debajo 5 g/L. Al terminar la FAL se realizó un sangrado para separar la pasta del vino yema. El vino prensa se obtuvo prensando la pasta en una prensa hidráulica vertical en la que trabajamos a una presión máx. 2 bar. Posteriormente, se juntaron el vino yema y prensa en los depósitos. Se realizó un trasiego a los 7 días a unos recipientes de cristal de 8 L y se inoculó *Oenococcus oeni* (SB3 Instant, Laffort) a una dosis de 0,01 g/L. La fermentación maloláctica (FML) duró 20 días a una temperatura entre 20-22°C. Se dio por finalizada cuando en cromatografía desapareció el ácido málico. Terminada la FML, se trasegó y sulfitó el vino a 30 mg/L de SO_2 libre. Se realizó una estabilización del vino a 10-13°C durante un mes. A continuación, se ajustó el valor del SO_2 libre a 30 mg/L antes de su embotellado.

4.4 ANALÍTICAS DE LOS VINOS

Todas las analíticas de cada vino se han realizado por triplicado.

4.4.1 Índice de polifenoles totales (IPT)

Esta técnica analítica se basa en la medida de la absorbancia del vino a 280 nm (UV), porque el núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos tiene su máxima de absorbancia a esta longitud de onda (Zamora, 2003). El procedimiento consiste en diluir la muestra de vino en una relación 1:50 con agua destilada y medir la absorbancia (A_{280}) con una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico. Para el cálculo del IPT se aplica la siguiente ecuación:

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

4.4.2 Taninos totales

La determinación de la concentración de taninos se basa en la transformación de proantocianidinas en antocinidinas por calentamiento en medio ácido. Los taninos en el vino tinto están constituidos por cadenas de flavanoles (procianidinas) más o menos polimerizadas, ya sea de manera homogénea, con un encadenamiento regular, o de manera heterogénea por diferentes uniones. En todos los casos, el calentamiento en medio ácido de esas moléculas conduce a la ruptura de ciertas uniones y a la formación de carbocationes que se transforman parcialmente en cianidina si el medio es suficientemente oxidante (Bete-Smith, 1981).

Se prepararon dos tubos de ensayo (tubo 1 y 2) con 2 mL de vino diluido 1:50, 1 mL agua destilada y 6 mL de HCl 12N (37%). El tubo 1 se tapó herméticamente, se protegió de la luz y se puso al baño María 30 min, mientras que el tubo 2 se dejó a temperatura ambiente. Al pasar los 30 min de ebullición, se sacó el tubo 1 del baño y se enfrió con rapidez. Posteriormente, a los tubos 1 y 2 se les añadió 1 mL de etanol y se midió la absorbancia a 550 nm (tubo 1 = A_1 ; tubo 2 = A_2). El resultado se calcula con la siguiente expresión:

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

El coeficiente 19,33 corresponde al coeficiente de extinción molar de la cianidina obtenida por hidrólisis ácida de los taninos condensados, corregido para dar directamente el resultado en g/L.

4.4.3 Antocianos totales

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

Se preparó una disolución madre que contuvo 1 mL de vino, 1 mL de etanol y 20 mL de HCl al 2% (v/v). A partir de esta disolución se añadió en un tubo de ensayo denominado tubo “1”, 5 mL de dicha disolución y 2 mL de agua destilada y en un tubo “2”, 5 mL de la disolución y 2 mL de HNaSO₃ al 15%. Tras 15 min de reacción se midió la absorbancia de ambos tubos a 520 nm. La concentración de antocianos totales viene dada según la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianos Totales (mg/L)} = 875 \times (A_1 - A_2)$$

4.4.4 Índice de gelatina

El índice de gelatina valora el porcentaje de taninos capaces de reaccionar con las proteínas formando combinaciones estables (Hidalgo, 2003; Llaudy et al., 2004). El procedimiento consistió en tomar en un tubo Falcón A 40 mL de vino y 4 mL de una solución fría de gelatina soluble de 70 g/L. En un tubo Falcón B se añadieron 40 mL de vino y 4 mL de agua destilada. Se dejó reposar 3 días, para que los taninos precipitaran con las proteínas, y al cabo de los 3 días se centrifugaron ambos tubos a 4000 rpm durante 10 min. Se ensayó la concentración de taninos totales en ambos sobrenadantes. En este ensayo, todas las muestras se hicieron por cuadruplicado. A partir de estos valores se calcula el índice de gelatina empleando la siguiente ecuación:

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

C_B: concentración de taninos en el tubo B (g/L).

C_A: concentración de taninos en el tubo A (g/L).

Se considera que valores para este índice de más de 60 corresponde con taninos duros y astringentes, de 40 a 60 con taninos complejos y de 20 a 40 con taninos débiles.

4.4.5 Perfil antioxidante de los vinos

4.4.5.1. Método de reducción del radical DPPH

Este método se basa en la reacción del radical libre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en presencia de un compuesto antioxidante (Brand-Williams et al., 1995). La presencia del antioxidante provoca una pérdida del color violáceo del radical DPPH disuelto en metanol a una concentración de 60 µM. La reacción tuvo lugar cuando 980 µL de DPPH (60 µM) se mezclaron con 20 µL de la muestra de vino (a una dilución de 1:50 en agua). Se preparó un blanco sustituyendo el volumen de vino por agua destilada. El tiempo de reacción fue de 2 h a temperatura ambiente, que es el tiempo necesario para llegar a una

lectura estable de la absorbancia a 517 nm. Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los resultados se expresaron en mM de Trolox usando la siguiente recta de calibrado:

$$\text{mM Trolox} = 1,6903 \times (\text{Ab}_{\text{Sblanco}} - \text{Ab}_{\text{Muestra}}) - 0,0056$$

(Rango = 0,08-1 mM; $R^2 = 0,9986$)

4.4.5.2. Capacidad reductora por el método FRAP

Este método evalúa la capacidad antioxidante del vino de acuerdo a su capacidad para reducir el Fe(III) a Fe(II) (Benzie et al., 1996). Mediante un donante de electrones (antioxidante) el complejo Fe (III)-tripiridil-S-triazina (TPTZ-Fe (III)) se reduce a TPTZ-Fe (II). Este complejo de Fe (II) presenta un color azul con un máximo de absorbancia a 593. La medida a esa longitud de onda es proporcional a la capacidad reductora de la muestra.

El complejo TPTZ-Fe (III) se preparó mezclando 25 mL de tampón 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. A 30 µL de vino (diluido en agua a 1:50) se añadieron 970 µL de la mezcla reactiva anterior y se incubó a 37°C durante 30 min. Se prepara un blanco en el que se añadieron 30 µL de agua destilada en lugar de la muestra diluida de vino.

Se construye una recta de calibrado con distintas concentraciones de Trolox.

$$\text{mM Trolox} = 1,535 \times (\text{Ab}_{\text{Strolox}} - \text{Ab}_{\text{Sblanco}}) - 0,0137$$

(Rango = 0,2-1,6 mM)
 $R^2 = 0,9958$

4.4.5.3. Actividad estabilizadora del radical hidroxilo (método HRSA)

Para medir la actividad estabilizadora del radical hidroxilo (OH·), previamente es necesario generar este radical a través de la reacción de Fenton, empleando para ello Fe²⁺ y H₂O₂.



El radical OH· provoca una hidroxilación aromática del ácido salicílico para producir diversos compuestos hidroxilados, principalmente isómeros dihidroxibenzoatos, con absorbancia a 593 nm (Smirnoff & Cumbes, 1989). Muchos antioxidantes, como el vino, pueden actuar estabilizando el radical OH· e impidiendo la hidroxilación aromática del ácido salicílico (Rivero-Pérez et al., 2007)

Para la determinación de la actividad estabilizadora del radical hidroxilo se utilizó el método propuesto por Meng et al. (2012). Para generar el radical OH· se mezclaron 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 analizaron, por triplicado, mezclando 40 µL de muestra de vino, 166 µL de la mezcla de reactivos del radical OH· y 40 µL de ácido salicílico 8 mM. Paralelamente, se preparó un primer control (A0), por triplicado, mezclando 40 µL de agua destilada, 166 µL de la mezcla de reactivos del radical OH·, y 40 µL de ácido salicílico 8 mM. Se preparó un segundo control (A2), por triplicado, añadiendo 40 µL de la muestra de vino, 166 µL de la mezcla de reactivos del radical OH· y 40 µL de agua destilada. La mezcla se incubó 30 min a 37°C y se mide la absorbancia de la mezcla a 593 nm.

El resultado se expresa como porcentaje de inhibición (%) (Li et al., 2013)

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

4.4.5.4. Actividad estabilizadora del radical superóxido (método SRSA)

El método para la evaluación de la actividad estabilizadora del radical superóxido (O₂·⁻) se basa en el sistema PMS-NADH-NBT, compuesto por *N*-metilfenacina metosulfato (PMS), nitroazul tetrazolio (NBT) y NADH (una reducida forma del dinucleótido nicotinamida adenina). El radical O₂·⁻ producido por la reacción del PMS y NADH en presencia de oxígeno reduce al NBT. El descenso en absorbancia a 560 nm con un antioxidante indica la estabilización del radical O₂·⁻ (Robak & Gryglewski, 1988).

Preparamos 100 mL de tampón Tris-HCl 16 mM a pH 8. Con este mismo tampón se prepararon las siguientes disoluciones de NADH 77 µM, NBT 50 µM y PMS 75,9 mM. Previamente se diluyó la muestra de vino en una relación 3:50 con agua destilada.

Por triplicado, se mezclaron 5 µL PMS, 50 µL de NADH, 10 µL de vino diluido y 50 µL NBT (A1). También por triplicado, se realizó un control (A0) sustituyendo el vino con 10 µL de tampón y otro segundo control (A2) sustituyendo el NADH, NBT y PMS con 105 µL de agua. Las mezclas se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se midieron sus absorbancias a 560 nm.

El resultado se expresa como porcentaje de inhibición (%) (Li et al., 2013)

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

4.4.6 Análisis de datos

Las relaciones entre el análisis de nutrición peciolar y el contenido foliar en clorofila, y estrés hídrico con los parámetros fisicoquímicos y del potencial antioxidante del vino se han estudiado mediante un análisis de regresión lineal y correlaciones. El programa utilizado para realizar estos análisis estadísticos ha sido SAS (SAS Institute INC, 2004).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Una correcta evaluación del perfil antioxidante del vino requiere el uso de varios métodos. Por tanto, se evaluó la capacidad antioxidante del vino mediante dos métodos (DPPH y FRAP) con distinto mecanismo de acción. El método DPPH evalúa la capacidad antioxidante global de los compuestos antioxidantes del vino para ceder un átomo de hidrógeno al radical DPPH y de esta forma desactivarlo, mientras que la capacidad reductora del vino (método FRAP) emplea un mecanismo de transferencia de electrones. Por otro lado, se ensayó la actividad estabilizadora de los compuestos antioxidantes del vino hacia dos de los principales radicales derivados del oxígeno, el radical $\cdot\text{OH}$ (método HRSA) y el radical $\text{O}_2\cdot^-$ (método SRSA). El radical $\text{OH}\cdot$, es una de las especies oxigénicas más reactivas presentes en el organismo, mientras que el radical $\text{O}_2\cdot^-$ da lugar a la formación del radical $\text{HO}_2\cdot$ que es un agente oxidante muy activo (Nimse y Pal, 2015).

Los vinos elaborados a partir de las distintas parcelas de ensayo mostraron una alta variabilidad en su capacidad para desactivar el radical DPPH y en su capacidad reductora (método FRAP), con coeficientes de variación del 33,9% y 13,8%, respectivamente (Tabla 2). También mostraron una alta actividad para la estabilización de los radicales $\cdot\text{OH}$ y $\text{O}_2\cdot^-$, con rangos de % de inhibición similares para ambos radicales. Esta variabilidad, junto a la encontrada para la composición polifenólica del vino confirman la gran heterogeneidad de las parcelas de ensayo.

Tabla 2: Parámetros de la composición fenólica y perfil antioxidante del vino.

Parámetros	N	Media	Dev std	Mínimo	Máximo	CV (%)
Índice de gelatina (%)	18	52,04	6,45	41,85	65,07	12,39
Taninos totales (g/L)	18	1,87	0,33	1,27	2,56	17,65
Antocianos totales (mg/L)	18	672,39	98,39	504,00	835,63	14,63
IPT	18	46,20	5,76	34,26	57,65	12,47
DPPH (mM Trolox)	18	25,83	8,75	18,07	45,15	33,88
FRAP (mM Trolox)	18	15,26	2,11	11,27	20,18	13,83
HRSA (%)	18	63,86	9,53	45,75	75,39	14,92
SRSA (%)	18	55,98	9,72	31,91	71,10	17,36

IPT: Índice de polifenoles totales; DPPH: capacidad antioxidante basada en el radical DPPH; FRAP: capacidad reductora, HRSA: Actividad estabilizadora del radical hidroxilo; SRSA: Actividad estabilizadora del radical superóxido; N: número de muestras; Dev std: desviación estándar; CV: coeficiente de variación.

En la Tabla 3 se muestran las correlaciones de los parámetros fisiológicos y agronómicos del viñedo con el perfil antioxidante del vino, mientras que en la Tabla 4 se encuentra las correlaciones de estos parámetros del viñedo con la composición polifenólica del vino.

Tabla 3: Coeficiente de determinación, nivel de significación y pendiente de la regresión de los parámetros fisiológicos y agronómicos del viñedo con el perfil antioxidante del vino

Parámetro	DPPH		FRAP		HRSA		SRSA	
Clorofila cuajado	(-)	0,44 **	(-)	0,04	(+)	0,13	(+)	0,08
Potencial hídrico AM	(-)	0,01	(-)	0,03	(-)	0,24 *	(+)	0,03
Potencial hídrico M	(-)	0,10	(-)	0,47 **	(+)	0,01	(-)	0,12
Peso 100 bayas	(-)	0,23 *	(-)	0,01	(+)	0,12	(+)	0,03
Rendimiento	(+)	0,10	(-)	0,35 **	(-)	0,50 **	(-)	0,11
Vigor	(-)	0,21 *	(-)	0,09	(-)	0,01	(-)	0,24 *
N	(-)	0,18	(-)	0,11	(+)	0,02	(-)	0,07
P	(-)	0,20	(-)	0,38 **	(+)	0,05	(-)	0,07
K	(-)	0,38 **	(-)	0,15	(+)	0,16	(-)	0,16
Ca	(+)	0,18	(-)	0,00	(-)	0,01	(+)	0,08
Mg	(+)	0,48 **	(+)	0,00	(-)	0,68 ***	(+)	0,00
Fe	(-)	0,18	(-)	0,01	(+)	0,48 **	(-)	0,02
Cu	(+)	0,21	(-)	0,16	(-)	0,06	(-)	0,00
Zn	(-)	0,00	(-)	0,05	(-)	0,13	(-)	0,01
Mn	(-)	0,00	(+)	0,00	(-)	0,16	(+)	0,02
B	(-)	0,17	(-)	0,16	(+)	0,03	(-)	0,12
N/K	(+)	0,33 *	(+)	0,10	(-)	0,26 *	(+)	0,13
P/K	(-)	0,02	(-)	0,13	(-)	0,00	(-)	0,00
P/N	(-)	0,15	(-)	0,30 *	(+)	0,05	(-)	0,05
K/Mg	(-)	0,36 **	(-)	0,06	(+)	0,34 *	(-)	0,02
K/Ca	(-)	0,39 **	(-)	0,10	(+)	0,11	(-)	0,18
K/(Ca+Mg)	(-)	0,43 **	(-)	0,08	(+)	0,26	(-)	0,10
Ca/Mg	(-)	0,29 *	(-)	0,02	(+)	0,49 **	(+)	0,00
Zn/Fe	(+)	0,04	(-)	0,03	(-)	0,41 **	(-)	0,01
Fe/Mn	(-)	0,08	(+)	0,00	(+)	0,26 *	(-)	0,00
P/Fe	(-)	0,10	(-)	0,32 *	(-)	0,00	(-)	0,04
[(10 x P)+K] x 50/Fe	(-)	0,15	(-)	0,29 *	(-)	0,02	(-)	0,12

Niveles de significación: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. DPPH: capacidad antioxidante basada en el radical DPPH; FRAP: capacidad reductora, HRSA: Actividad estabilizadora del radical hidroxilo; SRSA: Actividad estabilizadora del radical superóxido; AM: antes del amanecer; M: mediodía

Tabla 4: Coeficiente de determinación, nivel de significación y pendiente de la regresión de los parámetros fisiológicos y agronómicos del viñedo con la composición polifenólica del vino.

Parámetro	Índice Gelatina	Taninos Totales	Antocianos Totales	IPT	
Clorofila cuajado	(+) 0,27 *	(+) 0,00	(-) 0,01	(-) 0,12	
Potencial hídrico AM	(-) 0,03	(-) 0,04	(-) 0,02	(-) 0,09	
Potencial hídrico M	(+) 0,04	(-) 0,27 *	(-) 0,09	(-) 0,31	**
Peso 100 bayas	(+) 0,07	(+) 0,07	(-) 0,03	(+) 0,01	
Rendimiento	(-) 0,02	(-) 0,16	(-) 0,02	(-) 0,46	**
Vigor	(+) 0,05	(-) 0,04	(+) 0,02	(-) 0,25	*
N	(+) 0,05	(-) 0,00	(+) 0,01	(-) 0,47	**
P	(+) 0,10	(-) 0,05	(-) 0,04	(-) 0,29	
K	(+) 0,11	(-) 0,02	(-) 0,00	(-) 0,24	*
Ca	(-) 0,12	(+) 0,03	(+) 0,05	(-) 0,00	
Mg	(-) 0,06	(-) 0,00	(-) 0,00	(+) 0,01	
Fe	(+) 0,02	(-) 0,03	(-) 0,06	(+) 0,03	
Cu	(-) 0,01	(+) 0,00	(-) 0,21	(-) 0,08	
Zn	(+) 0,00	(-) 0,01	(+) 0,00	(-) 0,12	
Mn	(+) 0,01	(-) 0,01	(-) 0,02	(+) 0,10	
B	(+) 0,03	(-) 0,01	(+) 0,03	(-) 0,26	*
N/K	(-) 0,06	(+) 0,04	(+) 0,03	(+) 0,02	
P/K	(+) 0,02	(-) 0,02	(-) 0,01	(-) 0,09	
P/N	(+) 0,08	(-) 0,04	(-) 0,05	(-) 0,14	
K/Mg	(+) 0,17	(+) 0,00	(-) 0,00	(-) 0,17	
K/Ca	(+) 0,19	(-) 0,03	(-) 0,03	(-) 0,17	
K/(Ca+Mg)	(+) 0,19	(-) 0,01	(-) 0,02	(-) 0,17	
Ca/Mg	(+) 0,08	(+) 0,01	(+) 0,01	(-) 0,09	
Zn/Fe	(+) 0,00	(-) 0,01	(+) 0,01	(-) 0,10	
Fe/Mn	(+) 0,03	(+) 0,07	(+) 0,02	(-) 0,03	
P/Fe	(+) 0,13	(-) 0,06	(-) 0,01	(-) 0,41	**
[(10 x P)+K] x 50/Fe	(+) 0,10	(-) 0,05	(+) 0,00	(-) 0,48	**

Niveles de significación: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. AM: Antes del amanecer, M: Mediodía

Respecto al nivel de clorofila en el cuajado se observó una correlación significativa y negativa con la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH. Este comportamiento puede estar relacionado con una cierta incidencia de la clorosis férrica en algunas parcelas, lo cual produce una inhibición en la formación de clorofila bajo condiciones de deficiencia de Fe (Lin y Stocking, 1978), provocando una cierta mejora en la calidad de la uva (Bavaresco et al. 2005). Este efecto se ha trasladado parcialmente a la composición fenólica del vino, ya que si se ha observado una mejora en la calidad de los taninos (menor índice de gelatina). Recientemente, Karmi et al. (2019) observaron que la aplicación foliar de quelantes de Fe, que afectan negativamente al nivel de clorofila foliar, aumenta la capacidad antioxidante de la uva evaluada por el método DPPH.

El estado hídrico del viñedo se ha valorado determinando el potencial hídrico antes del amanecer y al mediodía. Se han encontrado correlaciones significativas y negativas de la presión hídrica al mediodía con el IPT, el contenido en taninos totales y la capacidad reductora del vino (método FRAP). Sin embargo, no se ha encontrado ninguna correlación con la medida del potencial hídrico antes del amanecer. En este sentido Ozden et al. (2010) observó que el incremento de la disponibilidad de agua del viñedo por riego provocó una disminución en el contenido global de los polifenoles totales y en la capacidad antioxidante de la uva.

Los parámetros de rendimiento y vigor también se han correlacionado negativamente con la capacidad antioxidante del vino y su actividad estabilizadora de radicales. En concreto, el peso de 100 bayas presentó una correlación significativa y negativa con la estabilización del radical DPPH, de modo que los viñedos con un menor peso de baya, acusado por un estrés hídrico y niveles moderados de clorosis, conducen a la obtención de vinos con un mayor potencial antioxidante frente al radical DPPH. También, el rendimiento del viñedo se ha correlacionado negativamente con la capacidad reductora (método FRAP), la actividad estabilizadora del radical OH· (método HRSA) y el IPT del vino. Además, el vigor del viñedo se ha correlacionado negativamente con la capacidad antioxidante frente al radical DPPH, con la actividad estabilizadora del radical O₂⁻ (método SRSA) y el IPT.

El rendimiento de los cultivos está fuertemente limitado por el impacto del estrés ambiental (Nilsen y Orcutt, 1996). Un excesivo vigor de la planta nos da un reducido cuajado y una menor fertilidad de las yemas (Robinson, 1995), un retraso de la maduración y una disminución de los compuestos polifenólicos y aromáticos (Spyad et al., 1993; Hilbert et al., 2003). Muñoz et al. (2002) mencionaron que altos rendimientos reducen la calidad de la uva (*Vitis vinifera* L.). Esto se debe en parte a que el exceso de frutos atrasa la acumulación de metabolitos, en comparación con los producidos por plantas con menor carga. Nuestros resultados apuntan a que las uvas procedentes de viñedos con un menor rendimiento y vigor producen vinos con un mayor contenido en polifenoles totales y un mejor perfil antioxidante. Similares resultados se han encontrado con la var. Cabernet Sauvignon, observándose que las uvas procedentes de los viñedos con menor rendimiento producían vinos con un mayor contenido en polifenoles totales y una mejor capacidad reductora (Drenjančević, 2017).

Respecto al estado nutricional del viñedo, se encontraron correlaciones del contenido mineral peciolar con la capacidad antioxidante del vino y con su actividad para estabilizar el radical $\text{OH}\cdot$, pero no para el radical $\text{O}_2\cdot^-$. En concreto, la capacidad de los compuestos antioxidantes del vino para desactivar el radical DPPH se correlacionó negativamente con el K y con su relación con el Mg y Ca (K/Mg, K/Ca y K/(Ca+Mg)) y con Ca/Mg, y positivamente con el Mg y con N/K. La capacidad reductora del vino (método FRAP) se correlacionó negativamente con el P y con su relación con el N, Fe y K (P/N, P/Fe y $[(10 \times \text{P}) + \text{K}] \times 50/\text{Fe}$). También se encontraron correlaciones significativas y negativas de la capacidad estabilizadora del radical $\text{OH}\cdot$ con el Mg, N/K y Zn/Fe y positivas con el Fe, Fe/Mn, K/Mg y Ca/Mg. Por último, los contenidos peciolar de N, K, B, P/Fe y $[(10 \times \text{P}) + \text{K}] \times 50/\text{Fe}$ mostraron correlaciones negativas con el IPT del vino.

Son muchos los factores que pueden causar variación en el estado nutricional del viñedo, como son el tipo de suelo, fertilización, clima, prácticas de riego, edad del viñedo, etc. y por lo tanto en la composición química de la uva (Likar et al., 2015). Dada la posible interrelación entre estos aspectos y la compleja interacción química que puede ocurrir entre los minerales y otros constituyentes de la planta, la interpretación del efecto del estado nutricional del viñedo sobre el perfil antioxidante del vino es difícil. En general, los vinos elaborados con uvas procedentes de vides con un menor contenido mineral en los peciolar presentaron un mejor perfil antioxidante y un mayor IPT.

El K fue uno de los elementos minerales que más influencia presentaron sobre el perfil antioxidante y el IPT del vino, junto con el P, N, Ca, Mg y Fe. Esto puede deberse a que K desempeña una labor fundamental, siendo esencial en el crecimiento y rendimiento del viñedo (Mpelasoka et al., 2003). Participa en procesos de transporte a través de la membrana celular y en translocación de asimilados (Patrick et al., 2001), en las bayas el K es esencial para su crecimiento (Mpelasoka et al., 2003). Una vez aparecen las bayas, estas se convierten en sumidero del K de la planta, acumulándose en ellas hasta el 50% del absorbido por las raíces (Coombe, 1992; Mengel, 2002).

En cuanto al P, los viñedos con un menor contenido peciolar en este mineral producen vinos con mayor capacidad reductora e IPT. Este comportamiento puede estar relacionado con el efecto de P sobre el rendimiento y el vigor de las plantas. Skinner y Matthews (1989) observaron que una deficiencia de P reduce su rendimiento. También se ha descrito que la aplicación de P fomenta el vigor del viñedo (Grant y Matthews, 1996).

El contenido peciolar en N solo ha sido significativo con el IPT, demostrando que niveles moderados de N aumentan el contenido en IPT. Como se comentó anteriormente, un vigor y rendimiento moderado en el viñedo también incrementa el IPT en el vino. El N es un constituyente de la clorofila, proteínas, hormonas, ácidos nucleicos, lecitinas, vitaminas y alcaloides. Mejora el crecimiento vegetativo (vigor) y el rendimiento (Zerihun y Treeby, 2002), aunque puede retrasar la maduración de la uva y reducir su calidad cuando su disponibilidad es excesiva (Bavaresco et al., 2010)

Por otro lado, el contenido peculiar de Mg presentó un diferente efecto en función del método empleado para el análisis del perfil antioxidante del vino. Se observó que un mayor contenido en Mg aumenta la capacidad antioxidante frente al radical DPPH del vino, pero disminuye su actividad estabilizadora del radical OH·.

En la Tabla 5 se muestran los coeficientes de correlación entre los parámetros de composición polifenólica y el perfil antioxidante del vino. Se obtuvo una alta correlación positiva para la capacidad antioxidante, evaluada por el método FRAP, con el contenido en antocianos totales. Este resultado está en consonancia con los encontrados por Rivero-Pérez et al., (2008) y parece indicar que la transferencia de electrones, valorada por el método FRAP, es el mecanismo antioxidante más importantes en los antocianos. Este comportamiento podría deberse a la propia estructura de los antocianos que promueven las reacciones basadas en la transferencia de electrones y permite la deslocalización de un electrón desapareado en sus anillos (Duan et al., 2007). Además, la alta correlación positiva encontrada entre el método FRAP y el IPT indica que los vinos con mayor contenido en compuestos polifenólicos presentan mayor capacidad reductora frente a los radicales.

Tabla 5: Coeficiente de determinación, nivel de significación y pendiente de la regresión de los parámetros de la composición polifenólica con el perfil antioxidante del vino.

Parámetro	DPPH	FRAP	HRSA	SRSA
Índice de gelatina	(-) 0,38	(-) 0,29	(+) 0,09	(+) 0,23
Taninos totales	(-) 0,03	(+) 0,46	(+) 0,26	(+) 0,58 *
Antocianos totales	(-) 0,08	(+) 0,66 *	(-) 0,10	(+) 0,18
IPT	(+) 0,18	(+) 0,69 **	(+) 0,25	(+) 0,24

Niveles de significación: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001. DPPH: capacidad antioxidante basada en el radical DPPH; FRAP: capacidad reductora, HRSA: Actividad estabilizadora del radical hidroxilo; SRSA: Actividad estabilizadora del radical superóxido.

También se obtuvo una correlación positiva entre el método SRSA con el contenido en taninos totales, señalando que la estructura polimerizada de los taninos es adecuada para la estabilización el radical O₂·⁻ (Jordão et al., 2010). Se ha descrito que la condensación de los taninos para dar polímeros de mayor tamaño mejora su actividad antioxidante debido al mayor número de sitios reactivos con los radicales (Bors et al, 2002).

Sin embargo, no se observaron correlaciones entre la composición polifenólica y la capacidad antioxidante frente al radical DPPH y la actividad estabilizadora del radical OH·. Se ha descrito que el perfil antioxidante de un vino depende más de su estructura y conformación que de su concentración, es decir, es más importante el tipo y nivel individual de los compuestos fenólicos presentes en el vino que su contenido global (Rivero-Pérez et al., 2008). Además, cada compuesto fenólico individual presente en el vino causa una diferente respuesta hacia el tipo de ensayo empleado (Art et al., 2003).

En nuestro estudio, la alta heterogeneidad del estado hídrico y nutricional del viñedo seleccionado puede haber provocado una alta variabilidad en la concentración y tipo de los compuestos fenólicos individuales presentes en el vino, lo que hace que la detección de correlaciones lineales con las familias polifenólicas ensayadas sea complicada.

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este estudio se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Una incidencia moderada de la clorosis férrica mejoró la capacidad antioxidante del vino evaluada por el método DPPH y la calidad de los taninos.
- Las subzonas de viñedo con una menor disponibilidad hídrica produjeron vinos con un mayor IPT, contenido en taninos, así como una mayor capacidad antioxidante reductora (FRAP).
- Se han observado relaciones significativas de los parámetros de rendimiento y vigor del viñedo con el perfil antioxidante y el IPT del vino, indicando que los viñedos con menor rendimiento y vigor producen vinos con un mayor contenido global en polifenoles y una mejor capacidad antioxidante y actividad estabilizadora de radicales.
- La composición fenólica y el perfil antioxidante del vino también se han visto modificados por el nivel nutricional del viñedo, siendo el K, junto al P, N, Ca, Mg y Fe, los elementos minerales que mejor se correlacionaron con estos parámetros. En general, los vinos procedentes de viñedos con un menor contenido mineral peculiar producen vinos con mayor IPT y mejor perfil antioxidante.
- El IPT y el contenido en antocianos se correlacionó positivamente con la capacidad reductora del vino (FRAP), mientras que los taninos totales lo hicieron con la capacidad para estabilizar el radical superóxido.

7. Bibliografía

- Acevedo-Opazo, C., Ortega-Farias, S., y Fuentes, S. 2010. Effects of grapevine (*Vitis vinifera* L.) water status on water consumption, vegetative growth and grape quality: An irrigation scheduling application to achieve regulated deficit irrigation. *Agricultural Water Management*, 97, 956–964. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2010.01.025>
- Álvarez-Fernández A. Calidad y eficacia de los quelatos férricos (Feddha, Feeddhma, Feeddhsa, Feeddhca) como fertilizantes. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. 2000.
- Amati, A., Piva, A., Castellari, M. y Arfelli, G. 1996. Preliminary studies on the effect of *Oidium tuckeri* on the phenolic composition of grapes and wine. *Vitis*, 35, 149-150.
- Arts M.J.T.J., Dallinga, J.S., Voss, H.P., Haenen, G.R.M.M. y Bast A.A. 2003 A critical appraisal of the use of the antioxidant capacity (TEAC) assay in defining optimal antioxidant structures. *Food Chemistry*, 80, 409– 414.
- Bate-Smith EC. 1981 Astringent tannins of the leaves of Germaine species. *Phytochemistry*, 20, 211-216.
- Bavaresco, L.; Gatti, M.; Fregoni, M. 2010. Nutritional deficiencies, 165-191. En: *Methodologies and Results in Grapevine Research*. Delrot S. et al., eds., Ed. Springer, Geidelberg, Germany.
- Bavaresco, L.; Civardi, S.; Pezzutto, S.; Vezzulli, S.; Ferrari, F. 2005. “Grape production, technological parameters, and stilbenic compounds as affected by lime-induced chlorosis”. *Vitis*, 44(2): 63-65.
- Benzie, IFF; Strain, JJ La capacidad reductora férrica del plasma (FRAP) como medida de " poder antioxidante ": El ensayo FRAP. *Anal. Biochem.* 239: 70 - 76; 1996. 1145
- Bogart, K. 2006. Comparison of three most common methods- measuring vine water status, November/December 2006 issue of *Practical Winery and Vineyard Magazine*: <http://www.practicalwinery.com/NovDec06/novdec06p42.htm>
- Bors W, Michel C. Chemistry of the antioxidant effect of polyphenols. *Alcohol and Wine in Health and Disease. Ann N Y Acad Sci.* 2002; 957:57–69.

- 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.
- Bruneton, J. 1993. *Farmacognosia: Fitoquímica y Plantas Medicinales* (2ª Edición ed.). (A. Villar del Fresno, E. Carretero Accame, y M. Rebuella Lizabe, Trads.) Madrid, Madrid, España: Editorial Acribia S.A.
- Carbonneau A. 1998. irrigation, vignoble et produit de la vigne. in: *Traité d'irrigation*. J.-R. Tiercelin, coord... Paris, Lavoisier Tec y Doc. Chapitre IV: Aspects Qualitatifs, 257-298.
- Castellarin, S.D. y Di Gaspero, G. (2007). Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biol.*, 7, 46.
- Çelik, H. y Katkat, A.V. 2010. Comparison of various chemical extraction methods used for determination of the available iron amounts of calcareous soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.*, 41: 290-300
- Coombe BG. Research on development and ripening of the grape Berry. *AM J Enol Viticult.* 1992; 43 (1): 101-110.
- Conradie, W.J. y Saayman, D. 1989b. Effects of long-term nitrogen, phosphorus, and potassium fertilization on Chenin blanc Vines. II. Leaf analyses and grape composition. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40(2): 91-98
- Cortell, J.M. y Kennedy, J.A. 2006. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot Noir fruit and extraction in a model system. *J. Agric. Food Chem.*, 54: 8510-8520
- Delas, J. 2000. *Fertilisation de la vigne*. Éditions Féret, Bordeaux, France, 159p.
- Delgado, R., Marín, P., Álamo, M. y Gonzáles, M.R. 2004. Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *J. Sci. Food Agr.*, 84: 623-630
- Deloire A., Carbonneau A., Ojeda H., Silva P., Kraeva E., Jacquet O. Andary C. 2001. relations between grapevine water status and berry phenolic compounds of Syrah and grenache noir varieties. Proposition for principles of canopy management. *Gesco Xiième*. Montpellier, France, 3-7 juillet, 1, 253-258.
- Di Majo, D., La Guardia M., Giammanco S., La Neve L., Giammanco M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents.

- Food Chem. 111, 45-49, 2008
- Downey, M., Dokoozlian, N., Krstic, M. 2006. Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. In: American journal of enology and viticulture. ASEV. 57, 257-268.
- Downey, M.O. Harvey, J.S. Robinson, S.P. 2003. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. Aust. J. Grape Wine Res. 9, 15-27.
- Downey, M.O., Harvey, J.S. y Robinson, S.P. 2004. The effect of bunch shading in berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. Aust J. Grape Wine Res., 10: 55-73
- Drenjancevic, I., Kralik, G., Kralik, Z., Mihalj, M., Stupin, A., Novak, S., & Košević, M. 2017. Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiovascular Health: Revealing Potentials of Functional Food. <https://doi.org/10.5772/67033>
- Duan, X., Jiang, Y., Su, X., Zhang, Z., Shi, J., 2007. Antioxidant properties of anthocyanins extracted from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) fruit tissues in relation to their role in the pericard browning. Food Chem. 101, 1365– 1371.
- Esteban, M.A., Villanueva, M.J. y Lissarrague, J.R. 2001. Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis Vinifera* L.) grape berries during ripening. J. Sci. Food Agric., 81: 409-420
- García-Escudero, E.; Zaballa, O.; González, G; Villar, M.T.; Arroyo, M.C. 2002a. “Una propuesta de mejora para el abonado de la vid en la D.O.Ca. Rioja”. En: III Foro mundial del vino. Rioja III milenio. Ed. Gobierno de La Rioja. Albelda, La Rioja, España, 23-25 de mayo de 2002, 53-56.
- Garrido, J., y Borges, F. 2013. Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. Food Research International, 54, 1844-1858.
- Geldof N, Engeseth NJ. 2002 Antioxidant capacity of honeys from various floral sources based on the determination of oxygen radical absorbance capacity and inhibition of in vitro lipoprotein oxidation in human serum samples. J Agric Food Chem 50 : 3050–5.
- González, R., Nuñez, L. C., Martín, P., Berjón, A. y Zarco-Tejada, P.J. 2005a. Estimación de la absorbancia de radiación PAR en hojas de vid a partir de su contenido en clorofila. V In: Congreso Ibérico de Ciencias Hortícolas, Actas Portuguesas de Horticultura, Vol. 2, Asociación Portuguesa de CC. Hortícolas

- (Ed.), Lisboa. 22–27 Mayo. Oporto. Portugal, pp. 384-389.
- González-Neves, G.; Gil, G.; Ferrer, M. 2002. Effect of different vineyard treatments on the phenolic contents in Tannat (*Vitis vinifera* L.) grapes and their respective wines. *Food Science Technology International*, 8: 315- 321.
- Grant, R.S. y Matthews, M.A. 1996a. The influence of phosphorous availability, scion, and rootstock on grapevines shoot growth, leaf area and petiole phosphorous concentration. *Am. J. Enol. Vitic.*, 47(2): 217-224
- Guidoni, S., Ferrandino, A. y Novello, V. 2008. agronomical practices on skin anthocyanin profile of Nebbiolo grapes. *Am. J. Enol. Vitic.*, 59: 22-29
- Gutiérrez, B. A. 2002. Chocolate, Polifenoles y Protección a la Salud. *Acta Farm. Bonaerense* 21, 149-152.
- Haselgrove, L., Botting, D., van Heeswijck, R., Hoj, P.B., Dry, P.R., Ford, C. y Iland, P.G. 2000. Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 6: 141-149
- Heim, K.E.; Tagliafero, A.R.; Bobyla, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 13(10): 572-584.
- Hidalgo J. Tratado de enología, tomo I. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid 2003.
- Hilbert, G., Soyer, J.P., Molot, C., Giraudon, J., Milin, S. y Gaudillere, J.P. 2003. Effects of nitrogen supply on must quality and anthocyanin accumulation in berries of cv. Merlot. *Vitis*, 42: 69-76
- Jackson, J.I., Lombard, P.B. 1993. Environmental and management practices affecting grape composition and wine quality – A review. *Am. J. Enol. Vitic.*, 44, 409-429.
- Jeong, S.T., Goto-Yamamoto, N., Kobayashi, S. y Esaka, M. 2004. Effects of plant hormones and shading on the accumulation of anthocyanins and the expression of anthocyanin biosynthetic genes in grape berry skins. *Plant Sci.*, 167: 247-252.
- Jordao, P.V.; Vieira, S., Santos, F.; Comenda, J.; Santos, M.C.; Roque, V.C.; Prates, M.A. 2010. “Preliminary reference values for leaf analyses of *Vitis vinifera* Trincadeira/99R in the Portuguese region of Borba/Alentejo”. En: VI International Symposium on Mineral Nutrition of Fruit 314.
- Karmin, O.; Yang, C. Effect of Manitoba-Grown Red-Osier Dogwood Extracts on

- Recovering Caco-2 Cells from H₂O₂-Induced Oxidative Damage. *Antioxidants* 2019, 8, 250
- Keller, M.; Kummer, M.; Vasconcellos, M. C. 2001. "Reproductive growth of grapevines in response to nitrogen supply and rootstock". *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7(1), 12-18.
- Keller, M. 2005. Deficit irrigation and vine mineral nutrition. *Am. J. Enol. Vitic.*, 56: 267-283
- Kennedy, J., Matthews, M., Waterhouse, A. 2002. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. In: *American Journal of Enology and Viticulture*. ASEV. 53, 268-274.
- Llaudy, M. C.; Canals, R.; Canals, J. M.; Rozés, N.; Arola, Ll.; Zamora, F. new method for evaluating astringency in red wine. *J. agric. Food Chem.* 2004, 52, 742?-746.
- Li, J., Lin, J., Xiao, W., Gong, Y., Wang, M., Zhou, P. and Liu, Z, 2013 Solvent extraction of antioxidants from steam exploded sugarcane bagasse and enzymatic convertibility of the soils fraction. *Bioresource Technology* 130, 8-15.
- M. Likar, K. Vogel-Mikuš, M. Potisek, K. Hančević, T. Radić, M. Nečemer, M. Regvar Importance of soil and vineyard management in the determination of grapevine mineral composition. *Sci. Total Environ.*, 505, 2015, pp. 724-731.
- Meng, J.F ., Fang, Y.L., Qin, M.Y ., Zhuang, Z.W., (2012) Varietal differences among the phenolic profiles and antioxidant properties of four cultivars of spine grape (*Vitis davidii* Foex) in Chongyi Country (China). *Food Chemistry* 134, 2049-2056.
- Mengel K. Alternative or complementary role of foliar supply in mineral nutrition. *Acta Hort.* [Internet]. 2002 [Consultado 09 May 2017]; 594: 33-47. Disponible en: https://www.actahort.org/books/594/594_1.htm
- Mpelasoka B, Schachtman D, Treeby M, Thomas M. A review of potassium nutrition in grapevines with special emphasis on berry accumulation. *Aust. J. Grape Wine R.* [Internet]. 2003 [Consultado 05 May 2017]; 9: 154-168. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1755-0238.2003.tb00265.x>
- MS 20101442 Submitted 10/22/2010, Accepted 3/8/2011. Author is with the Dept. of Food Science and Human Nutrition, 202 ABL, 1302 W. Pennsylvania Ave., Univ. of Illinois, Urbana, IL 61801, U.S.A. Direct inquiries to author Brewer (E-mail: msbrewer@uiuc.edu). Referencia de la figura 2

- Muñoz, R., J. Pérez, P. Pszczolkowski y E. Bordeu. 2002. Influencia del nivel de carga y microclima sobre la composición y calidad de bayas, mosto y vino de Cabernet-Sauvignon. *Ciencia e Investigación Agraria* 29(2), 115-125.
- Neveu V, Perez-Jiménez J, Vos F, Crespy V, du Chaffaut L, Mennen L, Knox C, Eisner R, Cruz J, Wishart D, Scalbert A. Phenol-Explorer: an online comprehensive database on polyphenol contents in foods. *Database (Oxford)* 2010;2010:bap024 Epub 2010 Jan 8.
- Nilsen, E.T., Orcutt, D.M. 1996 *Physiology of plants under stress*. In: *Abiotic factors*. John Wiley & Sons (eds.) INC, New York.
- Nimse, S. B. y Pal, D 2015. Free radicals, natural antioxidants, and their reactions mechanisms. *RSC Adv*, 5, 27986-28006.
- OIV, 1996, Résolution VITI 4/1995. Diagnostic foliaire. Une harmonisée method. *Bulletin de l'OIV*, 69: 779-780.
- 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.
- Ozden, M., Vardin, H., Simsek, M. and Karaaslan, M. 2010. Effects of rootstocks and irrigation levels on grape quality of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *African Journal of Biotechnology*, 9(25): 3801-3807.
- Palazón, J., Cusidó, R., & Morales, C. 2012. *Metabolismo y significación biológica de los polifenoles del vino*. Barcelona: Rubes Editorial.
- Pasten, C., y Grenett, H. 2006. Vino, fibrinolisis y salud. *Revista médica de Chile* 34, 1040 - 1048.
- Patrick J, Zhang W, Tyerman S, Offler C, Walker N. Role of membrane transport in phloem translocation of assimilates and water. *Aust. J. Plant. Physiol.* 2001; 28: 695–707.
- Pearson, R.C.; Goheen, A.C. 1998. “Desórdenes producidos por factores abióticos (Parte III)”. En: *Plagas y enfermedades de la vid*, Eds.: Mundi-Prensa; American Phytopathological Society, 64-71.
- Rebolo López, L. 2007. *Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O: Ribeira, Valdeorras y Ribeira*. Lugo: Universidad de Santiago de

- Compostela, Campus de Lugo. Departamento de analítica, nutrición y bromatología.
- Reynolds, A.G., Pearson, E.G., De Savigny, C., Coventry, J. y Strommer, J. 2007. Interactions of vine age and reflective mulch upon berry, must, and wine composition of five *Vitis vinifera* cultivars. *Int. J. Fruit Sci.*, 7: 85-119
- Ribéreau-Gayon, P.; Stonestreet, E. Les dosage des anthocyanes dans le ving rouge. *Bull. Soc. Chim.* 1965, 9, 2649-2652.
- Rivero-Pérez, M. D., Muniz, P., y González-Sanjosé, M. L. (2008). Contribution of anthocyanin fraction to the antioxidant properties of wine. *Food and Chemical Toxicology*, 46(8), 2815-2822.
- Rivero-Pérez, M. D., Muñoz, P., & González-Sanjosé, 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>
- Robinson, J.B. 1995. “Grapevine nutrition”. En: *Viticulture*. Volume 2. Practices. Eds.: Coombe, B.G y Dry, P.R. Winetitles, Adelaide. Australia, 178-208.
- Robak, J., & Gryglewski, R. J. (1988). Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*, 37(5), 837–841. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(88\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0006-2952(88)90169-4)
- Rodrigo, R., Miranda, A., & Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412(5–6), 410–424. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.11.034>
- SAS Institute Inc 2013. SAS/ACCESS® 9.4 Interface to ADABAS: Reference. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057–1060. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7)
- Sancho, M., & Mach, N. 2015. Efecto de los polifenoles del vino sobre la prevención del cáncer. *Nutrición Hospitalaria*, 535-551.
- Skinner, P.W.; Matthews, M.A. 1989. “A novel interaction of magnesium translocation with the supply of phosphorous to root of grapevine (*Vitis vinifera* L.)”. *Plant, Cell and Environment*, 13: 821-826.

- Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L. y Ferguson, J.C. 2002. Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries. *Am. J. Enol. Vitic.*, 53: 171-182.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057–1060.
[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80182-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80182-7)
- Tagliavini, M. y Rombolà, A.D. 2001. Iron deficiency and chlorosis in orchard and vineyard ecosystems. *Eur. J. Agron.*, 15: 71-92.
- Tomás-Barberán, F. A. 2003. Los polifenoles de los alimentos y la salud. *Alimentación, Nutrición y Salud.*, 10(2), 41-53.
- Topalovic A., Slatnar, A., Stampar, F., Knezevic, M. y Veberic, R. 2011. Influence of foliar fertilization with P and K on chemical constituents of grape cv. “Cardinal”. *J. Agr. Food Chem.*, 59: 10303-10310
- Valdés, M.E., Moreno, D., Gamero, E., Uriarte, D., Prieto, M.H., Manzano, R., Picon, J. y Intrigliolo, D.S. 2009. Effects of cluster thinning and irrigation amount on water relations, growth, yield and fruit and wine composition of Tempranillo grapes in Extremadura (Spain). *J. Int. Sci. Vigne Vin*, 43: 67-76
- Van Leeuwen, C., Seguin, G. y Glorie, Y. (1999). Influence de l'alimentation en eau sur la croissance de la vigne, la maturation des raisins et les caractéristiques des vins en zone méditerranéenne. (Exemple de Némée, Grèce, cépage Saint-Georges). *J. Int.Sci. Vigne. Vin*. 33: 149-160.
- Veilksar, S.G., Toma, S.I. y Kreidman, J. 2005. Effect of Fe-containing compounds on the chlorosis manifestation and grape quality. *Proc. Int. Workshop Adv. Grapevine Wine Res.*, Venosa, Italy
- Wojdyło A, Oszmiański J, Czemerys R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 105(3): 940–9.
- Zamora F. *Elaboración y crianza del vino tinto: Aspectos científicos y prácticos*. Ed: Mundi-Prensa. 2003. 225p.
- Zerihun, A. y Treeby, M.T. 2002. Biomass distribution and nitrate assimilation in response to N supply for *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon on five *Vitis* rootstock genotypes. *Aust. J. Grape Wine Res.*, 8:157-162