



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Aplicación foliar en el viñedo de un extracto del alga <i>Ascophyllum nodosum</i> como herramienta para mejorar la composición nitrogenada, fenólica y aromática de la uva y del vino de las variedades Tempranillo y Tempranillo Blanco
Autor/es
Gastón Ignacio Gutiérrez Gamboa
Director/es
Teresa Garde Cerdán, Eva Pilar Pérez Álvarez y Yerko Moreno Simunovic
Facultad
Facultad de Ciencia y Tecnología
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico

Tesis presentada como compendio de publicaciones. La edición en abierto de la misma NO incluye las partes afectadas por cesión de derechos

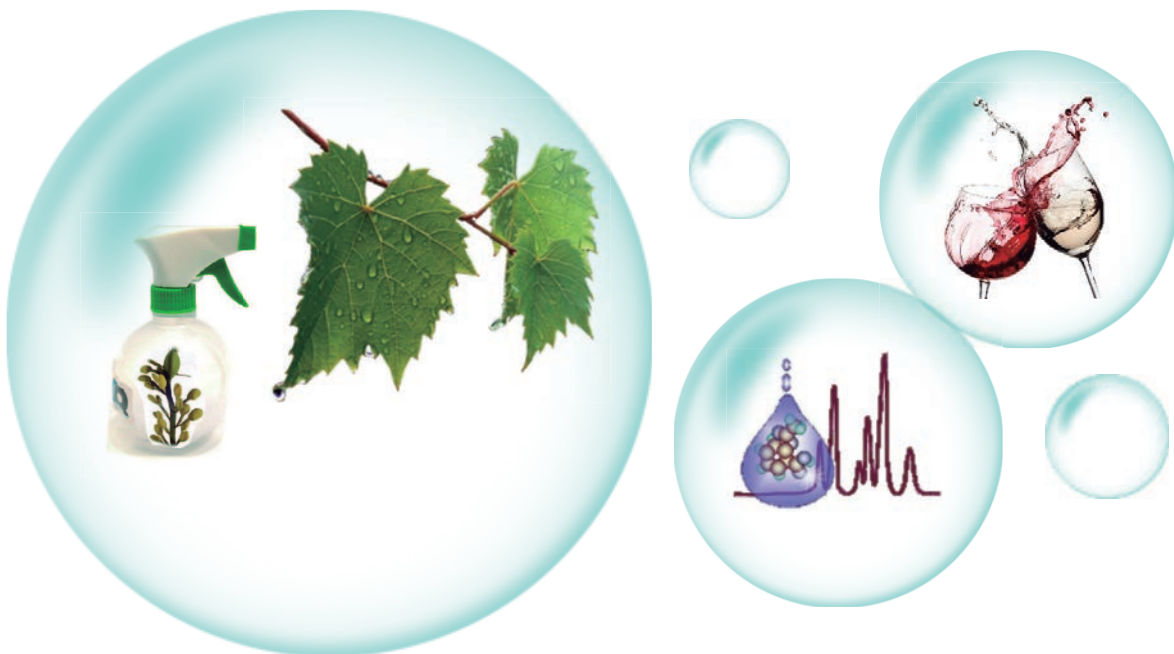


Aplicación foliar en el viñedo de un extracto del alga *Ascophyllum nodosum* como herramienta para mejorar la composición nitrogenada, fenólica y aromática de la uva y del vino de las variedades Tempranillo y Tempranillo Blanco, tesis doctoral de Gastón Ignacio Gutiérrez Gamboa , dirigida por Teresa Garde Cerdán, Eva Pilar Pérez Álvarez y Yerko Moreno Simunovic (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

- © El autor
- © Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2020
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

Aplicación foliar en el viñedo de un extracto del alga *Ascophyllum nodosum* como herramienta para mejorar la composición nitrogenada, fenólica y aromática de la uva y del vino de las variedades Tempranillo y Tempranillo Blanco



Gastón Ignacio Gutiérrez Gamboa

2020

TERESA GARDE CERDÁN, Doctora en Ciencias Químicas por la Universidad Pública de Navarra e Investigadora del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino,

EVA PILAR PÉREZ ÁLVAREZ, Doctora por la Universidad de La Rioja en Ecosistemas Agrícolas Sostenibles e Investigadora del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura, y

YERKO MORENO SIMUNOVIC, Ph.D. Profesor Titular, Director del Centro Tecnológico de la Vid y el Vino, Universidad de Talca, Chile

CERTIFICAN:

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “Aplicación foliar en el viñedo de un extracto de *Ascophyllum nodosum* como herramienta para mejorar la composición nitrogenada, fenólica y aromática de la uva y del vino de las variedades Tempranillo y Tempranillo Blanco” ha sido realizada por Gastón Gutiérrez Gamboa en el Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (CSIC, Universidad de La Rioja, Gobierno de La Rioja) bajo nuestra dirección y reúne las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor con Mención Internacional.

Lo hacen constar en Logroño, a

Fdo: Dra. Teresa Garde Cerdán

Fdo: Dra. Eva Pilar Pérez Álvarez

Fdo: Dr. Yerko Moreno Simunovic

Referencias bibliográficas de las publicaciones a las que ha dado lugar la presente Tesis Doctoral

La Tesis Doctoral se presenta como compendio de publicaciones por lo que a continuación se presentan los trabajos que forman parte de esta:

1. Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Martínez-Lapuente, L., Souza-da Costa, B., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E.P. (2020). Phenolic composition of Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) grapes and wines after biostimulation through a foliar seaweed application. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100, 825-835.
2. Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E.P. (2020). Study of must and wine amino acids composition after seaweed applications to Tempranillo blanco grapevines. *Food Chemistry*, 308, 125605.
3. Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E.P. (2020). Seaweed foliar applications at two dosages to Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) grapevines in two seasons: Effects on grape and wine volatile composition. *Food Research International*, 130, 108918.
4. Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Ayestarán, B., González-Lázaro, M., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E.P. (2020). *Ascophyllum nodosum* applications to Tempranillo

grapevines: Effects on grape and wine phenolic compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, en revisión.

5. Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E.P. (2020). Biostimulation to Tempranillo grapevines (*Vitis vinifera* L.) through a brown seaweed during two seasons: Effects on grape juice and wine nitrogen compounds. *Scientia Horticulturae*, 264, 109177.
6. Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E.P. (2020). Effects on grape and wine volatile composition after biostimulation with a brown alga to Tempranillo grapevines in two seasons. *Food Chemistry*, en revisión.

El trabajo que ha dado lugar a la presente Tesis Doctoral ha sido financiado a través de una beca predoctoral concedida por el Ministerio de Educación del Gobierno de Chile “BCH / Doctorado 72170532” y otorgada por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT). Además, ha contado con la financiación a través de los proyectos del grupo Viticultura y Enología Aplicadas (VIENAP) perteneciente al Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV), Logroño, España.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos al Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) y a cada una de las personas que forman parte de esta institución por su gran calidad humana y profesional, así como también al grupo Viticultura y Enología Aplicadas (VIENAP) por su dirección y fijar las directrices de mi Tesis Doctoral. Por otro lado, agradezco al Centro Tecnológico de la Vid y el Vino (CTVV), institución en la que desarrollé dos estancias de investigación. Por último, agradezco el financiamiento otorgado por la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONICYT) a través del Ministerio de Educación de Chile (MINEDUC) ya que, sin esta subvención, la presente Tesis Doctoral no hubiera podido ser desarrollada.

Dedicado a

Nora Graciela Ortega Norambuena

(Q.E.P.D)

Índice

Lista de abreviaturas.....	I
Índice de Figuras.....	IV
Índice de Tablas.....	VI
Resumen.....	1
Abstract.....	4
1. Introducción.....	7
1.1. Aspectos generales de la D.O.Ca. Rioja.....	7
1.1.1 Tempranillo Blanco.....	10
1.1.2 Tempranillo.....	12
1.2. Metabolitos secundarios e incidencia en la calidad de la uva y del vino.....	13
1.3. Compuestos fenólicos.....	14
1.3.1. Clasificación de compuestos fenólicos.....	14
1.3.1.1. <i>Compuestos flavonoideos</i>	14
1.3.1.1.1. Antocianos.....	15
1.3.1.1.2. Flavonoles.....	17
1.3.1.1.3. Flavanoles.....	20
1.3.1.2. <i>Compuestos no flavonoideos</i>	21
1.3.1.2.2. Ácidos hidroxibenzoicos.....	21
1.3.1.2.2. Ácidos hidroxibenzoicos.....	22
1.3.1.2.3. Estilbenos.....	23
1.3.2. Biosíntesis de compuestos fenólicos.....	24
1.3.3. Factores que influyen en el contenido de los compuestos fenólicos en uvas y en vinos.....	26
1.3.4. Implicación de los compuestos fenólicos en la calidad del vino.....	31
1.3.4.1. <i>Efectos de los compuestos fenólicos en la salud</i>	34
1.4. Compuestos nitrogenados.....	35
1.4.1. Los aminoácidos y el amonio.....	35
1.4.2. Biosíntesis de compuestos nitrogenados.....	36
1.4.3. Factores que influyen en la composición nitrogenada de la uva y del vino.....	37

1.4.4. Implicación de los compuestos nitrogenados en la calidad del vino.....	43
1.5. Compuestos volátiles.....	46
1.5.1. Clasificación de compuestos volátiles.....	46
1.5.1.1. <i>Aroma varietal</i>	46
1.5.1.2. <i>Aromas fermentativos</i>	49
1.5.1.3. <i>Aromas de crianza y envejecimiento</i>	50
1.5.2. Biosíntesis de compuestos volátiles.....	50
1.5.3. Factores que influyen el contenido de compuestos volátiles de la uva y del vino.....	52
1.5.4. Implicación de los compuestos volátiles en la calidad del vino.....	56
1.6. Empleo de los extractos de algas en uvas y en vinos.....	58
1.6.1. Especies de algas.....	59
1.5.2. Uso de algas en viticultura.....	61
2. Objetivos.....	65
3. Materiales y Métodos.....	66
3.1. Ubicación del ensayo.....	66
3.2. Caracterización climática.....	67
3.3. Diseño experimental.....	72
3.3.1. Tratamientos.....	72
3.3.2. Composición química del fertilizante comercial.....	74
3.4. Vendimia y vinificación.....	74
3.4.1. Vendimia.....	74
3.4.2. Vinificación de los vinos blancos.....	75
3.4.3. Vinificación de los vinos tintos.....	75
3.5. Parámetros físico-químicos de las uvas y de los vinos.....	77
3.6. Análisis de compuestos fenólicos, nitrogenados y volátiles en uvas y en vinos.....	79
3.6.1. Análisis de los compuestos fenólicos en uvas y en vinos.....	79
3.6.2. Análisis de los aminoácidos y del amonio en las uvas y en los vinos.....	81
3.6.3. Análisis de los compuestos volátiles en los mostos y en los vinos.....	83
3.6.3.1. <i>Análisis de los compuestos volátiles en los mostos</i>	83
3.6.3.2. <i>Análisis de los compuestos volátiles en los vinos</i>	84
3.7. Análisis sensorial.....	86
3.7.1. Tempranillo Blanco.....	86

3.7.2. Tempranillo.....	86
3.8. Análisis estadístico.....	90
4. Resultados.....	91
4.1. Influencia de la aplicación foliar del alga <i>Ascophyllum nodosum</i> en la composición fenólica, nitrogenada y volátil de las uvas y de los vinos de Tempranillo Blanco.....	92
4.1.1. Publicación nº1.....	92
4.1.2. Publicación nº2.....	95
4.1.2. Publicación nº3.....	98
4.2. Influencia de la aplicación foliar del alga <i>Ascophyllum nodosum</i> en la composición fenólica, nitrogenada y volátil de las uvas y de los vinos de Tempranillo.....	101
4.2.1. Publicación nº4.....	101
4.2.2. Publicación nº5.....	104
4.2.3. Publicación nº6.....	107
5. Discusión general.....	110
5.1. Efecto de la aplicación foliar del alga <i>Ascophyllum nodosum</i> en las uvas y en los vinos de Tempranillo Blanco.....	111
5.1.1. Compuestos fenólicos.....	111
5.1.2. Compuestos nitrogenados.....	115
5.1.3. Compuestos volátiles.....	119
5.2. Efecto de la aplicación foliar del alga <i>Ascophyllum nodosum</i> en las uvas y en los vinos de Tempranillo.....	125
5.2.1. Compuestos fenólicos.....	125
5.2.2. Compuestos nitrogenados.....	129
5.2.3. Compuestos volátiles.....	133
6. Conclusiones.....	139
6.1. Efectos de la aplicación foliar del alga <i>Ascophyllum nodosum</i> en el contenido de compuestos fenólicos, nitrogenados y volátiles de la uva y del vino de Tempranillo Blanco.....	139
6.2. Efectos de la aplicación foliar del alga <i>Ascophyllum nodosum</i> en el contenido de compuestos fenólicos, nitrogenados y volátiles de la uva y del vino Tempranillo.....	141
7. Conclusions.....	144
7.1. Effects of <i>Ascophyllum nodosum</i> seaweed application in the content of phenolic, nitrogen and volatile compounds of Tempranillo Blanco grapes and wines.....	144

7.2. Effects of <i>Ascophyllum nodosum</i> seaweed application in the content of phenolic, nitrogen and volatile compounds of Tempranillo grapes and wines.....	146
8. Bibliografía.....	148

Lista de abreviaturas

110 R: 110 Richter

4-VG: 4-vinilguayacol

4-VF: 4-vinilfenol

Aaba: ácido α -aminobutírico

acglc: acetil-glucósido

ACP: análisis de componentes principales

ADH: alcohol deshidrogenasa

AAT: antocianina aciltransferasa

AAT: alcohol acetil transferasa

Ala: alanina

AMF: análisis multifactorial

ANOVA: análisis de la varianza

AR: antocianidina reductasa

Arg: arginina

Asn: asparagina

Asp: ácido aspártico

BTH: benzotiadiazol

CCD: dioxigenasas de carotenoides

CHS: chalcona sintasa

Cit: citrulina

cmglc: cumaroil-glucósido

Cys: cisteína

DAD: detector de diodo array

DAP: fosfato diamónico

DEEMM: dietilo etoximetilenmalonato

D.O.Ca.: Denominación de Origen Calificada

DMAPP: dimetilalil pirofosfato

DVB: divinilbenceno

ET_o: evapotranspiración de referencia

F3'H: flavonoide-3'-hidroxilasa

F3'5'H: flavonoide-3',5'-hidroxilasa
FLS: flavonol sintasa
Gaba: ácido γ -aminobutírico
gal: galactósido
GGPP: geranilgeranil difosfato sintasa
glc: glucósido
glcU: glucurónido
Gln: glutamina
Glu: ácido glutámico
Gly: glicina
GPP: geranil difosfato
GS: glutamina sintetasa
H₂S: sulfuro de hidrógeno
His: histidina
HPL: hidroperóxido liasa
HoPro: hidroxiprolina
IC: índice de color
IPP: isopentenil pirofosfato
Ile: isoleucina
IPT: índice de polifenoles totales
LAR: leucoantocianidina reductasa
LDOX: leucoantocianidin dioxigenasa
Leu: leucina
LOX: lipoxigenasa
Lys: lisina
MeJ: jasmonato de metilo
MEP: 2-metil-D-eritritol-4-fosfato
Met: metionina
MVA: ácido mevalónico citoplasmático
NCR: represión catabólica nitrogenada
NH₄⁺: amonio
NH₄H₂PO₄: dihidrógeno fosfato de amonio
NR: nitrato reductasa

PAL: fenilalanina amonio liasa
Phe: fenilalanina
PPOs: polifenol oxidasas
Pro: prolina
PVDF: fluoruro de polivinilideno
PVPP: polivinilpirrolidona
Ser: serina
SIAR: Servicio de Información Agroclimática de La Rioja
SPME: microextracción en fase sólida
STS: estilbeno sintasa
TCA: 2,4,6-tricloroanisol
TDN: 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno
Thr: treonina
Trp: triptófano
Tyr: tirosina
UFGT: flavonoide 3-*O*-glucosil transferasa
Val: valina

Índice de Figuras

Figura 1. Zonas de producción de la Denominación de Origen Calificada Rioja.....	8
Figura 2. Hoja y racimo de la variedad Tempranillo Blanco.....	11
Figura 3. Hoja y racimo de la variedad Tempranillo.....	13
Figura 4. Estructura general de los compuestos flavonoideos.....	15
Figura 5. Estructuras de los principales antocianos encontrados en las uvas y en los vinos.....	16
Figura 6. Representación esquemática de la estructura de la pared celular de la uva que muestra la presencia de antocianos en las vacuolas, y de la pared celular primaria que contiene los polisacáridos más importantes (Paissoni et al., 2018).....	17
Figura 7. Estructura general de los flavonoles.....	18
Figura 8. Ruta sintética de los flavonoles (Flamini et al., 2013).....	19
Figura 9. (A) Esqueleto básico de los compuestos flavonoideos de 3 anillos, (B) esqueleto básico de un flavonol C3-hidroxilado y, (C) estructuras de los monómeros de flavanol existentes en las uvas.....	21
Figura 10. Estructura del ácido cafeico.....	22
Figura 11. Estructura del a) ácido siríngico y b) ácido gálico.....	23
Figura 12. Estructura general de los estilbenos.....	24
Figura 13. Estructura general de un aminoácido.....	35
Figura 14. Formación de compuestos C ₁₃ norisoprenoides a través de la degradación oxidativa de los carotenoides (a) neoxantina para formar β -damascenona después de su reducción (designada como [H]) e hidrólisis catalizada por ácido y (b) β -caroteno para dar dos moléculas de β -ionona.....	48
Figura 15. Síntesis de las iononas.....	52
Figura 16. Índice del porcentaje de enfermedad (PDI) de las bayas inoculadas con <i>Botrytis cinerea</i> en vides tratadas con un extracto de <i>Ascophyllum nodosum</i> (ANE) y sin tratar (NTV) de acuerdo con lo expuesto por Frioni et al. (2019).....	64
Figura 17. Ubicación de las parcelas de estudio en La Grajera, La Rioja, España.....	65
Figura 18. Evolución de la precipitación mensual (mm) en las añadas 2017 y 2018 en La Grajera, La Rioja, España.....	69
Figura 19. Temperatura media mensual (°C) en las campañas 2017 y 2018 en La Grajera, La Rioja, España.....	70
Figura 20. Temperatura mínima promedio mensual (°C) en las campañas 2017 y 2018 en La Grajera, La Rioja, España.....	70
Figura 21. Temperatura máxima promedio mensual (°C) en las campañas 2017 y 2018 en La Grajera, La Rioja, España.....	71

Figura 22. Evapotranspiración de referencia media mensual (mm) en las campañas 2017 y 2018 en La Grajera, La Rioja, España.....	72
Figura 23. Aplicación de los tratamientos a las vides Tempranillo en el viñedo experimental.....	73

Índice de Tablas

Tabla 1. Principales rutas metabólicas de síntesis de los diversos aminoácidos.....	36
Tabla 2. Resumen de las características climáticas más importantes de las añadas 2017 y 2018.....	68
Tabla 3. Fecha de aplicación de los tratamientos llevados a cabo en el viñedo.....	73
Tabla 4. Fecha de vendimia de las uvas de los viñedos de Tempranillo Blanco y de Tempranillo.....	75
Tabla 5. Ejemplo de la ficha de cata usada para el análisis sensorial de los vinos de Tempranillo Blancos.....	88
Tabla 6. Ejemplo de la ficha de cata usada para el análisis sensorial de los vinos de Tempranillo..	89

Resumen

Diferentes estudios sugieren que los extractos de algas pueden comportarse como elicitores en horticultura, desencadenando la síntesis de ciertos metabolitos secundarios, principalmente de compuestos fenólicos en varios cultivos y especies leñosas, incluidas las vides. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre los efectos de las aplicaciones foliares de algas en las vides se centran en sus efectos sobre la fisiología de la planta, la productividad, los parámetros fisicoquímicos del mosto y del vino y la síntesis de ciertos compuestos fenólicos. Por otro lado, la variedad Tempranillo Blanco se originó de forma espontánea a partir de una mutación natural de una vid de Tempranillo, que fue descubierta en 1988. Su cultivo ha sido recientemente autorizado por el Consejo Regulador de la Denominación de Origen Calificada Rioja (D.O.Ca. Rioja). Sin embargo, sus características enológicas han sido poco estudiadas.

Debido a esto, el objetivo de esta Tesis Doctoral fue estudiar el efecto de las aplicaciones foliares de un fertilizante comercial elaborado a partir del alga *Ascophyllum nodosum* a las vides Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) y Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) en la composición fenólica, nitrogenada y volátil de las uvas y de los vinos obtenidos durante las añadas 2017 y 2018. Las aplicaciones de estos tratamientos, así como de un control, se realizaron en ambos años por duplicado utilizando dos dosis distintas; una dosis baja (0,25 % v/v) y una dosis alta (0,5 % v/v).

Los resultados mostraron que en las uvas y en los vinos de la variedad Tempranillo Blanco, la catequina fue el compuesto fenólico más abundante. Asimismo, las vides de esta variedad se comportaron como acumuladoras de arginina. Los compuestos C6 fueron los compuestos volátiles más abundantes en los mostos Tempranillo Blanco, mientras que la (E)- β -damascenona fue el compuesto volátil varietal más abundante en los mostos de esta variedad.

En la variedad Tempranillo Blanco, la concentración de catequina y de flavonoles en las uvas aumentó después de la aplicación foliar de la dosis alta del extracto del alga a las vides en ambas añadas. Este tratamiento aumentó la concentración de varios aminoácidos en el mosto durante la añada 2017, mientras que la aplicación de ambas dosis del alga a las vides no afectó significativamente su contenido en 2018. La fenilalanina, precursora de varios compuestos fenólicos y volátiles en ciertos tejidos vegetales, aumentó su contenido en el mosto en ambas añadas después de la aplicación foliar de la dosis alta del extracto del alga a las vides. Este tratamiento aplicado a las vides de Tempranillo Blanco tendió a aumentar la concentración de ciertos compuestos C6 en los mostos en ambas añadas, mientras que la aplicación foliar de la dosis baja del alga tendió a disminuir el contenido de 2-feniletanol y de 2-feniletanal en los mostos. El factor añada afectó al contenido de la mayoría de los aminoácidos y de los compuestos volátiles del mosto debido probablemente a las diferencias en las precipitaciones y en la humedad relativa de ambas añadas. La concentración de los ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos en los vinos de Tempranillo Blanco se vio afectada, probablemente, por las reacciones de oxidación, mientras que su contenido de estilbenos estuvo condicionado por la afección de enfermedades criptogámicas en las uvas. El nitrógeno fácilmente asimilable por la levadura en los mostos parece haber condicionado la concentración de la mayoría de los aminoácidos y de los compuestos volátiles del vino.

En la variedad Tempranillo, la dosis baja del extracto comercial del alga aplicada a las vides aumentó la concentración de la mayoría de los compuestos fenólicos de la uva y de los aminoácidos en los mostos en la añada 2017, mientras que la dosis alta aumentó el contenido de ciertos flavonoles de la uva en 2017. Las dos dosis del extracto comercial del alga aplicadas a las vides de Tempranillo permitieron aumentar el contenido en las uvas de *trans*-piceido y de los

estilbenos totales en ambas añadas. Los tratamientos aplicados a las vides apenas afectaron el contenido de compuestos fenólicos en las uvas en la añada 2018. Sin embargo, la dosis alta aumentó el contenido en los mostos de varios terpenos, C₁₃ norisoprenoides, ésteres, bencénicos, alcoholes, compuestos carbonílicos y compuestos C₆. Generalmente, un alto contenido de nitrógeno fácilmente asimilable por la levadura en el mosto permitió alcanzar una alta concentración de aminoácidos y compuestos volátiles en los vinos. La concentración de antocianos y flavonoles en los vinos de Tempranillo disminuyó a medida que la duración de la fermentación maloláctica y la acidez volátil aumentaban, mientras que el efecto contrario fue observado en el contenido de ácidos hidroxibenzoicos y estilbenos.

Por lo tanto, las aplicaciones de los extractos del alga *Ascophyllum nodosum* a las vides mejoraron el contenido de la mayoría de los compuestos analizados en las uvas, dependiendo principalmente de las condiciones climáticas de la añada, de la dosis del extracto de alga aplicado y de la variedad.

Abstract

Different studies suggest that seaweed extracts may behave as elicitors in horticulture, triggering the synthesis of certain secondary metabolites, mainly of phenolic compounds in several crops and woody species, including grapevines. However, the studies about the effects of foliar applications of seaweeds to grapevines are mainly focused on their effects on plant physiology, productivity, physicochemical parameters of musts and wines and the synthesis of certain phenolic compounds. On the other hand, Tempranillo Blanco grapevine variety originated spontaneously from a natural mutation of a Tempranillo grapevine, which was discovered in 1988. Its cultivation has recently been authorized by the D.O.Ca. Rioja. Currently, the oenological characteristics of this variety have been little studied.

The aims of this Doctoral Thesis were to study the effect of foliar applications of a commercial extract elaborated from the *Ascophyllum nodosum* alga to Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) and Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grapevines on the phenolic, nitrogen and volatile composition of grapes and wines in 2017 and 2018 seasons, as well as to characterize the phenolic, nitrogen and volatile composition of grapes and wines of Tempranillo Blanco grapevine variety. The applications of these treatments, as well as a control, were carried out twice and in two different dosages; a low (0.25 % v/v) and high (0.5 % v/v) dosages, when the grapevines reached the phenological stage of veraison and one week later.

The results showed that catechin was the most abundant phenolic compound in grapes and wines of Tempranillo Blanco variety. Additionally, the grapevines of this variety behaved as arginine accumulators. The C6 compounds were the most abundant volatile compounds in Tempranillo Blanco musts, while (E)- β -damascenone was the most abundant varietal volatile compound in the musts of this variety.

In Tempranillo Blanco grapevine variety, the concentration of catechin and flavonols in grapes increased after the application of the high dosage of the seaweed to the grapevines in both seasons. This treatment increased also the concentration of several amino acids in the musts in 2017, while the application of both dosages of the seaweed extract to grapevines barely affected amino acids content in musts in 2018. Phenylalanine, a precursor of several phenolic and volatile compounds in plant tissues increased its content in the musts in both seasons after the application of the high dosage of the seaweed application. The application of this treatment to the grapevines tended to increase the concentration of certain C6 compounds in musts in both seasons, while the application of the low dosage of the seaweed extract to the grapevines tended to decrease the content of 2-phenylethanol and 2-phenylethanal in musts. The season factor affected the content of most of the amino acids and volatile compounds in musts due to the differences in rainfall and relative humidity of both seasons. The concentration of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in wines was affected by the winemaking process, probably due to oxidation reactions, while the stilbene content in wines was affected by the effect of cryptogamic diseases in grapes. Yeast assimilable nitrogen in musts seems to have impacted the concentration of most of the amino acids and volatile compounds in wines.

In Tempranillo grapevine variety, the low dosage of the seaweed extract applied to the grapevines increased the concentration of most of the phenolic compounds in grapes and the amino acids in musts in 2017 season, while the high dosage of the seaweed extract increased the content of certain flavonols in the grapes in 2017. Both dosages of the seaweed commercial extract applied to Tempranillo grapevines allowed to increase the content in the *trans*-piceid and total stilbenes in grapes in both seasons. The treatments barely affected the content of phenolic compounds in grapes in 2018 season, however, the high dosage of the seaweed extract increased the content in musts of

several individual terpenes, C₁₃ norisoprenoids, esters, benzenoids, alcohols, carbonyl compounds and C₆ compounds. Generally, a high content of yeast assimilable nitrogen in the musts allowed to reach a high concentration of amino acids and volatile compounds in wines. The concentration of anthocyanins and flavonols in wines decreased as the duration of malolactic fermentation and volatile acidity increased, while the content of hydroxybenzoic acids and stilbenes in wines had the opposite effect.

Therefore, seaweed applications to the grapevines increased the content of most of the analyzed compounds in grapes, depending mostly on the climatic conditions of the season, the dosage of the extract applied to grapevines and the selected variety.

1. Introducción

1.1. Aspectos generales de la D.O.Ca. Rioja

La Denominación de Origen Calificada Rioja (D.O.Ca. Rioja) es la Denominación de Origen más antigua de España. Fue reconocida oficialmente el 6 de junio de 1925, cuando se creó el Consejo Regulador cuyo objetivo era delimitar la zona de producción, expedir garantía de vino y controlar la utilización del nombre “Rioja”. En el año 1991, los vinos de “Rioja” fueron amparados por la primera Denominación de Origen Calificada de España (D.O.Ca. Rioja), la cual establece hasta la actualidad, además de las normativas de delimitación de las zonas de producción, las variedades permitidas para ser cultivadas, los rendimientos anuales máximos, las técnicas de elaboración permitidas, así como los tiempos de envejecimiento y de crianza, entre otros.

La D.O.Ca. Rioja posee tres zonas vitivinícolas con características diferenciadas, denominadas “Rioja Alta”, “Rioja Alavesa” y “Rioja Oriental” (conocida como “Rioja Baja” hasta el año 2018) (Figura 1). La superficie total de viñedo en la D.O.Ca. Rioja es de 65.326 ha, las cuales se distribuyen de la siguiente manera: 27.347 ha pertenecen a Rioja Alta, 24.590 ha pertenecen a Rioja Oriental y 13.389 ha pertenecen a Rioja Alavesa. La clasificación de “Rioja Alta” comprende los territorios situados al sur del Ebro ubicados entre Haro y Logroño. Esta zona posee un clima continental al abrigo de la Sierra de Cantabria que impide el paso de vientos húmedos del norte y presenta suelos pobres y calizos adecuados para el desarrollo de la vid. Estas características permiten producir uva destinada a elaborar vinos de alta calidad con una gran capacidad para el envejecimiento. En esta zona se encuentra el 42 % del viñedo perteneciente a la D.O.Ca. Rioja (DOCa Rioja, 2019a). La denominada “Rioja Oriental” posee extensiones amplias de viñedos, plantados en zonas más llanas que en las otras áreas vitícolas de la D.O.C., sobre suelos aluviales con una altura aproximada de 300 metros sobre el nivel del mar (m s. n. m.). Su clima es

de tipo mediterráneo cálido debido a la influencia de vientos cálidos provenientes del sureste, y se caracteriza por sus bajas precipitaciones, lo que da lugar a vinos de alta graduación alcohólica. La “Rioja Alavesa” comprende el norte del río Ebro, con municipios de la provincia de Álava y se caracteriza por tener un clima de tipo mediterráneo y estar protegida por la Sierra de Cantabria. Los suelos son mayoritariamente arcillo-calcáreos, dando como resultado vinos frescos de graduación alcohólica moderada.



Figura 1. Zonas de producción de la Denominación de Origen Calificada Rioja (Fuente: <https://www.decantalo.com/>).

En la D.O.C.a. Rioja se elaboran vinos blancos, rosados, tintos y espumosos. La crianza de los vinos, principalmente tintos, se realiza en barricas de roble de 225 L, complementándose con un periodo de envejecimiento en botella. Las bodegas de la D.O.C.a. Rioja concentran el mayor parque de barricas a nivel mundial con, aproximadamente, 1.385.000 barricas. Según el proceso tradicional de crianza y envejecimiento, los vinos de la D.O.C.a. Rioja se clasifican en cuatro categorías denominadas “genérico”, “crianza”, “reserva” y “gran reserva”. El “vino genérico” se

caracteriza por ser un vino de primer o segundo año que conserva las características aromáticas primarias y de acidez propias de la uva. Los “vinos crianza” son vinos que están en su tercer año habiendo permanecido como mínimo un año en bodega, para el caso de vinos tintos, y seis meses para vinos blancos. Los “vinos reserva” poseen como mínimo una crianza entre bodega y botella de tres años, de los cuales, al menos uno, debe ser en bodega y seis meses en botella. La categoría “vinos gran reserva” solo se concede para vinos de buenas cosechas que han sido criados durante un periodo total de setenta meses con un período mínimo de crianza, para los tintos, de dos años en bodegas y dos años en botella, mientras que, para los vinos blancos, el periodo de crianza contempla un mínimo de cuatro años, de los cuales al menos seis meses deben estar en bodegas.

Las variedades de uva autorizadas por el Consejo Regulador de la D.O.Ca. Rioja cuando se creó (1925) eran siete: tres variedades blancas (Viura, Malvasía y Garnacha Blanca) y cuatro variedades tintas (Tempranillo, Garnacha Tinta, Mazuelo y Graciano). En el año 2008, se llevó a cabo una ampliación de las variedades permitidas por el Consejo Regulador de la D.O.Ca. Rioja (Orden APA/689/2008 de 8 de marzo y Orden ARM/1372/2009 de 27 de mayo). En la actualidad, las variedades autorizadas son catorce, cinco son variedades tintas (Tempranillo (87 %), Garnacha Tinta (8 %), Graciano (2 %), Mazuelo (2 %) y Maturana Tinta (0,2 %)) y nueve son variedades blancas (Viura (70 %), Malvasía (2 %), Garnacha Blanca (3 %), Tempranillo Blanco (12 %), Maturana Blanca (0,6 %), Turruntés (0,6 %), Verdejo (5 %), Chardonnay (2 %) y Sauvignon Blanc (3 %)).

Según las estadísticas vitivinícolas del año 2018 elaboradas por el Consejo Regulador de la D.O.Ca. Rioja (DOCa Rioja, 2019b), la producción de vino fue de 336 millones de L con un rendimiento de 51,71 hL/ha. La añada 2018 produjo un total de 485 millones de kg de uva con un rendimiento medio de 7.475 kg/ha. La mayor parte del viñedo se ubica en la Comunidad Autónoma

de La Rioja con 45.002 ha (69 %), seguida por la Provincia de Álava con 12.979 ha (20 %) y por la Comunidad Foral de Navarra con 7.021 ha (11 %), siendo la variedad Tempranillo la más importante con una superficie total de plantación de 52.443 ha (79,7 %) seguida muy de lejos por Garnacha Tinta con una superficie de plantación de 4.534 ha (6,9 %) y Viura con una superficie de 4.166 ha (6,3 %). En total, 144 municipios son parte de la D.O.Ca. Rioja entre los cuales, 118 pertenecen a la Comunidad Autónoma de La Rioja, 18 a la Provincia de Álava y 8 a la Comunidad Foral de Navarra.

1.1.1 Tempranillo Blanco

La variedad Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) surgió de una mutación natural de una cepa de la variedad Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) en un antiguo viñedo ubicado en la localidad de Murillo de Río Leza (La Rioja, España) en el año 1988 (Martínez y García-Escudero, 2017). La mutación se originó debido a una reorganización del genoma de la vid Tempranillo que causó la pérdida de 313 genes heterocigotos, incluida una pérdida de la copia funcional para los factores de transcripción de la familia MYB necesarios para la pigmentación de las bayas (Carbonell-Bejerano et al., 2017). Estos cambios a nivel genético dieron lugar a la pérdida del color rojo de las bayas y a una baja viabilidad de los gametos, lo que compromete la productividad del Tempranillo Blanco en añadas climáticas adversas (Carbonell-Bejerano et al., 2017).

La variedad Tempranillo Blanco presenta hojas de tamaño mediano y de cinco a siete lóbulos superpuestos, con el seno peciolar en forma de U y de poca abertura (Martínez y García-Escudero, 2017) (Figura 2). En el envés presenta una pilosidad de densidad media, que se intensifica hacia la nervadura principal (Martínez y García-Escudero, 2017). El limbo presenta dientes con ambos lados convexos, largos y con una relación largo-ancho elevada (Martínez y

García-Escudero, 2017). Los racimos son de tamaño medio, sueltos y de pedúnculo corto, mientras que las bayas son de tamaño pequeño a medio (Figura 2) (Martínez y García-Escudero, 2017).



Figura 2. Hoja y racimo de la variedad Tempranillo Blanco (Fuente:

<http://www.acenologia.com/>).

Tempranillo Blanco es una variedad de ciclo corto por lo que puede adaptarse a las tres zonas vitivinícolas de la D.O.Ca. Rioja (Martínez y García-Escudero, 2017). Presenta vigor medio-alto con una fertilidad de yemas elevada por lo que se puede adaptar bien tanto a sistemas de poda corta, como larga o mixta, alcanzando niveles de rendimiento medio (Martínez y García-Escudero, 2017; Kizildeniz et al., 2018). Esta variedad es sensible a acariosis (*Calepitrimerus vitis*), polilla del racimo (*Lobesia botrana*), y medianamente sensible a mildiu (*Plasmopara viticola*) y oídio (*Uncinula necator*) (Martínez y García-Escudero, 2017). Su racimo presenta baja compacidad por lo que se ve menos afectada por la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) que racimos de otras variedades cultivadas en la D.O.Ca. Rioja (García-Escudero et al., 2011; Martínez et al., 2016; Martínez y García-Escudero, 2017). Bajo ciertas condiciones climáticas, durante el período de floración, se ha observado la marcada presencia de “millerandage” en el racimo, en parte asociado

a su baja fertilidad de polen (Alva et al., 2015; Baby et al., 2015; Martínez y García-Escudero, 2017; Carbonell-Bejerano et al., 2017).

Respecto a su potencial enológico, las uvas y los vinos de la variedad Tempranillo Blanco presentan alto contenido de ciertos ácidos orgánicos y mayor índice de polifenoles totales que otras variedades de vid blanca (Martínez y García-Escudero, 2017; Ayestarán et al., 2019). Estas propiedades físico químicas propias de Tempranillo Blanco pueden ser adecuadas tanto para la producción de vinos jóvenes, como para otro tipo de vinos de crianza en barrica (Martínez y García-Escudero, 2017; Ayestarán et al., 2019). Debido a estas particularidades, la plantación de vides y la elaboración de vinos de la variedad Tempranillo Blanco, ha sido recientemente autorizada por el Consejo Regulador de la D.O.Ca. Rioja. Esta variedad de uva se utiliza actualmente en algunas bodegas de la D.O.Ca. Rioja para elaborar vinos afrutados con características intensas de cítricos y frutas tropicales (Ayestarán et al., 2019).

1.1.2 Tempranillo

Tempranillo es la variedad más característica de la D.O.Ca. Rioja y una de las variedades de vid autóctonas más importante de España. Sus hojas son de tamaño grande con la presencia de cinco a siete lóbulos ligeramente superpuestos, conformando una forma pentagonal (Galet, 2000) (Figura 3). El seno peciolar tiene forma de U cerrada, con una marcada superposición de sus lóbulos peciolares (Galet, 2000). El racimo es de tamaño entre medio y grande con un grado de compacidad elevado, mientras que su pedúnculo presenta un tamaño medio y con poca lignificación (Galet, 2000) (Figura 3). Las bayas son pequeñas, de forma circular, de complejo desprendimiento del pedicelo, mientras que el hollejo es grueso comparado con otras variedades de vid (Galet, 2000).



Figura 3. Hoja y racimo de la variedad Tempranillo (Fuente: <http://www.vitivinicultura.net/>).

Tempranillo es una variedad de maduración temprana y, por consecuencia, de ciclo corto, de comportamiento vigoroso, de porte erguido, y muy fértil por lo que, para obtener alta productividad, son adecuados los sistemas de poda corta (Hidalgo, 2002). Es una variedad muy sensible al oídio (*U. necator*) y a la polilla del racimo (*L. botrana*), y además de ciertos factores abióticos como la sequía (Hidalgo, 2002). Los vinos elaborados con esta variedad poseen un intenso color, baja acidez y una graduación alcohólica entre media y alta. Por lo general, los vinos de Tempranillo se están destinando principalmente a la producción de vinos de crianza y de reserva y, en menor medida, a vinos jóvenes (Hidalgo, 2002).

1.2. Metabolitos secundarios e incidencia en la calidad de la uva y del vino

Los metabolitos secundarios que serán descritos en los siguientes apartados de la presente Tesis Doctoral son los compuestos fenólicos, nitrogenados y volátiles, los cuales fueron analizados en las uvas y en los vinos tras la aplicación foliar de un extracto comercial del alga *Ascophyllum nodosum* a las vides de las variedades Tempranillo Blanco y Tempranillo.

1.3. Compuestos fenólicos

1.3.1. Clasificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos juegan un papel clave en la calidad de la uva y del vino, ya que son responsables de ciertos atributos sensoriales como el color, la astringencia y el amargor (Kennedy et al., 2006). Estos compuestos se clasifican en flavonoideos, los cuales comprenden los antocianos, los flavonoles y los flavanoles, y los no flavonoideos, que comprenden los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos hidroxibenzoicos y los estilbenos. Los vinos tintos contienen un mayor nivel de compuestos fenólicos que los vinos blancos fundamentalmente debido a que la fermentación alcohólica se realiza en presencia de hollejos y pepitas, los cuales contienen una amplia gama de compuestos fenólicos (Rodríguez Montealegre et al., 2006). En este sentido, los antocianos son sustancias presentes en los hollejos de las uvas que aportan el color característico del vino tinto (Zamora, 2013). Sin embargo, a pesar de que los cultivares blancos carecen de antocianos en las uvas, la presencia de otros compuestos fenólicos es de gran importancia en sus uvas y vinos ya que son más susceptibles a reacciones de oxidación (Kritzinger et al., 2013; Waterhouse et al., 2016).

1.3.1.1. Compuestos flavonoideos

Los compuestos flavonoideos (Figura 4) se sintetizan a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA (Falcone Ferreyra et al., 2012). Son una familia muy diversa de compuestos que se caracterizan por ser solubles en agua (Es-Safi et al., 2007). Los antocianos, los flavonoles y los flavanoles, son los compuestos fenólicos flavonoideos más abundantes presentes en la uva y en el vino (Robinson et al., 2019).

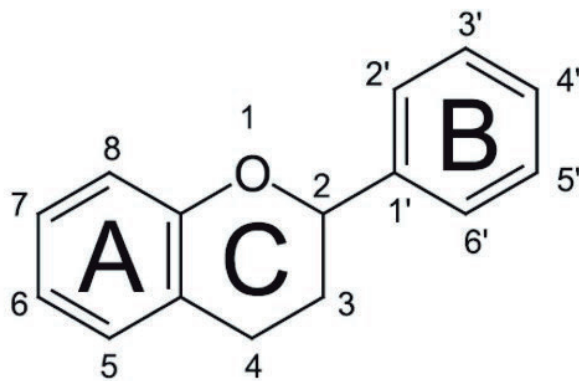


Figura 4. Estructura general de los compuestos flavonoideos.

1.3.1.1.1. Antocianos

Los antocianos son pigmentos hidrosolubles responsables del color rojo y sus variaciones de tonalidad en las uvas y en los vinos tintos. Además, contribuyen a la astringencia y al amargor de las uvas y de los vinos (de Freitas et al., 2017; Paissoni et al., 2018). Su estructura se caracteriza por una aglicona denominada antocianidina, la cual solo se encuentra en concentraciones trazas en las uvas y en los vinos, unida a una o varias moléculas de azúcares que pueden estar esterificadas con ciertos ácidos orgánicos, tales como los ácidos cumárico, cafeico y acético (Waterhouse et al., 2016). Por su parte, la antocianidina está formada por dos anillos, el A, proveniente de compuestos acilos acumulados en oscuridad, y el B, derivado del ácido shikímico (Gil, 2012). Las uvas y los vinos de las variedades *Vitis vinifera* L. contienen principalmente configuraciones 3-*O*-glucósidos (glc) de delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina y trazas de pelargonidina (Figura 5), mientras que las especies de *Vitis* no vinifera presentan altos contenidos de pelargonidina con la configuración 3,5-*O*-diglc (Castillo-Muñoz et al., 2009; He et al., 2010a; Cheng et al., 2017). En este sentido, una característica que diferencia las variedades de vides de la especie *V. vinifera* de las no vinífera es la presencia exclusiva de la configuración 3-*O*-glucósido (glc) en las *V. vinifera*, siendo la malvidina-3-*O*-glc el antociano más abundante (de Freitas et al., 2017).

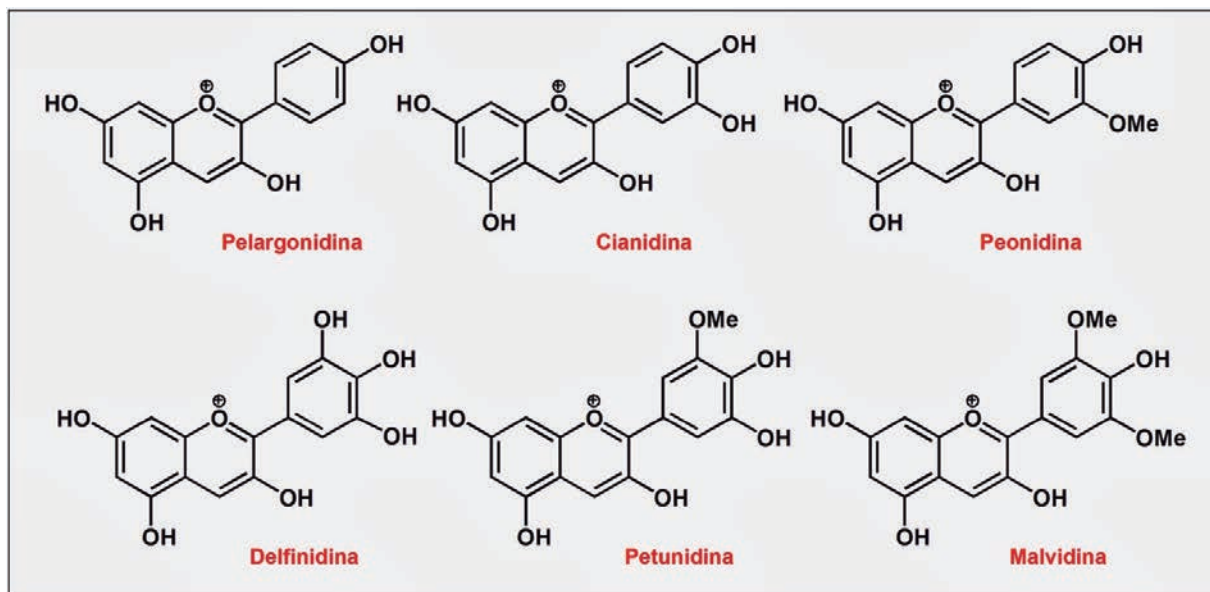


Figura 5. Estructuras de los principales antocianos encontrados en las uvas y en los vinos.

Los antocianos se encuentran principalmente en las vacuolas celulares de los hollejos de las uvas (Figura 6), desempeñando varios roles, desde la atracción de insectos para su reproducción hasta la protección contra el estrés tanto de tipo biótico como abiótico (Paissoni et al., 2018). Sin embargo, la variedad Aspirant Bouschet (*V. vinifera*) tiene la particularidad de poseer una alta concentración de antocianos tanto en los hollejos de la uva como en su pulpa, razón por la cual se le define como variedad “tintorera”. La cantidad y composición de los antocianos presentes en las uvas depende fundamentalmente de la especie, la variedad, el estado de madurez de la uva, las condiciones edafoclimáticas, la productividad del viñedo y las prácticas vitícolas. Es así como la variedad Pinot Noir puede presentar una ausencia considerable de antocianos acilados en comparación con la mayoría de las variedades de vid (Dimitrovska et al., 2011). Por otro lado, en ciertas variedades como Garnacha y Carignan, los antocianos acilados predominantes son los cumarilados, es decir, esterificados con ácido cumárico, mientras que en otras como Cabernet Sauvignon, los antocianos acilados predominantes son los acetilados, esterificados con ácido

acético (Núñez et al., 2004; Gil et al., 2012; Portu et al., 2015a, 2017a; Martínez-Gil et al., 2018a; Gutiérrez-Gamboa et al., 2017a, 2018a). En las variedades tintas coincide que la malvidina 3-O-glc y sus derivados dominan el perfil de antocianos en la uva y en el vino. Las prácticas vitícolas tales como el uso de cubiertas vegetales, el riego y la aplicación de elicitores pueden modular el contenido de antocianos en la uva y, por consecuencia, el del vino. Las cubiertas vegetales y el riego afectan la disponibilidad de agua para las vides, disminuyendo el tamaño de las bayas y, por consecuencia, aumentando la relación hollejo/pulpa lo que da como resultado un aumento en el contenido de ciertos compuestos fenólicos, incluido el de los antocianos (Esteban et al., 2001; Ojeda et al., 2002; Lee y Steenwerth, 2013; Pérez-Álvarez et al., 2015; Bouzas-Cid et al., 2016).

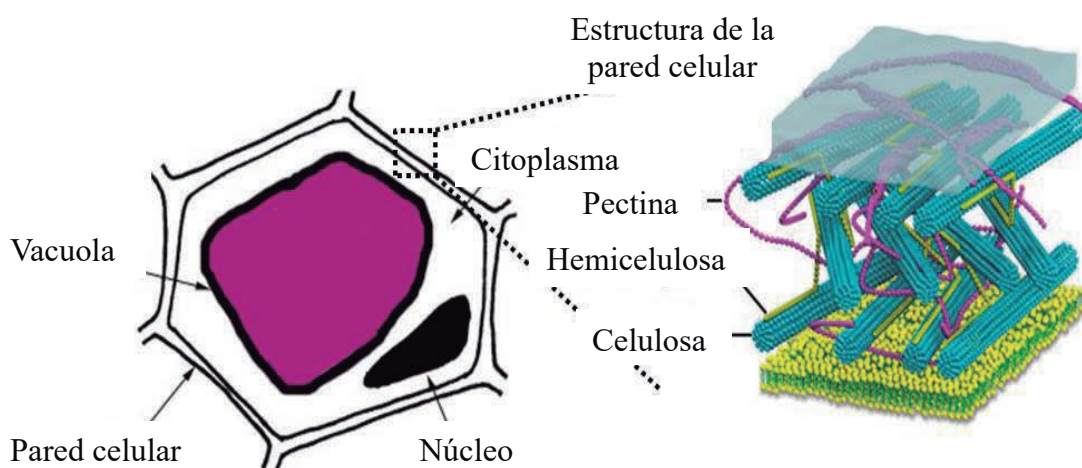


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de la pared celular de la uva que muestra la presencia de antocianos en las vacuolas, y de la pared celular primaria que contiene los polisacáridos más importantes (Paissoni et al., 2018).

1.3.1.1.2. Flavonoles

Los flavonoles poseen una cetona en el carbono C4 y una insaturación entre los carbonos C2 y C3, así como un grupo hidroxilo (-OH) en la posición C3 (Figura 7). Son responsables del

color amarillo de las uvas, el del vino blanco y el del tinto (Zamora, 2013; Waterhouse et al., 2016). Estos compuestos se sintetizan principalmente en el hollejo de las bayas, donde parecen funcionar como filtro solar (Flamini et al., 2013). Su concentración se incrementa por una alta exposición a la luz solar antes del período de envero, lo cual es inducido por los genes del factor de transcripción de la familia MYB (Matus et al., 2009). Debido a esto, los flavonoles actúan como protectores naturales de radiación UV en el hollejo de las uvas porque absorben fuertemente las longitudes de onda UV-A y UV-B (Flamini et al., 2013).

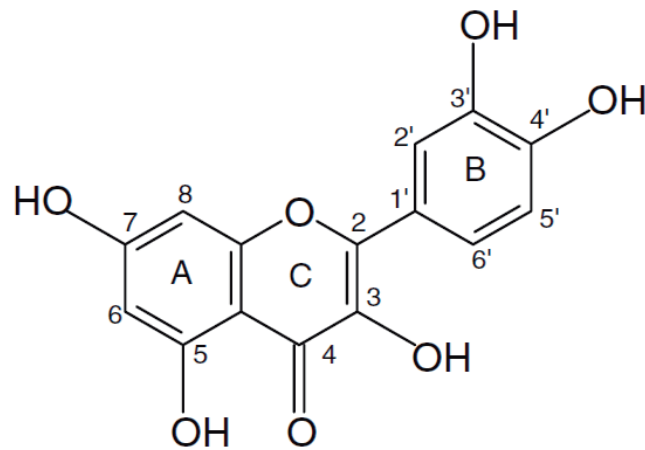


Figura 7. Estructura general de los flavonoles.

Los flavonoles difieren en el número y el tipo de sustitución en el anillo B, por lo que en las uvas se pueden encontrar como glucósidos, galactósidos, ramnósidos, rutinósidos y glucurónidos de las agliconas de la miricetina, la quercetina, el kaempferol, la isorhamnetina y la laricitrina, mientras que en los vinos es posible encontrar las formas libres de dichas agliconas debido a la acción enzimática de las levaduras (Figura 8) (Flamini et al., 2013). La falta de expresión de la enzima flavonoide 3', 5' hidroxilasa (F3'5'H) en las uvas blancas, restringe la

presencia de flavonoles sólo a derivados de la quercetina, el kaempferol y la isorhamnetina, mientras que las uvas tintas también contienen derivados de la miricetina, la laricitrina y la siringetina (Mattivi et al., 2006; Castillo-Muñoz et al., 2010; Flamini et al., 2013). La quercetina es el principal flavonol de la mayoría de las variedades blancas, en las que representa más del 70 % del total de los flavonoles (Castillo-Muñoz et al., 2010), mientras que, en la mayoría de las variedades tintas, la miricetina es el flavonol más abundante (Mattivi et al., 2006; Flamini et al., 2013).

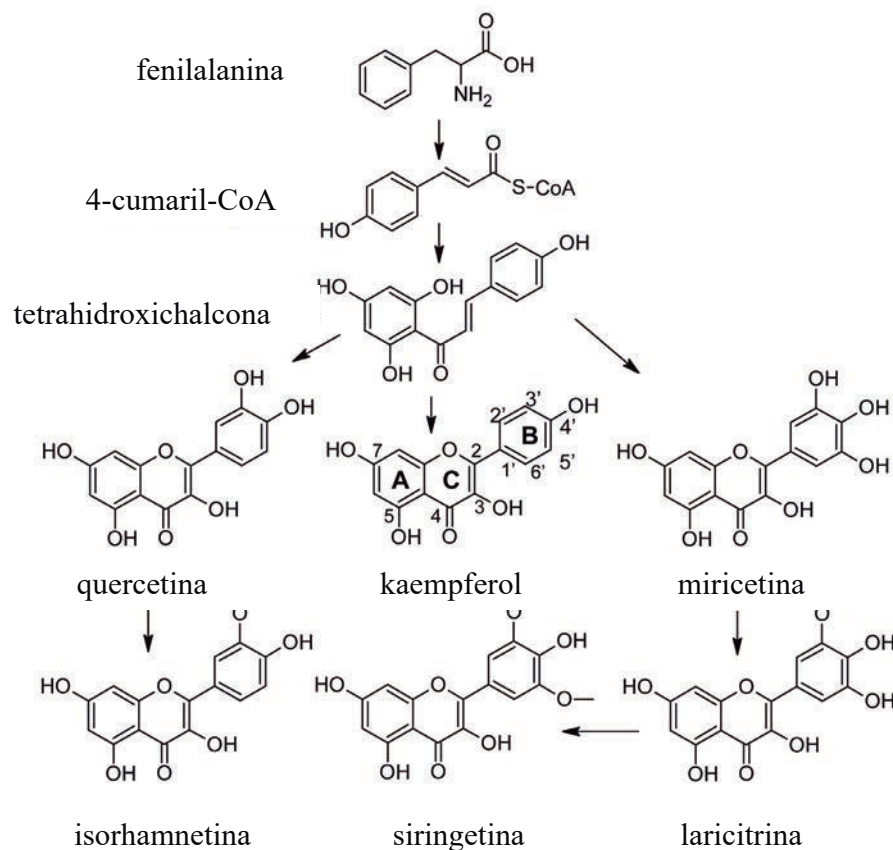


Figura 8. Ruta sintética de los flavonoles (Flamini et al., 2013).

1.3.1.1.3. Flavanoles

Los flavanoles o comúnmente denominados taninos, representan una compleja familia de compuestos fenólicos compuesta por las diferentes formas isoméricas de la catequina y sus polímeros denominados taninos condensados o proantocianidinas (Figura 9) (Zamora, 2013; Waterhouse et al., 2016). Por otro lado, los taninos hidrolizables generalmente se extraen en el periodo de crianza del vino cuando éste está en contacto con la madera de roble y están en baja concentración comparado con la de los taninos condensados (Smith et al., 2015). Los glucósidos de flavanoles se han detectado, pero no cuantificado en uvas y vinos (Delcambre y Saucier, 2012). Los taninos extraídos del hollejo de la uva contienen principalmente subunidades derivadas de la epigallocatequina, así como pequeñas cantidades de galocatequina y epigallocatequina 3-*O*-galato (Smith et al., 2015). Los taninos de las semillas son mucho más pequeños y contienen de 2 a 16 subunidades de catequina y epicatequina (Herderich y Smith, 2005). La pulpa de la uva también contiene taninos, pero no se pueden extraer durante la maceración debido a una fuerte asociación con los componentes de la pared celular (Bindon et al., 2014). La importancia de estos compuestos se debe a que son los principales responsables del sabor amargo, y de la astringencia y que contribuyen a la estabilidad del color en los vinos envejecidos (Peleg et al., 1999).

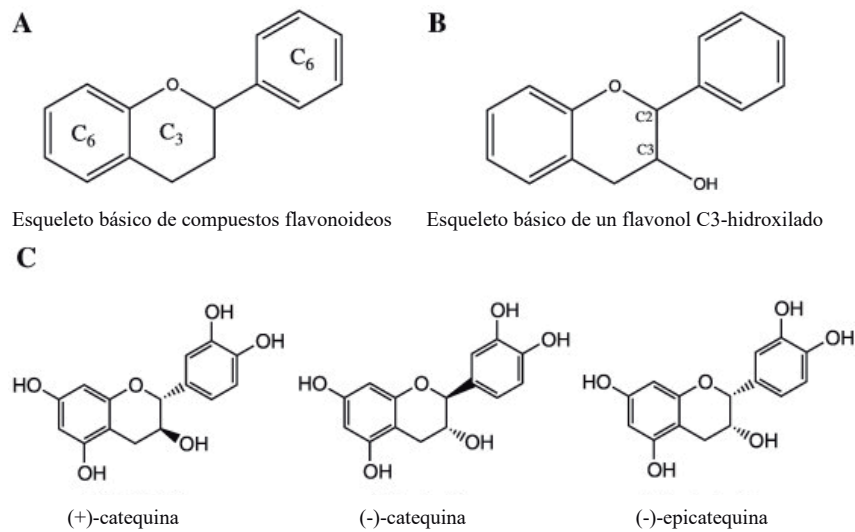


Figura 9. (A) Esqueleto básico de los compuestos flavonoideos de 3 anillos, (B) esqueleto básico de un flavonol C3-hidroxiado y, (C) estructuras de los monómeros de flavanol existentes en las uvas.

1.3.1.2. Compuestos no flavonoideos

Los compuestos no flavonoideos incluyen distintas subclases de fenoles de relevancia en las uvas y en los vinos, siendo los más importantes los ácidos fenólicos, como son los ácidos hidroxicinámicos, los hidroxibenzoicos y, además, los estilbenos. Los ácidos hidroxicinámicos y estilbenos se encuentran en las uvas, mientras que los ácidos hidroxibenzoicos se encuentran en la uva y en la madera de roble usada para el proceso de crianza del vino (Waterhouse et al., 2016).

1.3.1.2.1 Ácidos hidroxicinámicos

Los ácidos hidroxicinámicos incluyen ácidos fenólicos no flavonoideos formados por un anillo aromático, un grupo alifático y un ácido carboxílico en el extremo, los cuales se sintetizan a partir de precursores de la fenilalanina a través de la ruta del ácido shikímico (Taiz y Zeiger, 2010). Los ácidos cumárico, cafeico y ferúlico son los ácidos hidroxicinámicos más abundantes

en la naturaleza (Taiz y Zeiger, 2010). Estos compuestos están presentes en la uva sólo como ésteres de ácido tartárico, encontrándose en el hollejo y en la pulpa de las bayas, pudiendo también estar esterificados con etanol (Waterhouse et al., 2016). El ácido cafeico se diferencia de los demás ácidos hidroxicinámicos por poseer un grupo *O*-hidroxilo (Figura 10), lo que le hace propenso a la oxidación enzimática por efecto de las enzimas fenol oxidasas y del oxígeno (Oliveira et al., 2011).

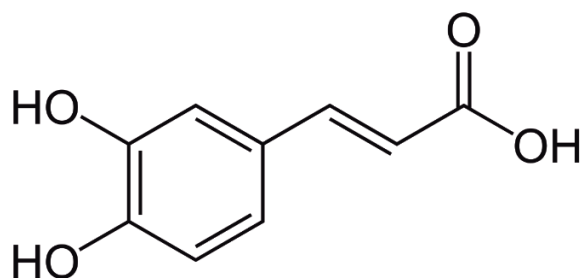


Figura 10. Estructura del ácido cafeico.

1.3.1.2.2. Ácidos hidroxibenzoicos

Los ácidos hidroxibenzoicos son compuestos que presentan un grupo carboxílico (grupo ácido) y grupos hidroxilo en un anillo aromático (Figura 11). Dentro de los ácidos hidroxibenzoicos, el ácido gálico es uno de los mayoritarios y se encuentra principalmente en los vinos y no en las uvas, ya que se produce a partir de la hidrólisis de ésteres de galato que se encuentran en los taninos condensados e hidrolizables (Fanzone et al., 2010; Ma et al., 2014). La concentración del ácido gálico en los vinos puede variar entre 10 y 70 mg/L (Waterhouse et al., 2016). Durante el envejecimiento del vino la concentración de este ácido no varía, por lo que, en los vinos envejecidos, se puede encontrar en importantes cantidades comparado a los antocianos, flavonoles y flavanoles monoméricos (Waterhouse et al., 2016). Otros ácidos hidroxibenzoicos

que pueden ser encontrados en los vinos en cantidades bajas son el ácido siríngico, el protocatéquico y el vanílico.

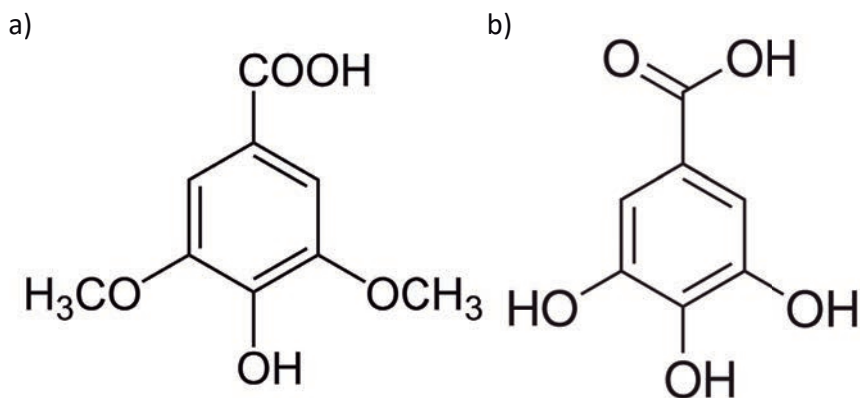


Figura 11. Estructura del a) ácido siríngico y b) ácido gálico.

1.3.1.2.3. Estilbenos

Los estilbenos son una clase diversa de compuestos fenólicos con la forma estructural general C₆-C₂-C₆ (Figura 12). Son fitoalexinas que se sintetizan en respuesta a condiciones de estrés tanto abiótico como biótico en las plantas, en especial por afección de enfermedades criptogámicas y la exposición a la radiación UV (Flamini et al., 2013; Waterhouse et al., 2016). Los principales estilbenos encontrados en las uvas son *cis* y *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno), resveratrol-3-*O*- β -D-glucopiranosido (piceido), piceatanol (3,4,3',5'-tetrahidroxi-*trans*-estilbeno) y dímeros de resveratrol (viniferinas) (Bavaresco et al., 2002; Vitrac et al., 2005; Flamini et al., 2013). La glucosilación de los estilbenos permite el almacenamiento, la translocación, la modulación de la actividad antifúngica y la protección contra la degradación oxidativa (Flamini et al., 2013).

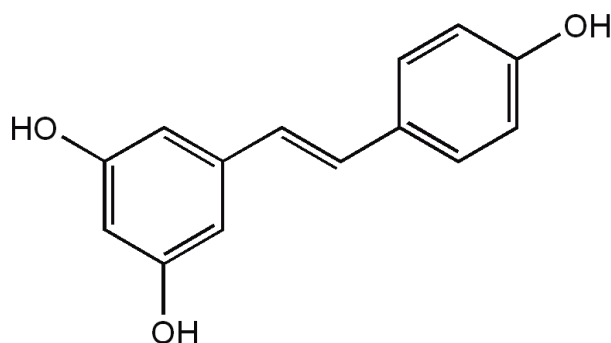


Figura 12. Estructura general de los estilbenos.

1.3.2. Biosíntesis de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se sintetizan a partir de la fenilalanina a través de la ruta de los fenilpropanoides (Sparvoli et al., 1994; Flamini et al., 2013). La fenilalanina es a su vez un producto de la ruta del ácido shikímico, que relaciona el metabolismo de los carbohidratos con la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y otros metabolitos secundarios (Flamini et al., 2013). La enzima UDP-glucosa: flavonoideo 3-*O*-glucosil transferasa (UFGT) cataliza la glucosilación tanto de antocianidinas como de flavonoles (Ford et al., 1998). En las uvas tintas, la acumulación de antocianos comienza en el envero, junto con la activación de la enzima UFGT (Downey et al., 2006). En primer lugar, solo se acumulan glucósidos de los antocianos dihidroxilados, tales como la cianidina y la peonidina, seguido de los antocianos trihidroxilados, tales como la delphinidina, la petunidina y la malvidina (Downey et al., 2006). Los antocianos acilados están presentes en la mayoría de las uvas tintas, probablemente debido a la presencia exclusiva de la enzima antociano aciltransferasa (AAT). Estos antocianos se sintetizan en el citoplasma y se acumulan en las vacuolas, en donde se almacenan como coalescencias coloreadas llamadas inclusiones vacuolares antociánicas (Flamini et al., 2013). La ruta de los fenilpropanoides generalmente culmina con la síntesis de antocianos, sin embargo, de esta vía se producen una variedad de otros compuestos fenólicos, como los ácidos hidroxicinámicos, los estilbenos, la lignina, el lignano, las auronas, las

flavonas y, los isoflavonoides, así como también los flavonoideos, que como ya se ha comentado, incluyen los flavonoles y los flavanoles (Downey et al., 2006).

Los flavonoles están presentes solo en los hollejos de las uvas y no han sido detectados en las pepitas o en la pulpa de las uvas (Downey et al., 2003a, 2006). También están presentes en los brotes, los zarcillos, las inflorescencias, las anteras y las hojas (Downey et al., 2003a). La síntesis de flavonoles se relaciona con la expresión de genes que codifican la enzima flavonol sintasa (FLS), la cual se activa en dos períodos claves en las uvas, el primero alrededor de la floración y el segundo durante la maduración de las bayas (Downey et al., 2003a).

La síntesis de flavanoles en las pepitas ocurre después de la fructificación y alcanza su nivel máximo cerca del envero, mientras que el contenido de los flavanoles del hollejo, tal como el de los flavonoles, es alto en la floración y su acumulación continúa desde la cuaja hasta una o dos semanas después del envero (Kennedy et al., 2001, Downey et al., 2003b, Bogs et al., 2005; Downey et al., 2006). La mayor parte de los flavanoles están presentes como polímeros de proantocianidina, sin embargo, su composición difiere entre las pepitas y los hollejos, ya que las pepitas tienen polímeros más cortos, por lo que presentan cantidades similares de subunidades de catequina y epicatequina, mientras que, en los hollejos, los polímeros de proantocianidina tienden a ser mucho más largos, estando compuestos principalmente por subunidades de epicatequina (Kennedy et al., 2001, Downey et al., 2003b). Se ha observado que el nivel de taninos extraíbles disminuye, tanto en las pepitas como en el hollejo, entre el envero y la vendimia, dando lugar a una disminución del amargor y de la astringencia de las bayas (Downey et al., 2003b).

Los no flavonoideos se encuentran en todas las plantas superiores, pero solo unas pocas especies producen estilbenos (Flamini et al., 2013). La estilbeno sintasa (STS) y la chalcona sintasa (CHS) son enzimas estrechamente relacionadas que controlan específicamente la biosíntesis de los

compuestos flavonoideos y/o estilbenos (Flamini et al., 2013). Se ha observado que la CHS puede competir con la STS por la biosíntesis de compuestos fenólicos. Así, la disminución de la capacidad de las uvas para sintetizar estilbenos en respuesta a la radiación UV observada después del inicio de la maduración de la uva, puede ser una consecuencia del aumento concomitante de la acumulación de antocianos en las uvas (Jeandet et al., 1995). Por lo que, la CHS puede competir con la STS, disminuyendo la capacidad de sintetizar resveratrol en respuesta a la radiación UV como consecuencia de un aumento en la biosíntesis de antocianos ocurrida en enero.

1.3.3. Factores que influyen en el contenido de los compuestos fenólicos en uvas y vinos

Los factores ambientales que más influyen en la síntesis de compuestos fenólicos en la uva son la radiación y la temperatura (Teixeira et al., 2013a). Las vides que crecen en sitios cálidos, producen uvas con un alto contenido de sólidos solubles y de ciertos compuestos fenólicos tales como antocianos y flavonoles, mientras que las vides que crecen en sitios más frescos, producen uvas con un mayor contenido de flavanoles y de ácidos hidroxicinámicos (Martínez-Gil et al., 2018; Gutiérrez-Gamboa y Moreno-Simunovic, 2019). En climas más cálidos, una mayor exposición a la radiación puede aumentar la síntesis de antocianos, de flavonoles y de flavanoles en las uvas debido a una mayor actividad de la enzima fenilalanina amonio liasa (Roubelakis-Angelakis y Kliewer, 1986). Sin embargo, temperaturas por encima de 35 °C producen un aumento de la respiración y una disminución de la fotosíntesis en las vides, lo que da lugar a una merma en la producción de azúcares y a la degradación e inhibición de la acumulación de ciertos metabolitos secundarios, en especial de antocianos (He et al., 2010b). Por otro lado, se ha demostrado que niveles altos de radiación UV-B aumentan la acumulación de antocianos, el índice de polifenoles totales y el contenido de estilbenos en el hollejo de la uva (Berli et al., 2008). Asimismo, la

exposición a la radiación UV induce la acumulación de estilbenos en las uvas a través de la inducción de la expresión de la enzima STS (Petit et al., 2009).

Por otro lado, el suelo es un factor clave que puede afectar a la disponibilidad de agua para la planta y de esta forma afectar el contenido y acumulación de los compuestos fenólicos en la uva. En este sentido, los suelos poco profundos limitan la capacidad de retención de agua y, por tanto, la absorción de agua por parte de las vides, reduciendo su vigor, el peso de las bayas, y aumentando la concentración de antocianos y de taninos de las bayas (Duteau et al., 1981; Matthews y Anderson, 1988, 1989; van Leeuwen y Seguin, 1994, 2006; Ojeda et al., 2002; van Leeuwen, 2010). Se ha demostrado también que las vides que poseen un bajo vigor presentan bayas con un mayor contenido de proantocianidinas en el hollejo, así como también de la proporción de las subunidades de epigallocatequina en comparación con el hollejo de las uvas cosechadas de vides que presentan un vigor alto (Cortell et al., 2005; Downey et al., 2006).

Otro factor importante es el riego ya que permite manipular la disponibilidad de agua para las vides afectando considerablemente la síntesis de compuestos fenólicos en las uvas y en los vinos (Koundouras et al., 2006). Diversos estudios han mostrado que el riego deficitario controlado tiene un efecto positivo en la síntesis de compuestos fenólicos en las uvas, en especial de antocianos, debido principalmente a la limitación del crecimiento vegetativo de las vides y al incremento de la relación hollejo/pulpa de la uva (Ojeda et al., 2002; Koundouras et al., 2006; Chaves et al., 2007; Intrigliolo y Castel, 2011). No obstante, estos cambios dependen en gran medida del genotipo (variedad), las interacciones ambientales (condiciones edafoclimáticas) y las prácticas vitícolas (Teixeira et al., 2013a). En la variedad Chardonnay, el estrés hídrico aumenta el contenido de flavonoles y disminuye la expresión de genes implicados en la biosíntesis de precursores de estilbenos en las uvas (Deluc et al., 2011). Sin embargo, estos cambios no fueron

percibidos en la variedad Cabernet Sauvignon (Deluc et al., 2011). Asimismo, Savoi et al. (2016) mostraron que el estrés abiótico prolongado en vides de la variedad Sauvignon Vert puede activar el metabolismo de la ruta de los fenilpropanoides. Por otro lado, el déficit hídrico aumenta la actividad de los genes involucrados en el mecanismo de la STS (Teixiera et al., 2013a). Sin embargo, se han observado efectos contradictorios sobre el efecto del déficit hídrico en las vides en la síntesis de estilbenos en las uvas (Vezzuli et al., 2007; Deluc et al., 2011).

Durante los últimos años, el estudio de la aplicación foliar de jasmonato de metilo (MeJ) a las vides se ha incrementado debido a sus efectos positivos en el contenido de compuestos fenólicos de la uva y del vino (Ruiz-García y Gómez-Plaza, 2013; Vezzulli et al., 2007; Ruiz-García et al., 2014; Portu et al., 2016, 2017a; Gil-Muñoz et al., 2017a, 2017b; Gutiérrez-Gamboa et al., 2017b, 2019a; D'Onofrio et al., 2018; Paladines-Quezada et al., 2019). La aplicación de elicitores en viticultura principalmente de jasmonatos, induce la activación de enzimas involucradas en la síntesis de los compuestos fenólicos (Delaunois et al., 2013). Se ha demostrado que la aplicación foliar de este tratamiento a las vides de Tempranillo aumentó el contenido de antocianos y de estilbenos en las uvas y en los vinos, mejorando la concentración de flavonoles en los vinos (Portu et al., 2015b). La concentración de *trans*-piceido aumentó en todas las muestras después de la aplicación foliar de MeJ a las vides (Portu et al., 2015b). Sin embargo, el efecto de estas aplicaciones en el contenido de compuestos fenólicos de la uva depende de la respuesta de la variedad y de las condiciones climáticas de la añada (Gil-Muñoz et al., 2017b). En este sentido, Paladines-Quezada et al. (2019) indicaron que la aplicación de MeJ a las vides Monastrell, Merlot y Cabernet Sauvignon causó cambios significativos en varios componentes estructurales de las paredes celulares del hollejo de la uva, tales como compuestos fenólicos, proteínas y azúcares. Así, la aplicación de MeJ a las vides aumentó el contenido de proteínas y de fenoles en la pared celular

de los hollejos de las bayas de las variedades Monastrell y Cabernet Sauvignon, mientras que en Merlot tuvo un efecto opuesto.

Por otro lado, durante los dos a tres primeros días de inicio de la fermentación alcohólica, el contenido de antocianos y la densidad de color aumentan de forma significativa en el mosto (Oberholster, 2003). Sin embargo, la fermentación maloláctica causa una disminución considerable del contenido de antocianos acilados y no acilados, de la intensidad colorante, del contenido de monómeros de flavanoles y de su contenido total, así como del porcentaje de galoilación de los taninos en el vino, mientras que el contenido de piranoantocianos y el porcentaje de prodelphinidinas aumenta en los vinos debido al efecto de la fermentación maloláctica (Izquierdo-Cañas et al., 2016).

También, la temperatura en que se lleve a cabo la maceración pre-fermentativa afecta en gran medida a la transferencia de polifenoles de los hollejos al mosto, con un aumento en la extracción de color al aumentar la temperatura (Oberholster, 2003; Salinas et al., 2005). La temperatura de fermentación alcohólica también afecta la extracción de los compuestos fenólicos al mosto y se ha determinado que temperaturas de fermentación entre 15 a 25 °C permiten una mayor extracción de antocianos, de flavonoles, de ácidos hidroxicinámicos, de proantocianidinas y de estilbenos, teniendo además un efecto positivo en las características cromáticas del vino (Gao et al., 1997; Liu et al., 2018; Pérez-Navarro et al., 2018).

Además, los agentes clarificantes del vino como la polivinilpirrolidona (PVPP), la bentonita o la gelatina reducen el contenido de los compuestos fenólicos del vino, causando la remoción de los flavanoles, alterando el color y las características sensoriales de los vinos, en especial de su astringencia (Oberholster, 2003). Los taninos polimerizados y galoilados son precipitados de forma selectiva por la gelatina, mientras que el PVPP se une a los compuestos

fenólicos de menor peso molecular causando su precipitación (Sims et al., 1995; Maury et al., 2001). Se ha demostrado también que los vinos clarificados con bentonita y gelatina poseen concentraciones más bajas de antocianos y de ácidos hidroxicinámicos, mientras el contenido de flavanoles no se ve afectado por el efecto de estos clarificantes (Gómez-Plaza et al., 2000).

La micro-oxigenación es una técnica que permite manipular la composición fenólica de los vinos mejorando la estabilización del color, disminuyendo los aromas vegetativos y suavizando el carácter astringente de los taninos (Parish et al., 2000). En general, los vinos micro-oxigenados poseen mayor porcentaje de pigmentos derivados de los antocianos y mayor intensidad colorante respecto a los vinos que no reciben micro-oxigenación o que estuvieron expuestos a niveles de sobre-oxigenación (Cano-López et al., 2008; Rubio-Bretón et al., 2018a). Se ha demostrado también, que la micro-oxigenación durante tres meses produce vinos con un bajo contenido de antocianos monoméricos y una alta concentración de vitisinas en comparación a vinos sin micro-oxigenación y criados en roble (Cano-López et al., 2010). Por otro lado, los vinos en contacto con madera de roble muestran un color más estable que los vinos micro-oxigenados a los seis meses de envejecimiento en botella (Cano-López et al., 2010).

El uso de madera de roble para la crianza de vinos es una práctica enológica común que permite mejorar la estabilidad fenólica y la complejidad aromática de los vinos (Zhang et al., 2015). Las barricas, duelas, chips o virutas de madera de roble se usan comúnmente en enología para la crianza de los vinos (Martínez-Gil et al., 2019). Durante este proceso se genera la liberación de taninos, de ácidos fenólicos y de compuestos volátiles de la madera al vino, lo que va modificando las características sensoriales de los vinos (Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2006). Se ha observado una importante disminución del contenido de antocianos y de catequinas en los vinos envejecidos en presencia de chips de madera de roble probablemente debido a los

procesos de polimerización, de condensación y de precipitación que se generan por la adición de estos compuestos al vino (del Alamo et al., 2008). Entre los productos de madera de roble usados para la crianza de los vinos, se ha demostrado que los vinos en contacto con duelas presentan un mayor contenido de ácido vanílico y una mayor intensidad colorante, mientras que los vinos en contacto con barricas de roble muestran altos contenidos de elagitaninos y de galato de etilo (Laqui-Estaña et al., 2019).

1.3.4. Implicación de los compuestos fenólicos en la calidad del vino

Los antocianos presentes en el vino existen en diversas formas dependiendo de su pH, lo que afecta fuertemente al color del vino. El anillo C con carga positiva del catión flavilio es electrófilo, y las posiciones C2 y C4 pueden reaccionar con los nucleófilos presentes en el vino (Waterhouse et al., 2016). Las reacciones más comunes de los antocianos son con el agua y con el bisulfito; en ambos casos, el color rojo de la forma flavilio cambia debido a la pérdida de la conjugación del doble enlace (Waterhouse et al., 2016). Los antocianos pueden formar interacciones de tipo no covalente con otros compuestos fenólicos en la disolución creando un efecto denominado copigmentación (Waterhouse et al., 2016). La copigmentación consiste en la formación de un complejo de estequiometría 1:1, en el que un pigmento se apila con un copigmento, estableciéndose interacciones débiles entre las nubes electrónicas de los anillos aromáticos de ambos (Hermosín-Gutiérrez, 2007). La formación de este tipo de complejos provoca un efecto hiperocrómico, es decir, un incremento de la intensidad del color rojo y un efecto batocrómico, por tanto, un viraje hacia tonalidades más azuladas del color rojo del vino tinto (Hermosín-Gutiérrez, 2007). Las reacciones de copigmentación permiten estabilizar el color de

los vinos y son responsables de la mitad de la intensidad del color de los vinos tintos jóvenes (Boulton, 2001).

Durante el envejecimiento, los vinos van perdiendo su intensidad colorante, y su tonalidad vira desde el color rojo-púrpura hacia el color rojo-anaranjado, adquiriendo una mayor estabilidad ante cambios del pH (Basalekou et al., 2017; de Freitas et al., 2017). De forma paralela, las reacciones de copigmentación van disminuyendo y sus efectos hipercrómicos y batocrómicos en el color resultan inapreciables a medida que el vino envejece (Hermosín-Gutiérrez, 2007). Los antocianos reaccionan con varios compuestos del vino, en especial flavanoles, para formar pigmentos poliméricos que permiten la estabilización del color de los vinos tintos durante su envejecimiento (Hermosín-Gutiérrez, 2007; Waterhouse et al., 2016; de Freitas et al., 2017; Picariello et al., 2017).

Los flavonoles también juegan un papel importante en la copigmentación del vino junto con los antocianos y, además, se consideran compuestos bioactivos para la salud y la nutrición humana (Flamini et al., 2013). La concentración de los flavonoles en los vinos depende considerablemente de su extracción desde el hollejo de las uvas, por lo que los vinos blancos poseen un menor contenido de flavonoles que los vinos tintos (Waterhouse et al., 2016).

Los flavanoles pueden estar unidos al ácido gálico produciendo taninos galoilados (Waterhouse et al., 2016). El nivel de astringencia y de amargor que aporta un tanino condensado al vino está determinado por su grado de galoilación, pero, en mayor medida, por su grado de polimerización. Así, a mayor grado de polimerización y menor grado de galoilación el tanino es menos astringente y amargo (Fontoin et al., 2008). La composición de las moléculas de tanino en el vino también es importante porque los taninos de masa molecular más pequeña, principalmente los provenientes de las pepitas, son percibidos como amargos y, las moléculas de tanino más

grandes, provenientes de los hollejos, se perciben como más astringentes (Fontoin et al., 2008). Por otro lado, el grado de galoilación disminuye con el periodo de maduración, produciendo cambios en la tonalidad del color virando gradualmente el tono púrpura de un vino joven a un color rojo ladrillo, lo que va acompañado de una reducción en la astringencia (Smith et al., 2015).

Los ácidos hidroxicinámicos son los compuestos fenólicos más abundantes en los mostos y en los vinos blancos (Waterhouse et al., 2016). Estos compuestos se oxidan enzimáticamente durante el prensado de la uva y son propensos a iniciar fenómenos de pardeamiento enzimático en los mostos bajo condiciones de alto nivel de oxígeno y de luz (Kritzinger et al., 2013). Durante la fermentación del vino, los ésteres de ácido tartárico pueden hidrolizarse liberando los ácidos hidroxicinámicos (Waterhouse et al., 2016). Los vinos con alto nivel de estos compuestos pueden ser más susceptibles al deterioro microbiano ya que las formas *trans* de los ácidos hidroxicinámicos pueden descarboxilarse por la actividad de ciertos microorganismos para producir vinilfenoles volátiles cuya característica es proporcionar aromas descritos como “ahumados” y “medicinales” en los vinos (Chatonnet et al., 1992; Silva et al., 2011; Steensels et al., 2015). En este sentido, a partir de la actividad microbiológica, el ácido ferúlico se puede descarboxilar formando 4-vinilguayacol (4-VG), mientras que el ácido cumárico se descarboxila formando 4-vinilfenol (4-VF). Desde un punto de vista sensorial, se ha demostrado que los ácidos hidroxicinámicos pueden contribuir a caracteres de amargor y de astringencia en los vinos, y que los ácidos fenólicos se caracterizan por ser más astringentes que amargos en comparación a la mayoría de los compuestos fenólicos (Hufnagel y Hofmann, 2008; Ferrer-Gallego et al., 2014).

Respecto a los ácidos hidroxibenzoicos, se ha observado que el ácido siríngico puede ser un importante cofactor de fenómenos de copigmentación en disoluciones modelo de vinos tintos con los antocianos, en comparación al ácido *p*-hidroxibenzoico, el ácido protocatéuico, el ácido

gálico y el ácido vanílico (Zhang et al., 2015). De manera similar a los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos hidroxibenzoicos también son susceptibles a procesos de oxidación (Waterhouse et al., 2016).

Los estilbenos presentan una alta actividad antioxidante y varios estudios han demostrado que el resveratrol presenta una gran influencia sobre la salud ya que posee actividad anticancerígena, antioxidante y antiinflamatoria, confiriendo además propiedades de cardioprotección e inhibiendo la agregación plaquetaria (Frankel et al., 1993; Hung et al., 2000; Bavaresco et al., 2012; Flamini et al., 2013; Fraga et al., 2019; Giovinazzo et al., 2019).

1.3.4.1. Efectos de los compuestos fenólicos en la salud

Durante la última década, el estudio de la composición fenólica está aumentando debido a su importancia en la protección contra el desarrollo de cánceres, enfermedades cardiovasculares, diabetes, osteoporosis y enfermedades neurodegenerativas (Hasan y Bae, 2017). En este sentido, el consumo de flavonoles se ha relacionado con efectos protectores contra varios tipos de cáncer específicos, tales como la leucemia, el cáncer de páncreas, los de mama, el de cuello uterino, el de próstata, el de útero y el de las vías urinarias (Pandey y Rizvi, 2009). Por su parte, los estilbenos pueden ejercer un gran potencial antiinflamatorio y cardioprotector al inhibir la expresión de mediadores antiinflamatorios (Pandey y Rizvi, 2009; Giovinazzo et al., 2019). El consumo del flavanol catequina, presenta muchas propiedades beneficiosas para la salud como anticancerígeno, anti-obesidad, antidiabético, cardiovascular, antiinfeccioso, hepatoprotector y neuroprotector (Isemura, 2019). Estos resultados remarcan la importancia de la aplicación de nuevas técnicas productivas que permitan enriquecer la uva y el vino de moléculas saludables a lo largo de la

producción vitícola y enológica con el objetivo de entregar un producto diferenciado y saludable para los consumidores (Giovinazzo et al., 2019).

1.4. Compuestos nitrogenados

1.4.1. Los aminoácidos y el amonio

Dentro de los compuestos nitrogenados, los aminoácidos y el amonio tienen una gran influencia en el crecimiento de la vid y en la vinificación. Los aminoácidos están compuestos por dos grupos funcionales: un grupo amino ($-NH_2$) y un grupo carboxilo ($-COOH$) unidos a una cadena lateral o radical R (Figura 13).

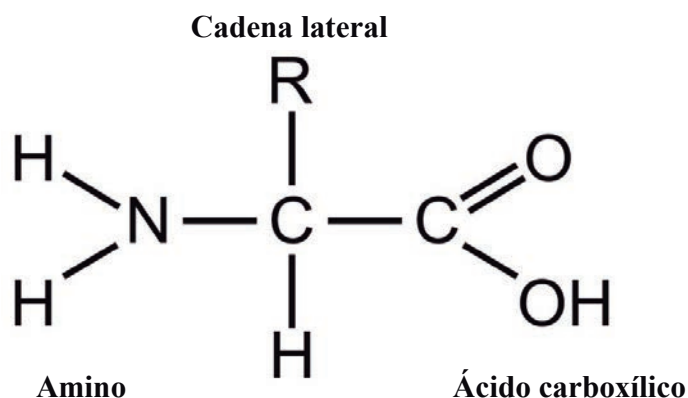


Figura 13. Estructura general de un aminoácido.

La síntesis de los aminoácidos se realiza por cinco vías metabólicas principales, las cuales están determinadas en función del precursor del cual derivan (Tabla 1). En este sentido, los aminoácidos derivados del piruvato son la alanina (Ala), la leucina (Leu) y la valina (Val), mientras que los aminoácidos derivados del oxalacetato son la asparagina (Asn), el ácido aspártico (Asp), la isoleucina (Ile), la lisina (Lys) la metionina (Met), y la treonina (Thr). Los aminoácidos

derivados del α -cetoglutarato son el ácido glutámico (Glu), la arginina (Arg), la glutamina (Gln), la hidroxiprolina (HoPro) y la prolina (Pro), mientras que la ruta del ácido shikímico da lugar a la síntesis de los comúnmente denominados aminoácidos aromáticos, que son la fenilalanina (Phe), el triptófano (Trp) y la tirosina (Tyr). La histidina (His) es el único aminoácido derivado de la ribosa-5-fosfato sintetizándose a partir de la vía de las pentosas fosfato, mientras que la cisteína (Cys), la glicina (Gly) y la serina (Ser) derivan del 3-fosfoglicerato, que funciona como intermediario en la glucólisis y el ciclo de Calvin.

Tabla 1. Principales rutas metabólicas de síntesis de los diversos aminoácidos.

Aminoácidos	Ruta metabólica
Ala, Leu y Val	Metabolismo del piruvato
Asn, Asp, Ile, Lys, Met y Thr	Metabolismo del oxalacetato
Arg, Glu, Gln, HoPro y Pro	Metabolismo del ácido α -cetoglutárico
Phe, Trp y Tyr	Ruta del ácido shikímico
His	Ruta de las pentosas fosfato
Cys, Gly y Ser	Ciclo de Calvin y glucólisis

1.4.2. Biosíntesis de compuestos nitrogenados

Los compuestos nitrogenados de las uvas incluyen el amonio y compuestos orgánicos nitrogenados, tales como los aminoácidos, las aminas biógenas, los péptidos, los ácidos nucleicos y las proteínas (Cosme et al., 2016). A medida que la uva madura, el nitrógeno orgánico se acumula progresivamente, mientras que el contenido de amoníaco disminuye ligeramente (Cosme et al., 2016). La síntesis de los aminoácidos, los péptidos y las proteínas ocurre durante las últimas seis u ocho semanas de maduración de la uva (Cosme et al., 2016). La glutamina es el principal compuesto de transporte de nitrógeno (Schaller et al., 1985; Keller, 2015). Las enzimas aminotransferasas convierten la glutamina de la uva en los demás aminoácidos, de éstos, la arginina y la prolina juntas representan entre el 60 y el 80% de los aminoácidos libres presentes en

las uvas maduras (Stines et al., 2000; Bell y Henschke, 2005; Keller, 2015). Sin embargo, pueden existir marcadas diferencias en la composición de los aminoácidos entre las variedades de uva vinífera (Stines et al., 2000; Bell y Henschke, 2005). En este sentido, la mayor parte de la acumulación de prolina en las uvas se produce al final de su maduración, cerca de las cuatro semanas después del envero (Stines et al., 2000). Por el contrario, la acumulación de arginina comienza antes del envero y continua hasta la madurez, excluyendo las variedades acumuladoras de prolina (Stines et al., 2000; Bell y Henschke, 2005). La prolina es sintetizada en los tejidos vegetales para proteger las células del estrés osmótico excesivo; así, la acumulación de prolina durante la maduración podría estar relacionada con la presión osmótica causada por la acumulación de azúcares de hexosa (Gomes et al., 2010; Chun et al., 2018). La acumulación de prolina también podría contribuir al aumento del pH del mosto porque su producción a partir de glutamato puede implicar la liberación de hidróxido (Smith y Raven, 1979). Además de la prolina, ciertas proteínas como las quitinasas y las taumatinas también se acumulan después del envero y continúan acumulándose durante la maduración. Esta acumulación se produce, probablemente, en respuesta al estrés osmótico derivado del aumento de la concentración de azúcar, ocupando una fracción creciente de las proteínas totales de las bayas (Murphey et al., 1989; Salzman et al., 1998; Giribaldi et al., 2007; Monteiro et al., 2007; Negri et al., 2008; Keller, 2015).

1.4.3. Factores que influyen en la composición nitrogenada de la uva y del vino

Las prácticas vitícolas y los procesos enológicos afectan considerablemente a la composición de nitrógeno de la uva, del mosto y del vino (Bell y Henschke, 2005; Gutiérrez-Gamboa, et al., 2019a, 2019b). Los factores más importantes que pueden modificar su contenido y composición son la variedad de uva, el grado de maduración de ésta, la fertilización nitrogenada

de las vides, la cepa de levadura usada para la fermentación alcohólica, entre otros (Stines et al., 2000; Valero et al., 2003; Garde-Cerdán et al., 2018a; Gutiérrez-Gamboa et al., 2019b).

Las condiciones climáticas del viñedo pueden afectar la síntesis de aminoácidos en la uva (Huang y Ough, 1989; Gutiérrez-Gamboa et al., 2018b). En este sentido, las vides que crecen en sitios frescos pueden prolongar su tiempo de maduración promoviendo la síntesis de aminoácidos en las uvas (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018b). Se ha demostrado que la síntesis de varios aminoácidos como la del Asp, la de la Arg, la del ácido γ -aminobutírico (GABA), la del Glu, la de la Ile, la de la Leu, la de la Met, la de la Phe, la del Trp, la de la Tyr y la de la Val se ve favorecida por la disminución de las temperaturas mínimas durante el mes anterior a la cosecha (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018b).

La arginina y la prolina generalmente constituyen la mayor proporción de la concentración total de aminoácidos presentes en las uvas y, su concentración, depende fundamentalmente de la variedad (Stines et al., 2000; Garde-Cerdán et al., 2014; Pérez-Álvarez et al., 2017a; Gutiérrez-Gamboa et al., 2018b). En este sentido, la ratio prolina/arginina refleja la proporción de nitrógeno no asimilable (prolina) a asimilable (arginina) por las levaduras, proporcionando un índice del valor nutricional del mosto de cada variedad en particular (Bell y Henschke, 2005). Así, las variedades de vid pueden clasificarse en categorías según su capacidad de acumular arginina o prolina. En este aspecto, dos variedades pueden tener la misma concentración total de aminoácidos, pero la variedad que acumula una mayor cantidad de prolina con relación a la arginina tendrá un nitrógeno fácilmente asimilable más bajo. Dentro de las variedades de uva vinífera, Chardonnay, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Cariñan, Merlot, Riesling, Semillon, Syrah, Tempranillo y Zinfandel tienen una alta relación prolina/arginina, mientras que otras, como Airén, Chenin Blanc, Garnacha, Gewürztraminer, Mencía, Montepulciano, Muscat Gordo, Pinot

Noir y Sauvignon Blanc poseen una baja relación prolina/arginina (Huang y Ough, 1989, 1991; Stines et al., 2000; Bell y Henschke, 2005; Garde-Cerdán et al., 2014, 2017a, 2018a; Bouzas-Cid et al., 2015, 2018a; Sánchez-Gómez et al., 2016; Gutiérrez-Gamboa et al., 2017b, 2017c 2018b). Sin embargo, esta relación está influenciada por el nivel de madurez de la uva, las prácticas vitícolas realizadas en el viñedo y las condiciones edafoclimáticas de cada sitio (Huang y Ough, 1989, 1991; Bell y Henschke, 2005; Garde-Cerdán et al., 2014; 2018a). Por ejemplo, en las etapas tempranas de maduración de la uva, la variedad Garnacha puede ser clasificada como una variedad acumuladora de arginina, sin embargo, hacia estadios más tardíos de madurez, esta variedad tiende a acumular una mayor cantidad de prolina que de arginina (Kliewer, 1970; Bell y Henschke, 2005). Además, se ha documentado que ciertas variedades como Sauvignon Blanc y Tempranillo pueden comportarse como acumuladoras de arginina o prolina dependiendo de las condiciones edafoclimáticas de cada sitio o añada (Huang y Ough, 1989, 1991; Garde-Cerdán et al., 2014; 2018b).

La adopción de portainjertos en viticultura también puede afectar al contenido de compuestos nitrogenados en la uva (Huang y Ough, 1989; Bell y Henschke, 2005; Gutiérrez-Gamboa et al., 2018b). En este sentido, se ha demostrado que los mostos de vides Chardonnay injertadas sobre portainjertos vigorosos como St. George, Harmony, SO4 y 5A presentaron altos contenidos de aminoácidos totales, mientras que los mostos de las vides de esta variedad injertados en portainjertos menos vigorosos como 110 R mostraron un contenido menor de aminoácidos totales (Huang y Ough, 1989). En otro informe, se ha mostrado que el portainjerto no afectó al contenido de aminoácidos de los mostos de las vides Cabernet Sauvignon, probablemente debido a que el suelo ya contenía altos niveles de nitrógeno, por lo que este elemento estaba fácilmente disponible para ser absorbido por el sistema radical (Huang y Ough, 1989). Por otro lado, las uvas

cosechadas de vides Carignan injertadas sobre raíces de la variedad Listán Prieto tendieron a presentar una menor concentración de aminoácidos que las uvas de vides Carignan sin injertar (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018b).

Las aplicaciones foliares de nitrógeno a las vides se han convertido en una estrategia importante para mejorar el contenido de aminoácidos y de amonio en los mostos en comparación con la fertilización de nitrógeno aplicada en el suelo debido a su rápida y eficiente asimilación por las hojas de las vides (Lacroux et al., 2008; Lasa et al., 2012; Garde-Cerdán et al., 2014; Hannam et al., 2016; Gutiérrez-Gamboa et al., 2017c). En este sentido, la urea ha sido una de las fuentes nitrogenadas más utilizadas que se han aplicado comercialmente en viticultura debido a su fácil solubilidad y bajo coste (Lasa et al., 2012). Se ha demostrado también que la aplicación de urea suplementada con azufre y de ciertos productos comerciales han permitido mejorar el contenido de aminoácidos en las uvas y en los vinos (Lacroux et al., 2008; Gutiérrez-Gamboa et al., 2017c; Kelly et al., 2017). La urea aplicada foliarmente incrementó la concentración de aminoácidos en los mostos de distintas variedades de vid, tales como Merlot, Sauvignon Blanc, Pinot Gris y Tempranillo (Lasa et al., 2012; Garde-Cerdán et al., 2014; Hannam et al., 2016). Sin embargo, la aplicación foliar de urea a las vides Cabernet Sauvignon apenas afectó el contenido de aminoácidos de la uva (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017c). Las diferencias en la efectividad de la aplicación de urea a las vides en el contenido de aminoácidos de la uva dependen de las necesidades de nitrógeno por las vides en el momento de la aplicación (Gutiérrez-Gamboa et al., 2019b). Por lo tanto, la aplicación foliar de urea a las vides permite aumentar el contenido de aminoácidos en las uvas de vides con altos requerimientos de nitrógeno, y no así en vides con bajos requerimientos de nitrógeno.

El uso de cubiertas vegetales en viñedos vigorosos puede reducir el crecimiento vegetativo excesivo de las vides mejorando la calidad de la uva (Pérez-Álvarez et al., 2013). El estudio de cubiertas vegetales en viticultura está en auge debido a sus efectos positivos en las características físicas, químicas y biológicas del suelo en comparación a la labranza convencional (Ghimire et al., 2014). El uso de cebada como cubierta vegetal puede conducir a una disminución de la disponibilidad de nitrato a lo largo de la temporada de crecimiento vegetativo en las vides en comparación con la labranza convencional (Pérez-Álvarez et al., 2013). Las vides manejadas bajo sistema de labranza convencional produjeron uva con una mayor concentración de varios aminoácidos, como Asp, Glu, Gly, Lys, Met, Pro, Ser, Thr, Trp y Tyr en comparación con las vides cultivadas con cubiertas vegetales (Pérez-Álvarez et al., 2015).

En la actualidad, el manejo de plagas y enfermedades en viticultura se lleva a cabo mayoritariamente mediante el uso de pesticidas sintéticos (Pertot et al., 2017). Se ha demostrado que la aplicación foliar de fungicidas a las vides disminuye la concentración de amonio y de aminoácidos en las uvas (Oliva et al., 2011). De esta manera, la aplicación de fungicidas sintéticos como la famoxadona, la fenhexamida y el quinoxifen disminuyeron la concentración en las uvas de varios aminoácidos, tales como Ala, Arg, Asp, Glu, His, Ile, Lys, Phe, Pro, Ser y Thr (Oliva et al., 2011).

Respecto a los efectos del déficit hídrico en las vides sobre el contenido de aminoácidos en las uvas, se ha evidenciado que las vides acumulan una alta cantidad de Pro en las uvas en respuesta al estrés hídrico (Canoura et al., 2018). En este sentido, se ha demostrado que el estrés hídrico provoca la expresión de genes que regulan la biosíntesis de Pro en vides (Haider et al., 2017). Por otro lado, Bouzas-Cid et al. (2018b) observaron que el riego no afecta a la concentración total de aminoácidos en los mostos, pero sí afecta al contenido de ciertos aminoácidos como Asn, Met,

Pro, Ser, Trp y Tyr. Sin embargo, estos autores sugieren que las diferencias obtenidas en el contenido de aminoácidos estaban más influenciadas por las condiciones climáticas de la añada que por el riego aplicado a las vides.

La adición de fosfato diamónico (DAP) en el mosto es una práctica común que se realiza en las bodegas para evitar problemas de parada o ralentizaciones de la fermentación alcohólica (Bisson y Butzke, 2000; Bell y Henschke, 2005). Arias-Gil et al. (2007) mostraron que las levaduras consumieron altas cantidades de Pro y bajas cantidades de Asp, Arg, Ala, Val, Met, Thr, Asn, Gly y Glu tras la adición de 113 mg N/L de DAP a los mostos. Por otro lado, estos autores mostraron que al añadir 45, 120 y 250 mg N/L de aminoácidos proteicos a los 113 mg N/L de DAP al mosto se mejoró la cinética de la fermentación alcohólica ya que todos los aminoácidos fácilmente asimilables por las levaduras fueron consumidos. Sin embargo, grandes cantidades de amonio en el mosto pueden resultar en vinos con mayores cantidades de nitrógeno residual, contribuyendo a un mayor riesgo de inestabilidad microbiológica y a la producción de carbamato de etilo y aminas biógenas, compuestos cancerígenos para la salud (Lonvaud- Funel, 2001; Hernández-Orte et al., 2008; Lorenzo et al., 2017; Pérez-Álvarez et al., 2017b).

Las levaduras comercializadas en el mercado del vino han sido seleccionadas por su capacidad para favorecer la producción de ciertos compuestos volátiles sobre otros, por lo que el uso de distintas cepas de levaduras puede afectar el contenido de aminoácidos del vino (Mandl et al., 2017). En este sentido, la concentración de varios aminoácidos en los vinos presentó variaciones muy amplias al usar distintas cepas de levaduras para realizar la fermentación alcohólica usando mostos con un mismo contenido inicial de nitrógeno (Mandl et al., 2017). Por otro lado, se ha observado que el contenido de aminoácidos del vino no se ve afectado

considerablemente por la fermentación maloláctica mientras que, durante el envejecimiento del vino con lías se produce la liberación de aminoácidos al vino (Alcaide-Hidalgo et al., 2007).

1.4.4. Implicación de los compuestos nitrogenados en la calidad del vino

En enología, las levaduras más importantes son las pertenecientes a la familia *Saccharomycetaceae* que contiene un gran número de especies del género *Saccharomyces* las cuales se inoculan en el mosto para facilitar su transformación en vino. Para la conversión del azúcar en etanol, las levaduras consumen preferentemente fuentes nitrogenadas simples tales como iones amonio (NH_4^+) y aminoácidos primarios. Sin embargo, los aminoácidos secundarios tales como prolina e hidroxiprolina no son metabolizados por las levaduras durante el proceso de fermentación alcohólica (Bell y Henschke, 2005). La fracción de nitrógeno utilizable por las levaduras a menudo se denomina nitrógeno fácilmente asimilable, el cual contempla el amonio y los aminoácidos, sin considerar los aminoácidos secundarios como la prolina e hidroxiprolina.

Durante el desarrollo de la fermentación alcohólica, las levaduras consumen preferencialmente ciertas fuentes nitrogenadas y su acumulación depende principalmente de la composición inicial de nitrógeno y de azúcar del mosto (Crépin et al., 2017). En general, las fuentes de nitrógeno que favorecen altas tasas de desarrollo microbiano son preferentemente asimiladas por las levaduras, como el amonio, el Glu y la Gln (Bell y Henschke, 2005; Garde-Cerdán et al., 2018a). En este sentido, los compuestos nitrogenados pueden clasificarse en distintos grados de asimilación por la levadura, la cual utiliza un mecanismo llamado represión catabólica nitrogenada (NCR), que limita la selección de buenas fuentes de nitrógeno mediante la expresión y degradación de sistemas de permeasas (ter Schure et al., 2000; Beltran et al., 2004; Lleixà et al., 2019). Ciertas fuentes nitrogenadas de fácil asimilación tales como el amonio, la Gln y la Asn pueden acumularse preferentemente sobre otras, como la Arg, la Ala, el Asp, el Glu y la Gly. Finalmente, cuando la

cantidad de nitrógeno disponible en el mosto es escasa, pueden ser consumidas ciertas fuentes de nitrógeno de menor preferencia, como la urea y la Pro (Bell y Henschke, 2005; Garde-Cerdán et al., 2018a; Parente et al., 2018). En este sentido, en condiciones de bajo (menor a 100 mg N/L) a moderado (de 250 a 350 mg N/L) contenido de nitrógeno fácilmente asimilable en los mostos, todas las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilable son acumuladas rápidamente por las levaduras produciendo cambios metabólicos, desde una condición de NCR hacia una de-represión, a medida que las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilable van agotándose en el medio (Ough et al., 1991; Jiranek et al., 1995; Beltran et al., 2004; Bell y Henschke, 2005). En condiciones de alto nitrógeno fácilmente asimilable (mayor a 600 mg N/L), cuando las fuentes de nitrógeno fácilmente asimilable (especialmente el amonio) no se agotan, la NCR prevalece durante todo el proceso de fermentación alcohólica y las fuentes más pobres de nitrógeno no son consumidas (Beltran et al., 2004; Bell y Henschke, 2005). En este sentido, Beltran et al. (2004) observaron que ciertas cepas de levaduras pueden consumir altos niveles de amonio en condiciones de alto nitrógeno fácilmente asimilable (1.200 mg N/L), mientras que el consumo de Asp, Glu y Gln fue bajo. Además, estos autores observaron que estas cepas de levadura inhibieron el consumo de Ala y Arg bajo las condiciones anteriormente expuestas. Sin embargo, la absorción de aminoácidos de cadena ramificada y aromáticos fue alta, debido a la expresión de permeasas específicas para estos aminoácidos (Beltran et al., 2004). Por otro lado, la levadura consume muy poca cantidad de Pro e HoPro durante el transcurso de la fermentación alcohólica, excepto durante las condiciones de de-represión de nitrógeno cuando hay oxígeno presente. Por lo tanto, con bajos a moderados contenidos de nitrógeno fácilmente asimilable en los mostos, la mayor parte de los aminoácidos son consumidos rápidamente por las levaduras, mientras que el exceso de nitrógeno se almacena en sus vacuolas (Bisson, 1991; Salmon, 1996; Bisson y Butzke, 2000; Vilanova et al., 2007).

Los compuestos nitrogenados, en especial los aminoácidos y el amonio afectan considerablemente a la cinética de fermentación alcohólica debido a su gran influencia en el crecimiento y en el desarrollo de las levaduras (Bell y Henschke, 2005). Los aminoácidos como Ala, Ile, Leu, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val son precursores de ciertos alcoholes superiores y ésteres a través de la acción enzimática de las levaduras, por lo que la formación de los compuestos volátiles contenidos en el vino también se ve afectada por el contenido inicial de aminoácidos que tiene el mosto (Martínez-Gil et al., 2012).

Ralentizaciones o paradas de fermentación debido a un bajo contenido de nitrógeno en el mosto da lugar a que organismos esporulados se establezcan en los vinos parcialmente fermentados (Bisson y Burzke, 2000; Bell y Henschke, 2005). Por lo tanto, se deben realizar labores preventivas y un diagnóstico preciso de la fermentación alcohólica para así evitar el deterioro del vino (Bisson y Burzke, 2000). En este sentido, la adición de DAP es una práctica común realizada en la bodega, ya que permite aumentar la tasa de fermentación alcohólica de los mostos, disminuyendo su duración (Butzke, 1998; Cramer et al., 2002; Sablayrolles, 2009). Sin embargo, la adición de DAP puede conducir a un aumento en el contenido de amonio, lo que provoca una mayor producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en comparación con los mostos de DAP no suplementados, contribuyendo a la formación de aromas indeseables, tales como huevo podrido y aguas residuales en los vinos (Butzke y Park, 2011). Por otro lado, durante el proceso de vinificación, una amplia gama de compuestos no volátiles se origina también a partir del metabolismo microbiano de los aminoácidos (Vincenzini et al., 2017). En este sentido, una alta concentración de nitrógeno condicionada por las adiciones de DAP en el mosto o por altas tasas de fertilización nitrogenada a las vides, puede dar lugar a un retraso en la captación de ciertos aminoácidos y a la excreción de urea por parte de las levaduras, lo que trae consigo un aumento en la producción de carbamato de

etilo y de aminos biógenas (Bell y Henschke, 2005; Coulon et al., 2006; Adams y van Vuuren, 2010; Vincenzini et al., 2017). El consumo de estos compuestos se ha asociado con riesgos potenciales para la salud humana (Capozzi et al., 2017).

1.5. Compuestos volátiles

El aroma es uno de los atributos sensoriales más importantes en los vinos, el cual está formado por una gran diversidad de compuestos volátiles, como son los terpenos, los C₁₃ norisoprenoides, los ésteres, los compuestos bencénicos, los tioles, los compuestos C₆ y los alcoholes, entre otros (Zalacain et al., 2007; González-Álvarez et al., 2011; Ganss et al., 2011; González-Barreiro et al., 2015).

1.5.1. Clasificación de compuestos volátiles

1.5.1.1. *Aroma varietal*

El aroma varietal también denominado como “aroma primario” es característico de cada variedad, otorgando principalmente un carácter afrutado a los vinos. Los terpenos y los C₁₃ norisoprenoides son los compuestos volátiles varietales más importantes que se encuentran en las uvas y, en general, persisten sin cambios en su contenido en los vinos (Crupi et al., 2010; González-Barreiro et al., 2015; Wu et al., 2016).

Los compuestos volátiles forman parte de los metabolitos secundarios de las vides y su síntesis en la uva depende de diversos factores, principalmente, la variedad de uva, las condiciones edafoclimáticas del viñedo, las prácticas vitícolas empleadas, el grado de maduración de la uva, entre otras (Vilanova et al., 2012; Alem et al., 2019; Garde-Cerdán et al., 2018c; Gutiérrez-Gamboa et al., 2019b).

Los terpenos son los compuestos varietales que más se han estudiado en las uvas (González-Barreiro et al., 2015). Son una amplia clase de compuestos orgánicos producidos por las plantas, siendo componentes principales de los aceites esenciales en ciertas especies de plantas y flores (Waterhouse et al., 2016). En este sentido, las variedades pueden clasificarse por su concentración de terpenos en amoscoteladas, cuya concentración de terpenos libres puede llegar a 6 mg/L; semi-amoscoteladas o no amoscoteladas cuya concentración de terpenos libres varía entre 1 y 4 mg/L y, variedades neutras, en que la concentración de terpenos libres es menor a 1 mg/L (Sánchez-Palomo et al., 2006; Emanuelli et al., 2010; de Torres et al., 2015; Waterhouse et al., 2016). Entre los terpenos más importantes presentes en las uvas y en los vinos se encuentran el linalol, el geraniol, el nerol, el citronelol y el α -terpineol, los cuales pueden ser importantes componentes del aroma del vino debido a su bajo umbral de percepción (Marais, 1983; Ilc et al., 2016). Los terpenos están presentes principalmente en el hollejo de las uvas como terpenos potencialmente volátiles unidos glucosídicamente o como terpenos libres volátiles no unidos (Marais, 1983; Doneva-Šapčeska et al., 2006). Los terpenos volátiles unidos glucosídicamente están presentes en una concentración de dos a ocho veces más que los terpenos libres volátiles (Girard et al., 2002; Waterhouse et al., 2016). Los terpenos unidos glucosídicamente no contribuyen al aroma del vino hasta que se hidrolizan, lo que ocurre en presencia de ácidos o enzimas que están presentes de forma natural o suplementados exógenamente en el mosto (Michlmayr et al., 2012).

Los C₁₃ norisoprenoides derivan de la biodegradación de carotenoides como el β -caroteno y la luteína (Figura 14), y proporcionan a los vinos atributos florales y afrutados (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018c). Los C₁₃ norisoprenoides más importantes que están presentes en la uva y el vino son la β -damascenona, el 1,1,6,-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN), el vitispirano y la β -

ionona (Mendes-Pinto, 2009). Estos compuestos contribuyen significativamente al aroma varietal de ciertas variedades de vid como son la Chardonnay, la Chenin Blanc, la Semillon, la Sauvignon Blanc, la Cabernet Sauvignon y la Syrah (Bindon et al., 2007; González-Barreiro et al., 2015).

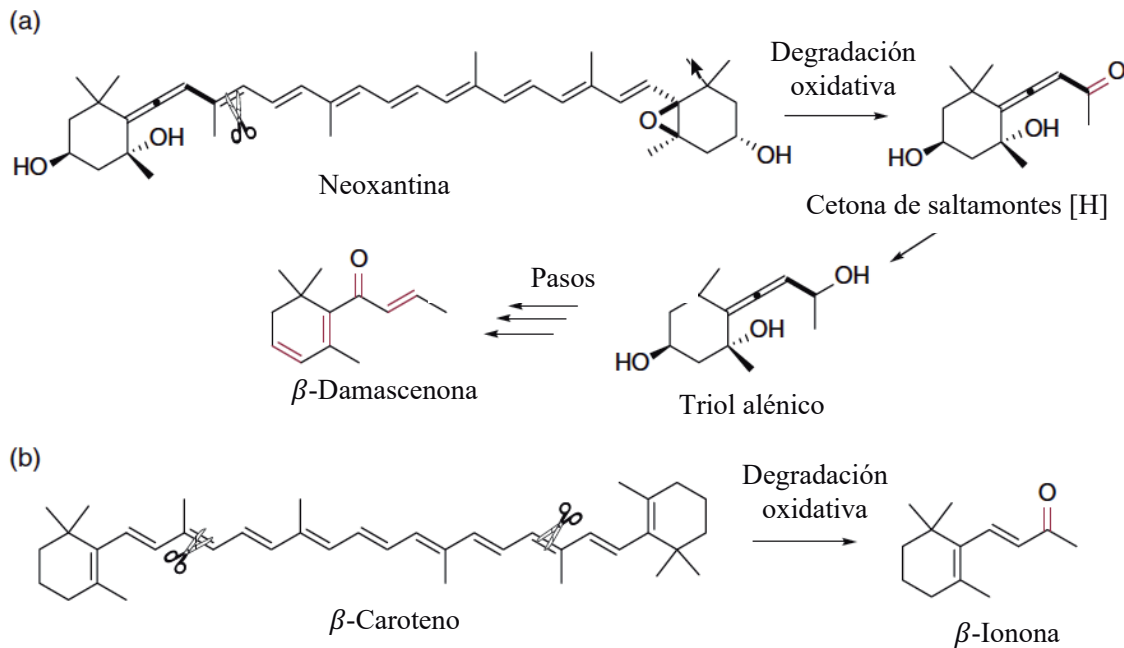


Figura 14. Formación de compuestos C₁₃ norisoprenoides a través de la degradación oxidativa de los carotenoides (a) neoxantina para formar β -damascenona después de su reducción (designada como [H]) e hidrólisis catalizada por ácido y (b) β -caroteno para dar dos moléculas de β -ionona.

Los compuestos C₆ también forman parte del aroma varietal de la uva y su contenido es abundante en diversas variedades aromáticamente neutras. Generalmente, los compuestos C₆ están ausentes en las bayas y otros tejidos vegetales intactos y se forman posterior a un daño mecánico por oxidación enzimática de los ácidos grasos poliinsaturados (Fang y Qian, 2012; Cai et al., 2014; Waterhouse et al., 2016). Estos compuestos son responsables de los aromas herbáceos de las uvas y del vino, y en general, están en mayor concentración en uvas inmaduras (Waterhouse et al., 2016).

1.5.1.2. Aromas fermentativos

Los aromas secundarios se denominan también aromas fermentativos ya que se producen a partir del metabolismo secundario de las levaduras durante el proceso de fermentación alcohólica (Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005). En este sentido, la fermentación representa el proceso más importante en la producción de compuestos volátiles aromáticos ya que en comparación con el vino, el aroma de la uva es relativamente bajo (Lambrechts y Pretorius, 2000). Así, durante la fase de crecimiento y de desarrollo de las levaduras, el metabolismo de los azúcares y de los aminoácidos conduce a la formación de una gran cantidad de compuestos volátiles, que incluyen los alcoholes superiores, los ácidos grasos, y los ésteres, entre otros (Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers et al., 2005; Bell y Henschke, 2005).

Los alcoholes superiores pueden formarse por vía anabólica a partir de los azúcares del mosto y por vía catabólica a partir de ciertos aminoácidos como son la valina, la leucina, la isoleucina y la fenilalanina por el mecanismo de Ehrlich (Bell y Henschke, 2005; Hazelwood et al., 2008). Los principales ésteres del vino son sintetizados enzimáticamente por las levaduras a partir de alcoholes y ácidos grasos, pero también la acidez del vino puede causar su hidrólisis formando ácidos carboxílicos y alcoholes (Lambrechts y Pretorius, 2000). Los ácidos grasos se activan primero con la coenzima A (CoASH) antes de la esterificación con los alcoholes. Así, la acetil-CoA se condensa con los alcoholes superiores a través de la enzima alcohol acetiltransferasa para formar ésteres acéticos (Peddie, 1990; Bell y Henschke, 2005). Los ésteres de etilo se forman por la reacción catalizada enzimáticamente entre el etanol y los ácidos grasos de cadena media y larga (Saerens et al., 2010). Debido a las altas concentraciones de acetil-CoA y de etanol, en comparación con otros ácidos grasos y alcoholes producidos durante la fermentación, el acetato de etilo alcanza la concentración más alta de los ésteres en el vino después de la fermentación

alcohólica (Plata et al., 2005; Bell y Henschke, 2005). Los ácidos grasos de cadena media también se encuentran en el vino, pero a baja concentración (Bardi et al., 1999). Los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico son importantes para el perfil aromático de los vinos de variedades aromáticamente neutras como Chardonnay (Bell y Henschke, 2005).

1.5.1.3. Aromas de crianza y envejecimiento

Los compuestos terciarios son los que se forman durante la crianza y el envejecimiento de los vinos como resultado de i) la extracción de la madera de roble, principalmente de compuestos furánicos, *cis* y *trans*-whisky lactonas, fenoles volátiles y vainillinas; ii) por deterioro microbiano o transformación química como el 2,4,6-tricloroanisol (TCA); iii) o por la transformación de compuestos precursores en los vinos como el TDN (Waterhouse et al., 2016). Los aromas terciarios de los vinos no serán descritos en mayor profundidad debido a que no serán parte del estudio de la presente Tesis Doctoral.

1.5.2. Biosíntesis de compuestos volátiles

En la síntesis de terpenos, se han identificado dos rutas distintas y parcialmente independientes; la primera, por la vía del ácido mevalónico citoplasmático (MVA) y la segunda, por la vía plastidial a través del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), dando lugar al isopentenil pirofosfato (IPP) y su isómero dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (Lichtenthaler et al., 1997; Emanuelli et al., 2010; Alem et al., 2019). Estos son los precursores de todos los terpenos presentes en las uvas (Lichtenthaler et al., 1997; Emanuelli et al., 2010). El IPP y el DMAPP se condensan por la acción de una prenil transferasa para producir geranil difosfato (GPP) (Emanuelli et al.,

2010). Posteriormente, diferentes terpenos sintetas catalizan la conversión de GPP a los diferentes terpenos cíclicos y acíclicos encontrados en las uvas (Lopez-Gallego et al., 2010).

Respecto a la síntesis de C₁₃ norisoprenoides en las uvas, el gen *VVCCDI* está involucrado en la formación de las dioxigenasas de carotenoides (CCD). Estas son las enzimas responsables de la degradación oxidativa específica de una amplia gama de carotenoides que permiten la formación de C₁₃ norisoprenoides en las uvas (Figura 15) (Mathieu et al., 2005; Schwab et al., 2008; Mendes-Pino, 2009).

Los compuestos C₆, que consisten en alcoholes y aldehídos de seis carbonos derivan de los lípidos de la membrana celular de los tejidos vegetales a través de la ruta de la lipoxigenasa (LOX) (Bate y Rothstein, 1998; Podolyan et al., 2010). En esta ruta, se produce la formación de hexanal, a partir del hidroperóxido de ácido linoleico, y se produce también la síntesis de (Z)-3-hexenal y (E)-2-hexenal a partir del hidroperóxido de ácido linolénico, a través de una enzima hidroperóxido liasa (HPL) (Oliveira et al., 2006). Finalmente, la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) reduce los aldehídos a sus correspondientes alcoholes que se encuentran en las uvas, es decir a 1-hexanol, a (Z)-3-hexenol y a (E)-2-hexenol (Prestage et al., 1999; Sánchez y Harwood, 2002; Oliveira et al., 2006).

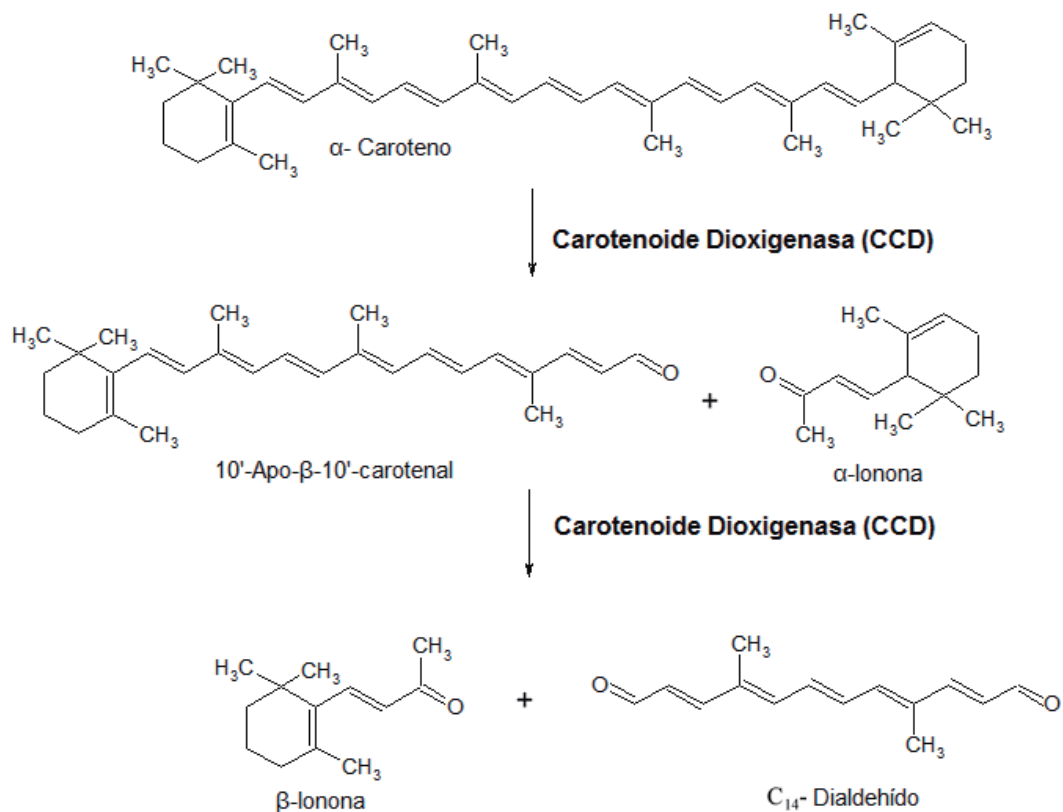


Figura 15. Síntesis de las iononas.

1.5.3. Factores que influyen el contenido de compuestos volátiles de la uva y del vino

Diversos factores vitícolas y enológicos pueden afectar el contenido de compuestos volátiles en la uva y en el vino (González-Barreiro et al., 2015; Alem et al., 2019). Las condiciones climáticas pueden afectar al contenido de compuestos volátiles de las uvas ya que las vides que crecen en sitios más frescos demoran en madurar y, por consiguiente, disponen de más tiempo para sintetizar ciertos metabolitos secundarios, dando lugar a uvas con menos azúcar y pH, así como también uvas con alta acidez y con un mayor potencial aromático (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018b; Martínez-Gil et al., 2018; Gutiérrez-Gamboa y Moreno-Simunovic, 2019).

Ciertas prácticas vitícolas que modifican el microclima del racimo pueden afectar el contenido de compuestos volátiles en la uva, aunque los resultados expuestos por los

investigadores difieren dependiendo principalmente de las condiciones climáticas del viñedo (Feng et al., 2015; Alem et al., 2019). La eliminación de hojas en las vides puede estimular la actividad de enzimas relacionadas con la síntesis de terpenos en las uvas en viñedos plantados en condiciones climáticas frescas, sin embargo, en climas cálidos, la exposición a la luz solar provoca un aumento de la temperatura de la baya, produciendo daños por golpe de sol lo que reduce la síntesis de compuestos volátiles (Feng et al., 2015; Pascual et al., 2017). Lee et al. (2007) demostraron que el contenido de C₁₃ norisoprenoides en las uvas y en los vinos se correlacionó con el grado de defoliación de las vides. En este sentido, un alto grado de defoliación resultó en niveles más altos de TDN y de vitispirano en uvas y en vinos (Lee et al., 2007). Asimismo, Pascual et al. (2017) mostraron que un alto grado de defoliación en vides Moscatel de Alejandría dio lugar a una mayor síntesis de linalool en las uvas. Por el contrario, Ristic et al. (2010) mostraron que la defoliación de vides de la variedad Shiraz no produjo ningún efecto en el contenido de β -damascenona ni de β -ionona en las uvas y en los vinos producidos.

El déficit hídrico afecta a la síntesis de compuestos volátiles de la uva de manera diferenciada dependiendo de la familia química a la que pertenecen estos compuestos (Alem et al., 2019). El estrés hídrico moderado en vides Sauvignon Blanc tuvo un efecto positivo en el contenido de tioles de las uvas, mientras que un estrés hídrico severo afectó negativamente el contenido de tioles de las uvas (Peyrot des Gachons et al., 2005). El secado parcial de raíces en vides Cabernet Sauvignon aumentó el contenido de β -damascenona, de β -ionona y de TDN en las uvas durante dos añadas consecutivas (Bindon et al., 2007). El estrés hídrico en vides de Cabernet Sauvignon injertadas sobre los portainjertos 1103 P y SO4 incrementó la formación de precursores volátiles glucosilados en las uvas (Koundouras et al., 2009). Sin embargo, cuando se analizaron los resultados en términos de precursores por baya, no hubo diferencias significativas entre los

tratamientos de riego. Estos resultados sugieren que las diferencias en el contenido de compuestos volátiles en las bayas tras un evento de estrés hídrico se deban probablemente a sus efectos en el tamaño de las bayas en lugar de favorecer la síntesis de estos compuestos en las uvas (Alem et al., 2019).

Durante los últimos años, diversos investigadores han evaluado el efecto de la aplicación foliar de elicitores sobre el contenido de compuestos volátiles de las uvas y de los vinos (Ruiz-García et al., 2013, 2014; Vitalini et al., 2014; D'Onofrio et al., 2018). Se ha demostrado que la aplicación foliar de MeJ y de benzotiadiazol (BTH) en diferentes clones de vides de la variedad Monastrell aumentó el contenido de terpenos y de C₁₃ norisoprenoides en uvas y en vinos de manera diferenciada (Ruiz-García et al., 2013, 2014). Martin et al. (2003) mostraron que la aplicación foliar de MeJ sobre *Picea abies* indujo la acumulación de terpenos, así como también la actividad de ciertas enzimas relacionadas con la síntesis de estos compuestos, permitiendo el aumento del contenido de linalol, de farneseno y de nerolidol. Estos autores sugirieron que el MeJ permite la activación del metabolismo de los terpenos al aumentar la actividad de la geranylgeranyl difosfato sintasa (GGPP), enzima precursora de isoprenoides y de terpenos. Estos resultados coinciden con los presentados por D'Onofrio et al. (2018) quienes mostraron que la aplicación de MeJ a vides de la variedad Sangiovese indujo un aumento en el contenido de los aromas varietales de la uva, en especial de monoterpenos, debido a la activación de enzimas relacionadas con la síntesis de estos compuestos.

El nitrógeno es fundamental para el desarrollo celular de las levaduras y regula las vías metabólicas de producción de compuestos volátiles fermentativos (Bell y Henschke, 2005). En este sentido, el contenido de nitrógeno en el mosto puede afectar significativamente la producción de compuestos volátiles del vino (Bell y Henschke, 2005). El contenido de alcoholes superiores

muestra un aumento inicial a niveles bajos de nitrógeno fácilmente asimilable y tiende a disminuir a partir de una concentración superior a 200 ó 300 mg N/L (Ugliano et al., 2007). Por otro lado, la formación de ésteres de etilo, así como de ésteres acéticos, incluidos los acetatos de etilo, generalmente aumenta cuando el contenido de nitrógeno fácilmente asimilable del mosto aumenta por encima de los 300 mg N/L (Ugliano et al., 2007). Los mostos con bajo niveles de nitrógeno fácilmente asimilable favorecen la producción de vinos complejos aromáticamente y menos afrutados, mientras que moderados niveles de nitrógeno fácilmente asimilable en los mostos favorecen la producción de vinos más frutales (Ugliano et al., 2007).

Durante la crianza en barrica se producen modificaciones en la composición química de los vinos debido al aporte de sustancias propias de la madera del roble, principalmente de compuestos aromáticos y de taninos (Mosedale et al., 1998). Las lactonas (*cis-β*-metil- γ -octalactonas y la *trans-β*-metil- γ -octalactonas) son los compuestos volátiles más importantes sensorialmente que se liberan de la madera de roble al vino, otorgándole aromas a coco (Cano-López et al., 2008; Martínez-Gil et al., 2019). Estos compuestos derivan de la oxidación de los lípidos y se sabe que su concentración en la madera de roble aumenta después del tostado (Martínez-Gil et al., 2017). El guayacol y el 4-metil-guayacol son compuestos volátiles que son extraídos de la madera y se originan como producto de la degradación de la lignina durante el tostado de la madera y otorgan aromas ahumados a los vinos (Ghadiriasli et al., 2019). El furfural, el 5-metilfurfural y el alcohol furfurílico se forman a partir de la degradación de la hemicelulosa durante al tostado de la madera y también son extraídos por los vinos desde la madera de roble otorgándoles aromas a tostado y a caramelo (Ghadiriasli et al., 2019).

Durante el envejecimiento del vino en botellas se producen varios cambios químicos en la composición volátil de los vinos (Waterhouse et al., 2016). Esto se debe a una serie de reacciones

que dependen del contenido de etanol y de pH del vino en el momento de su embotellado y también de la temperatura de almacenamiento (Rapp y Mandery, 1986; Waterhouse et al., 2016). Los cambios sensoriales y químicos producidos en los vinos durante el envejecimiento son menos acentuados cuando los vinos se almacenan a bajas temperaturas (Puech et al., 2006). Estos datos sugieren que el control de la temperatura durante el envejecimiento de los vinos es crítico para extender la vida útil de los vinos (Añón et al., 2014). Por otro lado, altas temperaturas de envejecimiento en vinos con un bajo pH conllevan a un aumento en la hidrólisis de acetatos y de ésteres etílicos, disminuyendo la intensidad de los aromas frutales en los vinos (Ramey y Ough, 1980; Waterhouse et al., 2016).

1.5.4. Implicación de los compuestos volátiles en la calidad del vino

Los terpenos y los C₁₃ norisoprenoides son los compuestos volátiles más odoríferos en los vinos debido a sus bajos umbrales de percepción (Pineau et al., 2007; Black et al., 2015; Yuan y Qian, 2016). Los descriptores aromáticos atribuidos a estas familias químicas de compuestos volátiles son aromas cítricos, florales, frutales y empireumáticos (Cai et al., 2014). Debido a esto, son compuestos clave en ciertos vinos blancos como los Moscatel, los Gerwurztraminer y los Riesling (López-Tamames et al., 1997; Ripoll et al., 2017).

La β -damascenona tiene un efecto más indirecto que directo en el aroma del vino, enmascarando o incrementando atributos potenciales de otras moléculas contenidas en la disolución del vino. En este sentido, en una solución hidroalcohólica, la β -damascenona puede mejorar las notas frutales del cinamato y el hexanoato de etilo y puede enmascarar los aromas herbáceos de la 3-isobutil-2-metoxipirazina (Pineau et al., 2007). Al inicio de la vinificación, los C₁₃ norisoprenoides pueden estar unidos a azúcares, lo que los hace aromáticamente inactivos, sin

embargo, a medida que el proceso de fermentación alcohólica avanza y a medida que el vino envejece, estos compuestos se liberan de los azúcares por hidrólisis y se convierten en los norisoprenoides aromáticos (Hjelmeland y Ebeler, 2015). En este sentido, el TDN es el compuesto responsable del aroma a "gasolina" o "queroseno" que se encuentran típicamente en los vinos Riesling envejecidos, y probablemente también contribuye a la complejidad de otros tipos de vinos (Waterhouse et al., 2016).

Respecto a los alcoholes superiores en los vinos, se ha reportado que concentraciones menores a los 300 mg/L pueden contribuir a un carácter deseable en los vinos, mientras que concentraciones por encima de los 400 mg/L podrían tener un efecto perjudicial en la calidad del vino (Bell y Henschke, 2005). Debido a la concentración en la que estos compuestos se encuentran en los vinos y a su alto umbral de percepción, los alcoholes superiores no contribuyen fuertemente al aroma de los vinos (Cai et al., 2014). En este sentido, los alcoholes superiores tienen una mayor importancia en destilados de vino debido a la gran concentración en que se encuentran (Nykänen, 1986). Sin embargo, ciertos estudios han demostrado que los alcoholes superiores pueden suprimir de forma significativa el aroma a fresa, a lácteo, a afrutado, a coco, a madera y a vainilla de los vinos (de la Fuente-Blanco et al., 2016). En este sentido, un contenido de alcoholes superiores de 299 mg/L en el vino puede suprimir el aroma frutal de los vinos tintos jóvenes, mientras que un contenido de 281 mg/L de alcoholes superiores en el vino puede suprimir el aroma a roble de los vinos envejecidos (de la Fuente-Blanco et al., 2017). La presencia en vinos modelo de un contenido de alcoholes superiores entre 284 y 358 mg/L causó una disminución significativa de la preferencia de los vinos por parte de un panel sensorial realizado por expertos (de la Fuente-Blanco et al., 2017).

Los ésteres acéticos pueden contribuir al aroma afrutado de los vinos, mientras que los ésteres etílicos se describen como afrutados y florales. Por su parte, los ésteres etílicos provenientes de los ácidos de cadenas más largas se perciben como grasos (Bell y Henschke, 2005). Debido a su bajo umbral de percepción, en especial el del hexanoato, el octanoato y el decanoato de etilo, pueden conferir características frutales a los vinos (Cai et al., 2014; Lambrechts y Pretorius 2000).

Los ácidos grasos pueden aportar al vino notas afrutadas, de queso graso y rancio y pueden mejorar la complejidad del vino a niveles de umbral sub sensoriales, pero pueden causar un efecto negativo en el aroma del vino cuando están por encima de sus umbrales de percepción (Swiegers et al., 2005; Liu et al., 2019).

1.6. Empleo de los extractos de algas en uvas y en vinos

La producción de alimentos en base a sistemas agrícolas convencionales ha traído consigo el uso indiscriminado de agroquímicos, lo que ha generado un efecto negativo en la conservación de la biodiversidad a nivel mundial, dando lugar a una mayor contaminación del suelo y de las aguas, así como también a la disminución de la fertilidad de los suelos (FAO, 2017). La coyuntura mundial actual en relación con la demanda de fertilizantes orgánicos en países desarrollados ha abierto una oportunidad al uso de las algas en viticultura, las cuales han sido ampliamente usadas en otros cultivos hortícolas. El uso de algas en viticultura está actualmente bajo estudio, siendo pocos los ensayos existentes en la literatura, que evalúan su efecto en la calidad de la uva y del vino producido.

1.6.1. Especies de algas

Las algas son un conjunto diverso de organismos que abarca alrededor de 10.000 especies de algas rojas, pardas y verdes (Khan et al., 2009). Según su abundancia y distribución, las algas pardas (Phaeophyceae) son las más utilizadas para la elaboración de extractos comerciales con aplicaciones en horticultura (Battacharyya et al., 2015). La mayoría de los productos bioestimulantes producidos en base a algas se fabrican a partir de una única especie de alga parda (*Ascophyllum nodosum*), la cual se distribuye abundantemente a lo largo de la costa noroeste de Europa y de la costa noreste de América del Norte (Craigie, 2011). Sin embargo, otros extractos comerciales vendidos en la actualidad se elaboran a partir de otras especies de algas pardas, tales como la *Ecklonia maxima*, la *Durvillea potatorum*, la *D. antártica*, la *Himanthalia elongate*, la *Laminaria digitata*, la *L. hyperborea*, la *Macrocystis pyrifera*, y la *Sargassum spp* aunque otras especies minoritarias, tales como la *Fucus serratus*, la *Enteromorpha intestinalis*, la *Ulva lactuca*, y la *Kappaphycus alvarezii*, también son usadas para la elaboración de extractos comerciales (Craigie, 2011; Sharma et al., 2014).

Los diversos extractos comerciales elaborados a partir de las algas pardas contienen una amplia gama de componentes inorgánicos y orgánicos (Sharma et al., 2014). Los componentes inorgánicos de los extractos elaborados de *A. nodosum* incluyen nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, hierro, magnesio, zinc, sodio y azufre (Rayirath et al., 2009). Los extractos de las algas pardas también contienen cantidades variables de aminoácidos (Blunden et al., 2010; MacKinnon et al., 2010). Sin embargo, las algas pardas poseen solo entre el 3 y el 15 % de su peso seco en proteínas, mientras que las algas verdes y las rojas contienen entre el 10 y el 47 % de su peso seco en proteínas (Fleurence, 1999; Nagahama et al., 2009; Sharma et al., 2014).

Los polisacáridos son uno de los componentes principales de los extractos comerciales de algas (Sharma et al., 2014). Éstos pueden representar hasta el 40 % del peso seco del extracto (Rayirath et al., 2009). Los polisacáridos más comunes que se encuentran en los extractos de las algas pardas son los alginatos, los fucoidanos, los laminados y los glucanos (Khan et al., 2009). Los fucoidanos poseen diferentes estructuras debido a sus diversos grados de metilación, sulfatación y ramificación (Battacharyya et al., 2015). Dependiendo de los métodos químicos y físicos empleados durante la extracción de la materia prima, la temporada de cosecha y las especies de algas usadas, la estructura de los polímeros que contienen fucosa varía (Craigie, 2011). Los alginatos son polímeros de ácidos D-manurónico y L-gulurónico, cuya viscosidad varía según las especies de algas usadas (Battacharyya et al., 2015). Se ha demostrado que los alginatos promueven el crecimiento de las plantas (Yabur et al., 2007). Por otro lado, las laminarinas son conocidos elicitores y modulan las respuestas de defensa de las plantas contra los patógenos fúngicos y bacterianos (Mercier et al., 2001).

Las algas pardas en especial la *Ecklonia stolonifera*, la *F. vesiculosus*, la *F. serratus* y la *A. nodosum* pueden alcanzar altas concentraciones de compuestos fenólicos incluso hasta 30 g/100 g de extracto (Audibert et al., 2010; Keyrouz et al., 2011; Balboa et al., 2013; Battacharyya et al., 2015). Los compuestos fenólicos juegan un rol primario como componentes estructurales de las paredes celulares de las algas protegiendo a las células y a sus componentes celulares (Nakamura et al., 1996; Wang et al., 2009). Los florotaninos son compuestos fenólicos de tipo flavanol que se encuentran en las algas pardas, y se ha observado que son antioxidantes más eficientes en comparación a la catequina, el ácido ascórbico, el galato de epigallocatequina, el resveratrol y el tocoferol (Shibata et al., 2003).

Los extractos de algas marinas también contienen varias fitohormonas, incluidas las auxinas, las citoquininas, las giberelinas, el ácido abscísico y los brasinoesteroides (Stirk y Van Staden, 1997; Stirk et al., 2004, 2014; Battacharyya et al., 2015). Las algas pardas como la *Alaria esculenta*, la *Ascophyllum nodosum*, la *Ectocarpus siliculosus*, la *Fucus serratus*, la *F. spiralis*, la *F. vesiculosus*, la *Halidrys siliquosa*, la *Laminaria digitata*, la *L. hyperborea*, la *L. saccharina* y la *Pilayella littoralis* contienen osmolitos como el manitol, compuesto protector importante en respuesta a factores abióticos (Battacharyya et al., 2015). El manitol también es conocido como un agente quelante y explica la razón por la cual las algas pueden liberar elementos no disponibles del suelo (Reed et al., 1985).

1.5.2. Uso de algas en viticultura

Durante las últimas décadas, las principales regiones vitivinícolas se están enfrentando a tiempos de adaptación debido a la imprevisibilidad de las condiciones climáticas y al alza de las temperaturas en el período estival, lo que ha afectado fuertemente la dinámica de maduración de la uva y su calidad (Jones y Davis, 2000; Keller, 2015; Tomasi et al., 2011). Los bioestimulantes elaborados en base a algas pueden desempeñar un papel clave en el desarrollo de estrategias vitícolas respetuosas con el medioambiente mitigando los efectos negativos del cambio climático (Sabir et al., 2014; Frioni et al., 2018). La mayoría de los trabajos relativos a los efectos de la aplicación foliar de algas en viticultura se centran en estudiar sus impactos en mitigar los efectos negativos del estrés abiótico y de los factores bióticos, además de mejorar el rendimiento de la uva y de algunos componentes físico-químicos de ésta.

En este sentido, se ha observado que la aplicación de un extracto comercial de alga *Ascophyllum nodosum* (ACADIAN®) ha permitido mejorar el rendimiento, el peso de los racimos

y de las bayas, el tamaño del racimo y su firmeza en vides de la variedad Thompson Seedless, pero tuvo un efecto negativo en el contenido de sólidos solubles de la uva (Norrie et al., 2002). La absorción de cobre y otros micronutrientes en vides de la variedad Karaerik de un año fue mejorada tras la aplicación de tres extractos comerciales de algas (Maxicrop®, Proton® y Algipower®) aplicados foliarmente cuando los brotes de vid tuvieron entre 5 y 6 cm de longitud (Turan y Köse, 2004). La aplicación foliar de un extracto comercial (Alga Special®) de *A. nodosum* a una dosis de 170 mL/hL mejoró el crecimiento vegetativo, la longitud y el diámetro de brotes y el área foliar de las vides de la variedad Feteasca Alba (Popescu y Popescu, 2014). La aplicación foliar de un extracto soluble de *A. nodosum* permitió mejorar el peso seco de la hoja, el peso y el volumen de la baya y el contenido de Ca, Zn, S, B y de clorofila de la hoja en vides de la variedad Narince (Sabir et al., 2014). El cuajado y la productividad de las bayas obtenidas a partir de viñedos plantados en sitios tanto frescos como cálidos fue mejorada tras la aplicación foliar de un extracto comercial (BM86®) de *A. nodosum* a las vides de la variedad Carmenère (Gutiérrez-Gamboa et al., 2018e). La aplicación foliar de un extracto comercial (Primo®) de *A. nodosum* permitió mejorar el tamaño de la hoja y su contenido de clorofila, la cuaja del racimo, el número de racimos por brote, la longitud del raquis, el peso de la baya, el tamaño de la baya, el contenido de sólidos solubles y de pH del mosto, y redujo la deshidratación de la baya y el contenido de ácido ascórbico de la uva en vides de la variedad Perlette (Khan et al., 2012).

Durante los últimos años, el estudio sobre los efectos de las aplicaciones de algas en viticultura está aumentando debido a sus implicaciones en la fisiología de las plantas y en la calidad de la uva (Frioni et al., 2018, 2019; Salvi et al., 2019; Shukla et al., 2019; Taskos et al., 2019). Sin embargo, a la actualidad, existe poca información disponible en la literatura científica acerca de los efectos de las aplicaciones foliares de algas a las vides en el contenido de aminoácidos, de

compuestos volátiles y de fenoles en la uva y en el vino (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017c, 2018f; Frioni et al., 2018, 2019; Salvi et al., 2019; Taskos et al., 2019). En este sentido, un extracto comercial (Basfoliar® Algae SL) del alga *Durvillaea antarctica* aplicado a las vides de la variedad Cabernet Sauvignon aumentó el contenido de varios aminoácidos en las uvas y en los vinos, lo que resultó en un mayor contenido de algunos alcoholes superiores y ésteres etílicos en los vinos (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017c, 2018f). Frioni et al. (2018) y Salvi et al. (2019) observaron que las aplicaciones de algas (*A. nodosum*) a las vides mejoraron la acumulación de antocianos en el hollejo y el contenido fenólico total en las bayas. Frioni et al. (2019) demostraron que el aumento en el contenido de antocianos y de otros compuestos fenólicos en las uvas después de las aplicaciones foliares de algas a las vides está relacionado con la modulación específica de genes involucrados en la activación de rutas metabólicas de síntesis de los flavonoides. Estos autores también mostraron que las vides tratadas con un fertilizante de *A. nodosum* se vieron menos afectadas por la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) en comparación con las vides no tratadas (Figura 16). Por otro lado, Taskos et al. (2019) observaron que las aplicaciones foliares de algas en las vides de la variedad Merlot indujeron a un aumento en el rendimiento, en el número de bayas, en la capacidad de extracción de antocianos del hollejo de las bayas, y en los taninos de semilla, mientras que su aplicación disminuyó el índice de polifenoles totales de las uvas.

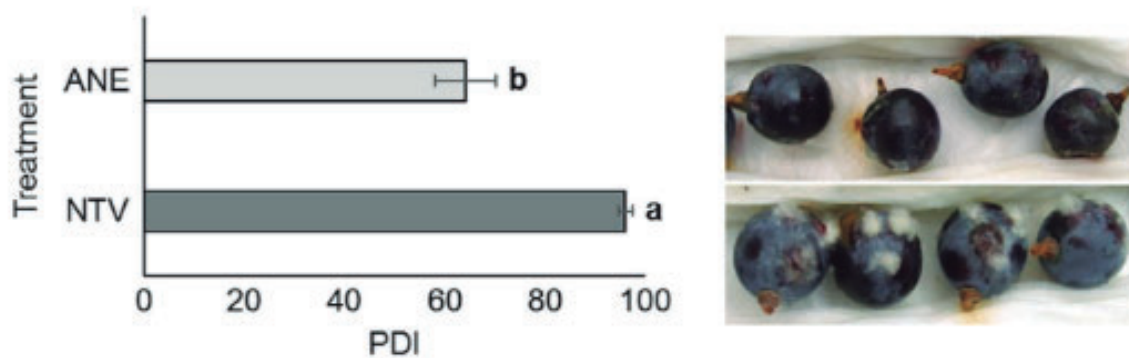


Figura 16. Índice del porcentaje de enfermedad (PDI) de las bayas inoculadas con *Botrytis cinerea* en vides tratadas con un extracto de *Ascophyllum nodosum* (ANE) y sin tratar (NTV) de acuerdo con lo expuesto por Frioni et al. (2019).

2. Objetivos

El objetivo general de la presente Tesis Doctoral fue evaluar el efecto de la aplicación foliar de un extracto comercial elaborado a partir del alga *Ascophyllum nodosum* en dos dosis a las vides de las variedades Tempranillo Blanco y Tempranillo en el contenido de compuestos volátiles, nitrogenados y fenólicos de la uva y del vino en dos añadas consecutivas en un viñedo de La Rioja, España. Los objetivos específicos de la Tesis Doctoral fueron:

a) Estudiar la composición de los aminoácidos, de los compuestos fenólicos y de los volátiles de la uva y del vino de las variedades Tempranillo Blanco y Tempranillo.

b) Evaluar el impacto de la aplicación foliar de dos dosis del extracto comercial del alga: dosis baja (Ld) a 0,25 % (v/v) y dosis alta (Hd) a 0,50 % (v/v) a las vides de la variedad Tempranillo Blanco en el contenido de los aminoácidos, de los compuestos volátiles y de los fenólicos de la uva y del vino.

c) Estudiar el efecto de la aplicación foliar de un extracto comercial de alga distribuido en una dosis baja (Ld) a 0,25 % (v/v) y una dosis alta (Hd) a 0,50 % (v/v) a las vides de la variedad Tempranillo en el contenido de los aminoácidos, de los compuestos volátiles y de los fenólicos de la uva y del vino.

3. Materiales y Métodos

3.1. Ubicación del ensayo

Para conseguir los objetivos planteados en la Tesis Doctoral, se realizó un ensayo en un viñedo experimental perteneciente al Gobierno de La Rioja ubicado en el Parque de La Grajera, (Figura 17) en el Término Municipal de Logroño, capital de la Comunidad Autónoma de La Rioja (España), durante las añadas 2017 y 2018. El sitio de estudio se encuentra en la subzona de Rioja Alta de la D.O.Ca. Rioja. En el viñedo experimental, se dispusieron dos ensayos, uno con la variedad Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) y el otro con la variedad Tempranillo (*V. vinifera* L.).

El viñedo de Tempranillo Blanco se estableció en el año 2002 sobre el portainjerto 110 Richter con una orientación de Este a Oeste. Las vides están conducidas en espaldera vertical simple y son podadas dejando de 4 a 5 pulgares (2 yemas por pulgar) en un sistema de doble Guyot. La altitud del viñedo es alrededor de 447 m s. n. m. La densidad de plantación fue de 3.030 plantas/ha, utilizando distancias de 3,0 m entre hileras y de 1,1 m entre cepas. El viñedo cuenta con un sistema de riego por goteo con goteros que están distanciados a 0,75 m entre sí y que emiten un caudal de 2,3 L/h. Las coordenadas geográficas del viñedo de Tempranillo Blanco son: 42°26'27,27" de latitud Norte y 2°30'51,54 de longitud Oeste.

Por otro lado, el viñedo de Tempranillo se estableció en el año 1995 con el clon RJ-26 sobre el portainjerto 110 Richter con una orientación de Este a Oeste. Las vides están conducidas en espaldera vertical simple y son podadas dejando de 4 a 5 pulgares (2 yemas por pulgar) por planta en un sistema de doble Guyot. La altitud del viñedo es de 456 m s. n. m. y la densidad de plantación fue de 2.976 plantas/ha, utilizando distancias de 2,8 m entre hileras y de 1,2 m entre

cepas. El viñedo cuenta con un sistema de riego por goteo con las mismas características expuestas en el párrafo anterior. Las coordenadas geográficas del viñedo de Tempranillo son: 42°26'25,34'' de latitud Norte y 2°30'57,04 de longitud Oeste.

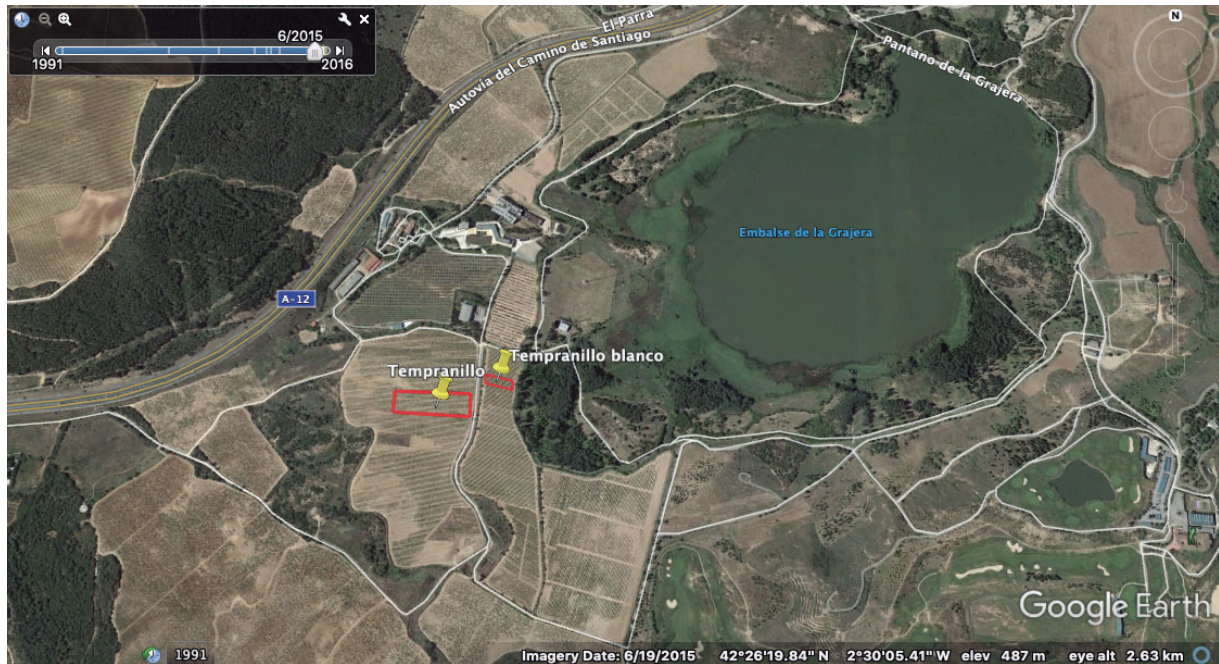


Figura 17. Ubicación de las parcelas de estudio en La Grajera, La Rioja, España.

3.2. Caracterización climática

Para la obtención de los datos climáticos se utilizó una estación meteorológica automática instalada cerca del viñedo experimental (coordenadas UTM 540001/4698711), que pertenece al Servicio de Información Agroclimática de La Rioja (SIAR). Las variables climáticas de ambas añadas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 2. Resumen de las características climáticas más importantes de las añadas 2017 y 2018.

	2017	2018
<i>Temporada de crecimiento (abril a septiembre)</i>		
Precipitaciones (mm)	180	354
ET _o (mm)	893	790
T mínima (°C)	-0,3	1,9
T media (°C)	18,7	18,3
T máxima (°C)	36,5	37,0
HR (%)	60,1	69,4
Radiación acumulada (MJ/m ²)	3.976,4	3.804,0
<i>Mes más cálido (Julio)</i>		
ET _o (mm)	167,3	168,7
T mínima (°C)	11,8	13,8
T media (°C)	22,1	22,0
T máxima (°C)	36,5	33,9
Radiación media (MJ/m ²)	24,7	25,2
<i>Anual</i>		
Precipitaciones (mm)	376,4	671,8
ET _o (mm)	1.210	1.061,10
T mínima (°C)	3,4	3,9
T media (°C)	13,9	13,4
T máxima (°C)	26,9	25,2

ET_o: evapotranspiración de referencia, HR: humedad relativa, T: temperatura.

La Figura 18 muestra la evolución de la precipitación mensual de las añadas 2017 y 2018. Entre los meses de enero a julio, la precipitación mensual de la campaña 2018 fue entre un 51 y un 208 % mayor que la de la campaña 2017. Esta situación se observó desde la mitad del reposo invernal de las cepas hasta el período de crecimiento de los pámpanos. Entre los meses de agosto

y diciembre, el nivel de precipitación de la añada del 2017 fue entre un 6 y un 20 % mayor que en la añada del 2018.

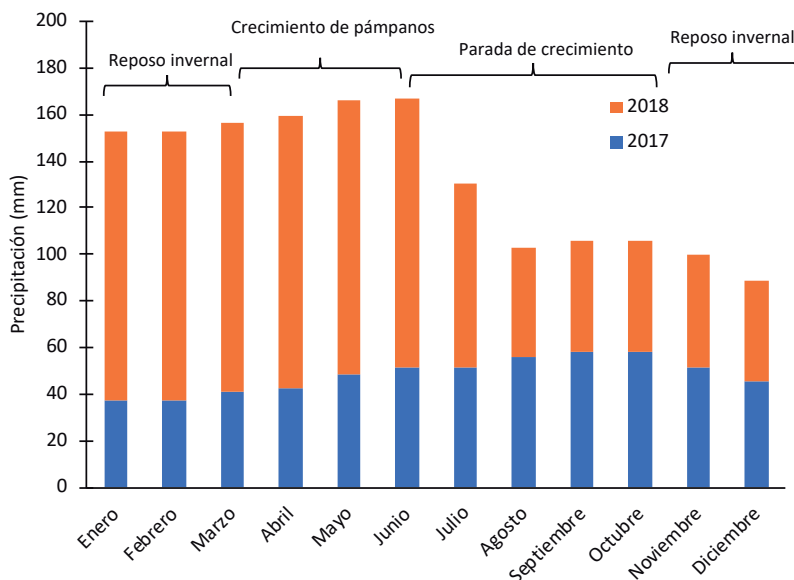


Figura 18. Evolución de la precipitación mensual (mm) en las añadas 2017 y 2018 en La Grajera, La Rioja, España.

Las Figuras 19, 20 y 21 muestran la temperatura media, mínima y máxima mensual de las campañas 2017 y 2018, respectivamente. Desde los meses de febrero hasta junio, las temperaturas medias mensuales fueron mayores en el año 2017, mientras que, en los meses de enero, agosto, septiembre y diciembre, las temperaturas medias mensuales fueron mayores en el año 2018. La temperatura mínima y máxima promedio mensual siguió una tendencia similar a la de la temperatura media mensual.

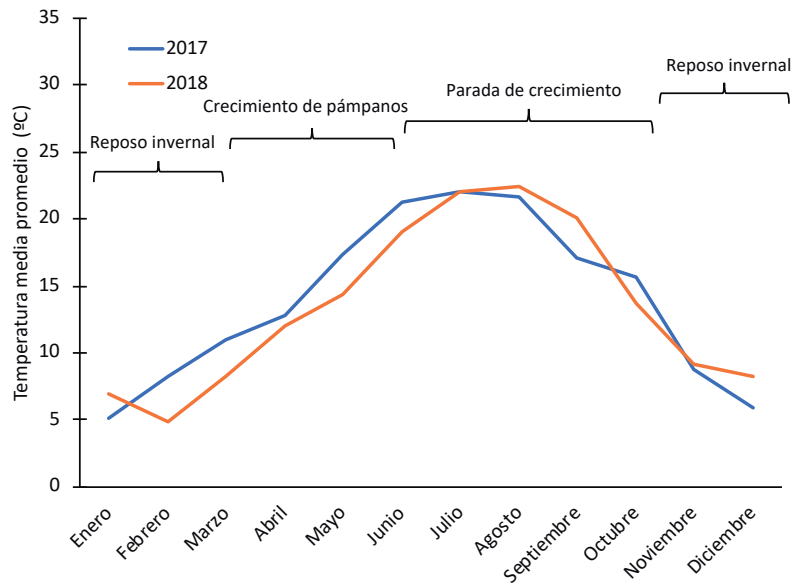


Figura 19. Temperatura media mensual (°C) en las campañas 2017 y 2018 en La Grajera, La Rioja, España.

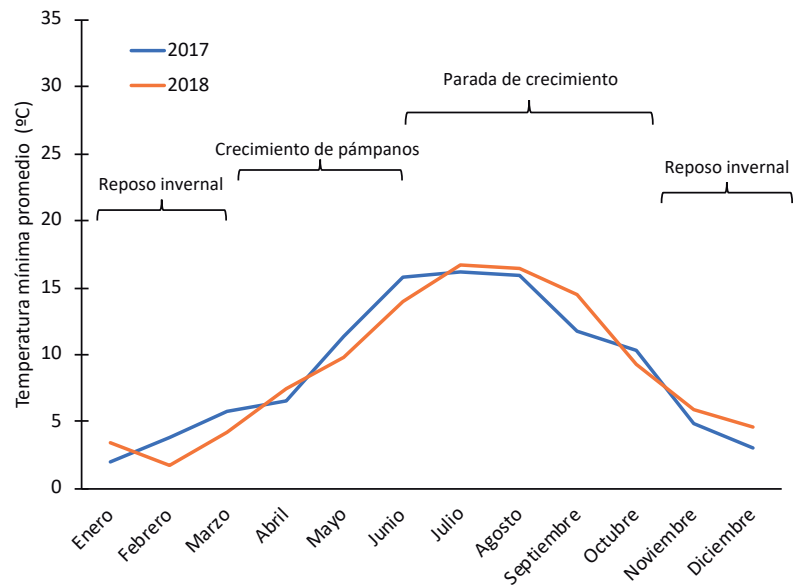


Figura 20. Temperatura mínima promedio mensual (°C) en las campañas 2017 y 2018 en La Grajera, La Rioja, España.

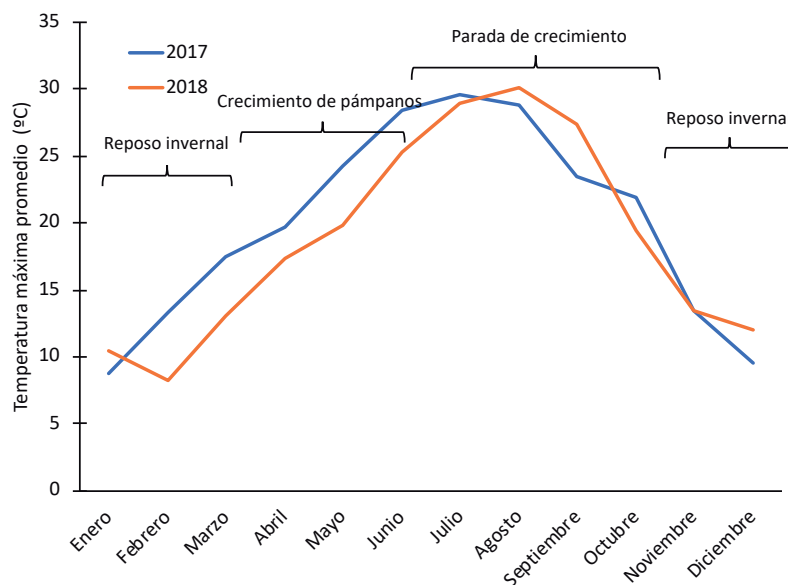


Figura 21. Temperatura máxima promedio mensual (°C) en las campañas 2017 y 2018 en La Grajera, La Rioja, España.

La Figura 22 muestra la evolución de la evapotranspiración de referencia (ET_0) mensual de las campañas 2017 y 2018. Ésta sigue una tendencia similar a lo mostrado en las temperaturas medias, mínimas y máximas mensuales (Figuras 19, 20 y 21, respectivamente). La ET_0 muestra las necesidades hídricas de un cultivo, es decir, el agua transpirada por las vides y el agua evaporada desde el suelo, lo que puede ser un indicador de estrés hídrico de las plantas. En este sentido, desde el inicio del crecimiento vegetativo hasta inicios de la parada de crecimiento, en el año 2017, las vides estudiadas estuvieron más estresadas en términos de sus necesidades hídricas que las del año 2018. Desde agosto a diciembre, basado en la ET_0 (Figura 22), las vides presentaron similares niveles de estrés en ambas añadas. Es así como la ET_0 media anual para el año 2017 fue de 3,31 mm, mientras que en el año 2018 fue de 2,90 mm.

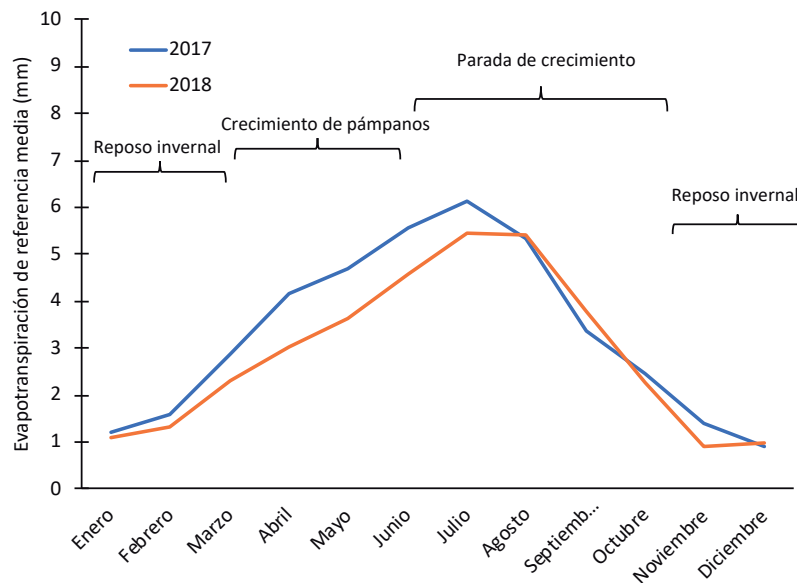


Figura 22. Evapotranspiración de referencia media mensual (mm) en las campañas 2017 y 2018 en La Grajera, La Rioja, España.

3.3. Diseño experimental

En el siguiente apartado se expone el diseño experimental seguido en la presente Tesis Doctoral.

3.3.1. Tratamientos

Se aplicó foliarmente un fertilizante comercial (Crop Plus, Adama, Santiago de Chile, Chile) del alga *Ascophyllum nodosum* en dos dosis distintas: una dosis baja y una dosis alta, además de un control. El producto comercial fue disuelto en agua en la cantidad necesaria para preparar una disolución de baja concentración a 0,25 % (v/v) y otra de alta concentración a 0,50 % (v/v), a las cuales se le añadió un surfactante tensioactivo no iónico (Tween 80, Sigma-Aldrich,

Madrid, España) a una concentración de 0.1 % (v/v). El control consistió en una disolución acuosa a la que solo se le agregó Tween 80.

El experimento se estableció en un diseño de bloques al azar considerando tres repeticiones por cada tratamiento de siete plantas cada uno. Se dejaron dos cepas de separación como margen entre los bordes y entre las repeticiones. Las aplicaciones de los dos tratamientos y el control, se llevaron a cabo en dos momentos distintos del ciclo vegetativo de las vides de Tempranillo Blanco y de las de Tempranillo. La primera aplicación se realizó cuando las vides llegaron a la etapa fenológica de envero, y la segunda fue llevada a cabo una semana después de la primera aplicación (Tabla 3). Para ello se utilizó un aplicador manual de jardinería de 1,25 L (Figura 23). Se aplicaron 200 mL de cada uno de los tratamientos, cubriendo ambos lados de la pared vegetal de la vid, por lo que se aplicaron 100 mL en cada una de las caras de la espaldera.

Tabla 3. Fecha de aplicación de los tratamientos llevados a cabo en el viñedo.

	1ª aplicación	2ª aplicación
Tempranillo Blanco 2017	7 de agosto de 2017	14 de agosto de 2017
Tempranillo Blanco 2018	14 de agosto de 2018	22 de agosto de 2018
Tempranillo 2017	3 de agosto de 2017	10 de agosto de 2017
Tempranillo 2018	20 de agosto de 2018	27 de agosto de 2018



Figura 23. Aplicación de los tratamientos a las vides Tempranillo en el viñedo experimental.

3.3.2. Composición química del fertilizante comercial

La composición nitrogenada del extracto del alga utilizado en el ensayo se analizó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de acuerdo con la metodología expuesta por Garder-Cerdán et al. (2009). La composición de nitrógeno total del extracto fue de 2,47 g N/L, de los cuales 1,34 g N/L corresponden a amonio y el resto a los siguientes aminoácidos: 4,81 (Asp), 8,72 (Glu), 716,68 (Gly), 16,99 (β -Ala), 22,18 (α -Ala), 309,07 (Pro), 4,77 (Val), 35,87 (Met), 1,60 (Ile), 1,50 (Leu), 1,15 (Phe), 3,83 (Orn) y 4,15 (Lys), cantidades expresadas en mg N/L. Además, la etiqueta del producto indica que el fertilizante contiene otros ingredientes activos como azufre (4,5 % p/v), cobre (1,3 % p/v), hierro (1,7 % p/v), manganeso (1,4 % p/v) y zinc (3,0 % p/v).

3.4. Vendimia y vinificación

3.4.1. Vendimia

Para llevar a cabo el seguimiento de la maduración, se realizó el monitoreo semanal de la evolución de los sólidos solubles ($^{\circ}$ Brix) tanto en las vides de Tempranillo Blanco como en las de Tempranillo. La fecha de vendimia se determinó en el momento en que las uvas alcanzaron un contenido de alcohol probable cercano a 13 % (v/v) (Tabla 4). Las repeticiones fueron vendimiadas manualmente depositando la uva en cajas de 20 kg de capacidad. Previo a la cosecha, se recogieron ciento cincuenta bayas por repetición y tratamiento, y cincuenta de estas se congelaron a -20°C para, posteriormente, analizar su composición fenólica. Todos los racimos vendimiados fueron despallados y estrujados mecánicamente en la bodega experimental perteneciente al Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (ICVV) en Logroño, España. Los parámetros físico-químicos de los mostos se determinaron según la metodología establecida en los apartados expuestos a continuación (OIV, 2003). En ese mismo momento y, de cada repetición y tratamiento, se

congelaron a -20 °C, alícuotas de mosto en tubos Falcon™ de 50 mL para el posterior análisis de los aminoácidos y de los compuestos volátiles del mosto.

Tabla 4. Fecha de vendimia de las uvas de los viñedos de Tempranillo Blanco y de Tempranillo.

	2017	2018
Tempranillo Blanco	28 de agosto	19 de septiembre
Tempranillo	18 de septiembre	02 de octubre

3.4.2. Vinificación de los vinos blancos

Las uvas de Tempranillo Blanco vendimiadas fueron estrujadas y despalladas y, la pasta obtenida fue prensada a una presión de aproximadamente 3,5 bares. Para cada repetición y tratamiento, el mosto obtenido se echó a un depósito de 12 kg y se le añadió sulfuroso a una dosis de 5 g/hL. Los depósitos fueron puestos en una cámara de temperatura controlada a 9-10 °C durante un día para que las partículas sólidas decantaran. El mosto limpio fue inoculado con la levadura *Saccharomyces cereviceae* (Uvaferm VRB, Lallemmand, Spain). La fermentación alcohólica se llevó a cabo a 17 ± 1 °C dentro de una cámara de temperatura controlada. Diariamente se midió la temperatura y la densidad del mosto para controlar la cinética de la fermentación alcohólica, la cual se dio por finalizada cuando el contenido de azúcares reductores fue inferior a 2,5 g/L. Al finalizar este proceso, cada uno de los vinos fue sulfitado (1 mL/L de solución de anhídrido sulfuroso a 80 g/L) y puestos en frío en una cámara de temperatura controlada, a 9-10 °C. Una vez que los sólidos de los vinos decantaron, se trasegó el sobrenadante y se obtuvo una muestra para el análisis de los parámetros físico-químicos de los vinos. En ese momento, además se tomaron alícuotas de 50 mL para el posterior análisis del contenido de aminoácidos, de compuestos fenólicos y de compuestos volátiles del vino. Posteriormente, los vinos se embotellaron y se

almacenaron en condiciones controladas de temperatura (18 °C), hasta el momento del análisis sensorial.

3.4.3. Vinificación de los vinos tintos

Las uvas de Tempranillo vendimiadas fueron estrujadas y despalilladas, y la pasta obtenida se introdujo en depósitos de 30 L a los que se les agregó sulfuroso a una dosis de 5 g/hL. El mosto fue inoculado con la levadura *Saccharomyces cereviceae* (Uvaferm VRB, Lallemand, España). La fermentación alcohólica se llevó a cabo a temperatura ambiente, de alrededor de 20 ± 2 °C. Diariamente se midió la temperatura y la densidad con el fin de controlar la cinética de la fermentación alcohólica y se llevó a cabo el bazuqueo del mosto con la finalidad de mojar el sombrero de los orujos. La fermentación alcohólica se dio por finalizada cuando el contenido de azúcares reductores fue inferior a 2,5 g/L. Una vez finalizada la fermentación alcohólica, los hollejos se retiraron y cada uno de los vinos obtenidos fue sulfitado (1 mL/L de solución de anhídrido sulfuroso a 100 g/L) e inoculado con bacterias lácticas (Uvaferm BETA, Lallemand, España) para asegurar el correcto desarrollo de la fermentación maloláctica. Los depósitos se guardaron en una cámara de temperatura controlada, a 20-21 °C. Semanalmente se llevó a cabo el seguimiento de la fermentación maloláctica mediante el análisis del ácido málico usando un equipo enzimático (Miura One, Tecnología Difusión Ibérica, Barcelona, España). La fermentación maloláctica se dio por finalizada cuando el contenido de ácido málico fue inferior a 0,5 g/L. A los dos meses de finalizar la fermentación maloláctica (diciembre de 2017 para los vinos elaborados en 2017 y enero de 2019 para los elaborados en 2018) se analizaron los parámetros físico-químicos de los vinos y se tomaron alícuotas de 50 mL para el análisis de aminoácidos, de compuestos fenólicos y de compuestos volátiles. Por último, los vinos se embotellaron y se almacenaron en

condiciones controladas de temperatura (18 °C), hasta que llegara el momento del análisis sensorial.

3.5. Parámetros físico-químicos de las uvas y de los vinos

Los parámetros físico-químicos evaluados en los mostos de ambas variedades fueron el alcohol probable, el pH y la acidez total, mientras que en los vinos se analizó el grado alcohólico, el pH, la acidez total, la acidez volátil y el sulfuroso libre y total, según los métodos establecidos por la OIV (2003). El nitrógeno fácilmente asimilable de los mostos fue estimado como la suma entre todos los aminoácidos y el amonio sin considerar la prolina y la hidroxiprolina (Garde-Cerdán et al., 2009). El índice de color (IC) y el índice de polifenoles totales (IPT) se analizaron mediante espectrofotometría (espectrofotómetro modelo UV-1800, Shimadzu, Kyoto, Japon). Para la cuantificación del contenido de ácido láctico, de ácido málico, y de azúcar residual se empleó el analizador enzimático Miura One (Tecnología Difusión Ibérica, Barcelona, España).

A continuación, se describen los parámetros físico-químicos analizados en las uvas y en los vinos.

Peso de 100 bayas: se pesaron 100 bayas de cada repetición en una balanza analítica. Se expresó en gramos.

Grado alcohólico probable: se midió tras la conversión de los sólidos solubles determinados por refractometría (°Brix).

pH: se midió usando un pH-metro (pH80 XS, LabProcess, Barcelona, España). Es la medición de la acidez real del mosto y del vino, expresada como la concentración de iones hidrógenos encontrados en forma libre en disolución.

Acidez total: es la determinación de los ácidos valorables del mosto o vino cuando se llevan a pH 7 añadiendo una solución alcalina valorada (NaOH a 0,1 N). Se midió usando un pH-metro (pH80 XS, LabProcess). Los datos se expresaron en g/L de ácido tartárico.

Grado alcohólico: el grado alcohólico volumétrico es igual al contenido de etanol en 100 L de vino. El grado alcohólico se determinó mediante ebullometría (ebullómetro electrónico GAB system).

Acidez volátil: la acidez volátil está constituida por los ácidos grasos pertenecientes a la serie acética que se encuentran en los vinos, en estado libre o salificado. La acidez volátil del vino se determinó mediante la valoración de los ácidos volátiles del vino, los cuales son separados por arrastre con vapor de agua. La valoración se hizo usando hidróxido de sodio estandarizado (0,1 N) en presencia de fenolftaleína como indicador. Los resultados se expresaron en g/L de ácido acético.

Anhídrido sulfuroso libre y total: el anhídrido sulfuroso es transportado a través de un flujo de aire o nitrógeno y es oxigenado por burbujeo a través de una solución neutra y diluida de peróxido de hidrógeno. El ácido sulfúrico formado se determinó por titulación con una solución estándar de hidróxido de sodio. El anhídrido sulfuroso libre del vino es separado por arrastre gaseoso a baja temperatura (10 °C). El anhídrido sulfuroso total del vino es separado por arrastre gaseoso a alta temperatura (aproximadamente 100 °C).

Azúcares reductores: los principales azúcares reductores que se encuentran en el vino son hexosas tales como la glucosa y la fructosa. El análisis del contenido de glucosa + fructosa se determinó para definir el fin de la fermentación alcohólica. En este trabajo los azúcares reductores fueron analizados enzimáticamente por el equipo Miura One (Tecnología Difusión Ibérica).

Ácidos orgánicos: los principales ácidos orgánicos de los vinos son los ácidos málico y láctico. El ácido málico es uno de los ácidos predominantes en la uva, y en el vino es transformado

en ácido láctico por acción de las bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica. Los ácidos málico y láctico en el vino se determinaron para definir el fin de la fermentación maloláctica. Ambos ácidos fueron analizados enzimáticamente por el equipo Miura One (Tecnología Difusión Ibérica).

Nitrógeno fácilmente asimilable: corresponde a la suma del amonio y de los aminoácidos del mosto sin considerar la prolina. Estos compuestos fueron analizados por HPLC mediante el método expuesto por Garde-Cerdán et al. (2009).

Índice de color: este índice se calculó como la sumatoria de las absorbancias medidas en las longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm en los vinos tintos usando un espectrofotómetro (modelo UV-1800, Shimadzu).

Índice de polifenoles totales: los compuestos fenólicos totales se expresaron como índice de polifenoles totales (IPT), diluyendo la muestra en agua (1:100) y analizándose mediante su lectura en un espectrofotómetro (modelo UV-1800, Shimadzu) a una longitud de onda de 280 nm.

3.6. Análisis de compuestos fenólicos, nitrogenados y volátiles en uvas y en vinos

3.6.1. Análisis de los compuestos fenólicos en uvas y en vinos

La extracción de los compuestos fenólicos de las uvas se realizó en base a la metodología expuesta por Niculcea et al. (2015). Las uvas fueron descongeladas y trituradas usando un mezclador de dispersión de alto rendimiento Ultra Turrax (IKA, Staufen, Alemania) a 18.000 rpm durante 2 min. A continuación, se pesó y se transfirió 1 g de la mezcla homogenizada a un tubo cónico de centrífuga de 15 mL y se le añadieron 10 mL de disolución acuosa de etanol al 50 % (v/v) y pH 2,0. La extracción se realizó en un baño de ultrasonido (Bandelin, Berlín, Alemania) durante 1 h. Los tubos se centrifugaron a 4.000 rpm durante 15 min a una temperatura de 10 °C

(Heraeus Megafuge 16/16R, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EE. UU.). Para la obtención del extracto de uva, el sobrenadante se filtró a través de filtros de membranas Durapore® de 0,45 µm (filtros de jeringa PVDF, Proquinorte, Bilbao, España) y se colocó en viales de ámbar de 2 mL para ser inyectadas en el HPLC. Los vinos fueron filtrados directamente a través de los filtros de membranas Durapore® y se colocaron en viales de ámbar de 2 mL para ser inyectadas en el HPLC.

Los compuestos fenólicos de las uvas y de los vinos se analizaron de acuerdo con la metodología expuesta por González-Lázaro et al. (2019) usando un HPLC Agilent 1100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EE. UU.), equipado con un detector de diodo array (DAD). Los antocianos, los flavonoles, los flavanoles, los ácidos hidroxibenzoicos, los ácidos hidroxicinámicos y los estilbenos se analizaron por HPLC-DAD mediante la inyección directa de 25 µL del extracto de uva o de vino previamente filtrada a través de filtros de membranas de 0,45 µm. La separación de los analitos se realizó en una columna LiChrospher 100 RP-18 (Scharlab, Barcelona, España) de tamaño de partícula de 5 µm (250 × 4 mm de diámetro interno) protegida con una pre-columna del mismo material. Las fases móviles utilizadas fueron: (Fase A) 50 mM de NH₄H₂PO₄ a pH 2,6, (Fase B) acetonitrilo/50 mM de NH₄H₂PO₄ a pH 2,6 (80:20 % v/v) y (Fase C) 200 mM de ácido *o*-fosfórico a pH 1,5, estableciendo el siguiente gradiente isocrático: 0 % B y 0 % C durante 5 min, de 0 a 8 % de B en 12 min, de 8 a 14 % de B y de 0 a 86 % de C en 5 min, de 14 a 18 % de B y de 86 a 82 % de C en 7 min, de 18 a 21 % de B y de 82 a 79 % de C en 26 min, de 21 a 33 % de B y de 79 a 67 % de C en 15 min, de 33 a 50 % de B y de 67 a 50 % de C en 8 min, de 50 a 80 % de B y de 50 a 0 % de C en 8 min, a un flujo constante de 1 mL/min. Los espectros se registraron entre las longitudes de onda de 250 nm y 600 nm. Los compuestos fenólicos se identificaron de acuerdo con el tiempo de retención de los compuestos puros disponibles y con las características espectrales UV-Vis de los estándares correspondientes. En

este método fueron utilizados diferentes longitudes de onda, a modo de cuantificar las diferentes familias de compuestos fenólicos. Se adquirieron los cromatogramas a 520 nm (antocianos), a 360 nm (flavonoles), a 320 nm (ácidos hidroxicinámicos), a 310 nm (estilbenos) y a 280 nm (ácidos hidroxibenzoicos y flavanoles). Dado que la mayoría de los compuestos fenólicos individuales no estaban disponibles comercialmente como patrones de referencia, la cuantificación de los compuestos fenólicos en las uvas y en los vinos se realizó de acuerdo con los gráficos de calibración de los compuestos más similares a través de una curva de calibración ($R^2 > 0,991$), a partir de lo establecido por González-Lázaro et al. (2019). Los antocianos se cuantificaron a partir de la malvidina-3-*O*-glucósido; los derivados de la quercetina a partir de la quercetina-3-*O*-glucósido; los derivados de la miricetina a partir de la miricetina-3-*O*-glucósido; los derivados del kaempferol a partir del kaempferol-3-*O*-glucósido; los derivados de la isorhamnetina a partir de la isorhamnetina; el ácido *cis*-caftárico y el ácido cafeico a partir del ácido *trans*-caftárico; los ácidos *cis*-cutárico y *trans*-cutárico a partir del ácido *p*-cumárico; los isómeros *cis* del resveratrol y del piceido a partir de sus correspondientes isómeros *trans*. Las concentraciones en las muestras de uva se expresaron en mg/kg de uva, mientras que las concentraciones en los vinos se expresaron en mg/L.

3.6.2. Análisis de los aminoácidos y del amonio en los mostos y en los vinos

La determinación de los aminoácidos en los mostos y en los vinos se realizó mediante la metodología propuesta por Gómez-Alonso et al. (2007) con algunas modificaciones expuestas por Garde-Cerdán et al. (2009). Previo al análisis de estos compuestos, los aminoácidos y el amonio de las muestras se derivatizaron. Para esto, dentro de un tubo de ensayo se agregaron 1,75 mL de tampón borato 1 M a pH 9, 0,75 mL de metanol, 1 mL de la muestra de mosto o vino, 20 μ L del

estándar interno (L-2-ácido aminoadipídico a 1g/L) y 30 μ L de dietilo etoximetilenmalonato (DEEMM). Las muestras se llevaron a un baño ultrasonido (Sonorel digital 10P, Bandelin, Berlín, Alemania) durante 30 min para que tuviera lugar la reacción de derivatización, y posteriormente se mantuvieron durante 2 h en un calentador de temperatura constante (Dri-Block DB 3D, Techne) a 75 °C con el objetivo de degradar completamente el exceso de DEEMM y subproductos de reacción. Las muestras obtenidas se filtraron con filtros PVDF de 0,45 μ m y puestas en viales transparentes para su inyección en el HPLC.

El análisis de aminoácidos se realizó en un cromatógrafo de líquidos de ultra-alta resolución (UHPLC) (Nexera X2, Shimadzu, Kioto, Japón). La separación cromatográfica fue llevada a cabo en una columna ACE C18-HL (Advanced Chromatography Technologies Ltd, Aberdeen, Reino Unido), ajustada a una temperatura de 20 °C. Las muestras se eluyeron a un flujo constante de 0,9 mL/min manteniendo 10 % de la fase B durante 20 min. Posteriormente, se establecieron los siguientes gradientes isocráticos: de 10 al 17 % de fase B en 10 min, de 17 al 19 % de fase B en 0,01 min, mantenida durante 0,99 min, de 19 al 19,5 % de fase B en 0,01 min, de 19,5 al 23 % de fase B en 8,5 min, de 23 al 29,4 % de fase B en 20,6 min, de 29,4 al 72 % de fase B en 8 min, de 72 al 82 % de fase B en 5 min, de 82 al 100 % de fase B en 7 min, seguido de un lavado y reacondicionamiento de la columna durante 10 min. La fase A consistió en una disolución de 25 mM de tampón acetato ajustada a pH 5,83 a la que se le agregó 0,2 g/L de azida de sodio, mientras que la fase B se compuso de una mezcla 80:20 % (v/v) de acetonitrilo y metanol, respectivamente. El volumen de inyección fue de 20 μ L para mostos y 50 μ L para vinos. Para la detección, se usó un detector de diodo array (DAD) a 280 nm. Así, el ácido aspártico (Asp), el ácido glutámico (Glu), la serina (Ser), la hidroxiprolina (HoPro), la glutamina (Gln), la histidina (His), la glicina (Gly), la citrulina + treonina (Cit + Thr), la arginina (Arg), la alanina (Ala), el

ácido γ -aminobutírico (Gaba), la prolina (Pro), la tirosina (Tyr), la valina (Val), la metionina (Met), la cisteína (Cys), la isoleucina (Ile), el triptófano (Trp), la leucina (Leu), la fenilalanina (Phe), la ornitina (Orn), la lisina (Lys) y el amonio (NH_4^+) se separaron, identificaron y cuantificaron. Los aminoácidos y el amonio se identificaron de acuerdo con los tiempos de retención y con las características espectrales UV-Vis de los estándares correspondientes. La cuantificación de los compuestos nitrogenados se realizó utilizando los gráficos de calibración de cada estándar respectivo ($R^2 > 0,91$), usando el método de patrón interno. Las rectas de calibrado se hicieron usando seis puntos de calibración, los cuales se sometieron al mismo proceso de derivatización de las muestras de mosto y de vino, pero en una disolución de HCl (0,1 N). La calibración se realizó usando un pool que contenía una disolución de tampón de citrato de litio (0,2 N) a pH 2,20 con los estándares de aminoácidos y de amonio (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

3.6.3. Análisis de los compuestos volátiles en los mostos y en los vinos

3.6.3.1. Análisis de los compuestos volátiles en los mostos

Los compuestos volátiles de los mostos se analizaron de acuerdo con la metodología expuesta por Garde-Cerdán et al. (2015a). En un vial de espacio de cabeza de 20 mL, se añadieron 2,5 g de NaCl, 10 μL de 2-octanol (usado como patrón interno) y 9 mL de muestra de mosto. Las muestras se acondicionaron durante 15 min a 60 °C con agitación permanente a 500 rpm usando un automuestreador (MPS) (Gerstel, Mülheim del Ruhr, Alemania). Para la extracción de los compuestos volátiles del mosto se utilizó una fibra de microextracción en fase sólida (SPME) compuesta de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS, 50/30 μm) (Supelco, Bellenfonte, PA, EE. UU.). Los compuestos volátiles se analizaron usando un cromatógrafo de gases 7890B con un detector de masa de triple cuadrupolo 7000C, operando en

modo simple, de la marca comercial Agilent Technologies (Palo Alto, CA, EE. UU.). Los analitos se separaron usando una columna capilar (SPBTM-20) (30 m × 0,25 mm de diámetro interno × 0,25 μm de espesor de película) (Supelco, Sigma-Aldrich, Madrid, España). La extracción de los compuestos volátiles se realizó a una temperatura de 60 °C durante 105 min con agitación constante. El MPS introdujo automáticamente la fibra SPME en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. La temperatura del inyector se configuró a 250 °C y la fibra SPME se mantuvo ahí durante 15 minutos para que los analitos contenidos en la fibra fueran desorbidos térmicamente. Se usó helio como gas portador a una velocidad de flujo constante de 1,2 mL/min. Las inyecciones se realizaron en modo “splitless” (1 min), en donde una vez volatilizada, toda la muestra pasa a la columna. La separación cromatográfica se realizó en base al siguiente gradiente de temperatura: el horno se mantuvo inicialmente a 40 °C durante 5 min, y la temperatura se incrementó a una velocidad de 2 °C/min hasta llegar a los 220 °C. Las adquisiciones se realizaron en *Full Scan*, es decir, mediante un barrido completo de la muestra obteniendo un registro total de todos los iones (35-300 m/z). La identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo utilizando la biblioteca NIST y comparando los espectros de masas con los estándares cromatográficos disponibles (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Para la cuantificación de los compuestos volátiles de la uva, se realizó una semicuantificación, relacionando las áreas de cada compuesto con el área y la concentración conocida del patrón interno (2-octanol).

3.6.3.2. Análisis de los compuestos volátiles en los vinos

Los compuestos volátiles de los vinos se analizaron siguiendo la metodología establecida por Rubio-Bretón et al. (2018b) basado en el método desarrollado por Moreno et al. (2017). Las muestras de vino fueron centrifugadas a 4.000 rpm a una temperatura de 4 °C durante 15 min. En

un tubo de ensayo se añadió una barra de agitación magnética, 10 μL de 2-octanol (patrón interno), 8 mL de vino y 400 μL de diclorometano (Merck, Darmstadt, Alemania). La extracción de los compuestos volátiles se realizó agitando las muestras de vino durante 15 min usando un agitador magnético digital (MultiMix D, Ovan, Barcelona, España). Inmediatamente después, las muestras se pusieron en un congelador vertical y se enfriaron durante 10 min. Posteriormente, la barra de agitación magnética fue retirada, y la fase orgánica se separó por centrifugación a 5.000 rpm durante 10 min a 4 °C. El extracto depositado en el fondo del tubo de ensayo se recuperó en un inserto para viales de cromatografía (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Los compuestos volátiles en los vinos se analizaron en el mismo equipo utilizado para el análisis de los compuestos volátiles en los mostos (Apartado 3.6.3.1). 2 μL de cada muestra se inyectaron en modo “split”, donde una vez volatilizada la muestra se despreceia una fracción de volumen inyectado (1:15) en una columna capilar VF-WAXms (60 m \times 0,25 mm de diámetro interno \times 0,25 μm de espesor de película) (CP9207, Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.). La fase móvil consistió en helio, el cual fue usado como gas de arrastre a una velocidad de flujo constante de 1 mL/min. La temperatura del inyector se ajustó inicialmente a 40 °C y posteriormente llegó a 250 °C a una velocidad de calentamiento de 180 °C/min. La temperatura del horno se mantuvo a 50 °C durante 2 min, y luego se programó para que aumentara de 50 °C a 250 °C, a una velocidad de calentamiento de 3 °C/min. El detector se operó en el modo de impacto electrónico (70 eV), con un rango de adquisición de 29 a 260 (m/z). La identificación de los compuestos volátiles se llevó a cabo utilizando la biblioteca NIST y comparando los espectros de masas con los estándares cromatográficos disponibles (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Para la cuantificación de los compuestos volátiles del vino, se realizó una semicuantificación, relacionando las áreas de cada compuesto con el área y la concentración conocida del patrón interno (2-octanol).

3.7. Análisis sensorial

Catorce jueces expertos configuraron el panel de análisis sensorial de los vinos de Tempranillo Blanco. El panel estuvo formado por nueve mujeres y cinco hombres con una edad de entre 21 y 44 años. El análisis sensorial de los vinos se realizó 5 meses después del embotellado.

3.7.1. Tempranillo Blanco

De cada réplica se tomaron dos botellas de 750 mL (un total de 18 botellas) y se colocaron en una cámara fría (a 5-6 °C) un día antes de la evaluación sensorial del vino para que los sólidos decantaran en el fondo de la botella.

Los nueve vinos fueron evaluados de forma comparativa, utilizando el sistema de cata a ciegas. La hoja de cata utilizada fue la aprobada por la OIV (2009) con una escala de 40 (insuficiente) a 100 (excelente). El análisis también incluyó una evaluación cuantitativa de diez descriptores aromáticos como son el cítrico, las frutas tropicales de hueso y blancas, floral, especiado, alcohólico, herbáceo, balsámico y lácteo, y seis atributos gustativos, como son el dulzor, la acidez, el amargor, el alcohol, la astringencia y el equilibrio (Tabla 5). Los catadores calificaron cada atributo en una escala de 0 (ausencia) a 10 (presencia máxima). Todas las catas se realizaron en copas de cristal transparente a temperatura ambiente y en bloques individuales. Durante el análisis sensorial del vino, las muestras se presentaron en orden aleatorio.

3.7.2. Tempranillo

El día anterior a la cata, se tomaron dos botellas de 750 mL de cada réplica y se colocaron en una cámara fría a una temperatura de 5-6 °C. Los vinos fueron evaluados de acuerdo con el protocolo descrito por Rubio-Bretón et al. (2018b) de manera comparativa, utilizando el sistema

de cata a ciegas de forma aleatoria. La hoja de cata utilizada presenta una escala, determinada por la OIV (2009), para calificar los vinos como insuficientes (40 puntos) a excelentes (100 puntos). El análisis sensorial también incluyó una evaluación cuantitativa de los siguientes atributos: compota, frutos rojos, frutos negros, frutos blancos, floral, especiado, ahumado, alcohólico, herbáceo, balsámico, sotobosque y láctico, los cuales se agruparon por fase olfativa, por su parte el dulzor, la acidez, el amargor, el alcohol, la astringencia y el equilibrio fueron atributos agrupados en la fase gustativa (Tabla 6). Los jueces señalaron cada atributo sensorial en una escala desde su ausencia (0 puntos) hasta su máxima presencia (10 puntos). Las catas de vino se hicieron con las muestras presentadas en orden aleatorio, al azar en copas de cristal transparente a temperatura ambiente y en bloques individuales.

Tabla 5. Ejemplo de la ficha de cata usada para el análisis sensorial de los vinos de Tempranillo Blanco.

		Excelente	Muy Bueno	Bueno	Regular	Insuficiente	Observaciones
Vista	Limpidez	5	4	3	2	1	
	Color	10	8	6	4	2	
Olfato	Intensidad	8	7	6	4	2	
	Franqueza	6	5	4	3	2	
	Calidad	16	14	12	10	8	
Gusto	Intensidad	8	7	6	4	2	
	Franqueza	6	5	4	3	2	
	Calidad	22	19	16	13	10	
	Persistencia	8	7	6	5	4	
Armonía / Juicio global		11	10	9	8	7	

Fase Visual	Color	Amarillo pajizo Amarillo verdoso Amarillo dorado									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fase Olfativa	Fruta cítrica (limón, naranja, mandarina...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Fruta tropical (piña, plátano, maracuyá...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Fruta de hueso (melocotón, albaricoque...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Fruta blanca (manzana, pera...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Floral (rosa, violeta, flor almendro...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Especiado (pimienta, clavo, nuez moscada...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Alcohólico (alcohol)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Vegetal (pimiento verde, herbáceo...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Balsámicos (eucalipto, regaliz, menta...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Lácteo (leche, levadura, yogur...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Oxidación (patata cocida, amielado...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Reducción (azufrado, huevo podrido, coliflor...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Otros:.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fase Gustativa	Dulce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Ácido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Amargo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Alcohol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Astringencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Equilibrio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Tabla 6. Ejemplo de la ficha de cata usada para el análisis sensorial de los vinos de Tempranillo.

		Excelente	Muy Bueno	Bueno	Regular	Insuficiente	Observaciones
Vista	Limpidez	5	4	3	2	1	
	Color	10	8	6	4	2	
Olfato	Intensidad	8	7	6	4	2	
	Franqueza	6	5	4	3	2	
	Calidad	16	14	12	10	8	
Gusto	Intensidad	8	7	6	4	2	
	Franqueza	6	5	4	3	2	
	Calidad	22	19	16	13	10	
	Persistencia	8	7	6	5	4	
Armonía / Juicio global		11	10	9	8	7	

Fase Visual	Color	Rojo violeta Rojo púrpura Rojo granate Rojo rubí Rojo teja									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fase Olfativa	Fruta pasa/compotada (uva pasa, ciruela, pasa...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Fruta roja (fresa, cereza, frambuesa...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Fruta negra (mora, casis...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Fruta blanca (manzana, pera...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Floral (rosa, violeta, flor almendro...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Especiado (pimienta, clavo, nuez moscada...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Ahumado (humo, torrefacto)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Alcohólico (alcohol)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Vegetal (pimiento verde, herbáceo...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Balsámicos (eucalipto, regaliz, menta...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Sotobosque (moho, humedad, champiñón...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Lácteo (leche, levadura, yogur...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Oxidación (patata cocida, amielado...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Reducción (azufrado, huevo podrido, coliflor...)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Otros:.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fase Gustativa	Dulce	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Ácido	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Amargo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Alcohol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Astringencia	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Equilibrio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

3.8. Análisis estadístico

Los parámetros enológicos, los compuestos nitrogenados, fenólicos, volátiles y el análisis sensorial se sometieron a un análisis de la varianza (ANOVA unifactorial), el cual se realizó en el software Statgraphics Centurion XVI.I (Warrento, Virginia, EE. UU.). Las diferencias entre las muestras fueron comparadas mediante la prueba de Duncan ($p \leq 0,05$). También se realizó un análisis multifactorial considerando los parámetros anteriormente mencionados. El análisis de componentes principales (ACP) se realizó usando la concentración individual (para los compuestos nitrogenados, fenólicos y volátiles) y total (para los compuestos fenólicos y volátiles) de los compuestos analizados en las uvas y en los vinos durante ambas añadas de estudio (2017 y 2018), a través del software InfoStat (InfoStat, www.infostat.com.ar).

4. Resultados

En este capítulo se presentan los trabajos publicados o en su defecto, los que están en proceso de publicación, en distintas revistas científicas internacionales de alto impacto relacionadas principalmente con los tópicos de tecnología y/o química de los alimentos, agricultura y horticultura. Se muestran los resultados del estudio de la aplicación foliar de los tratamientos de algas a las vides de Tempranillo Blanco y de Tempranillo en la composición fenólica, nitrogenada y volátil de las uvas y de los vinos. En cada apartado se presentan cada una de las publicaciones correspondientes a los objetivos de la presente Tesis Doctoral acompañadas de un resumen con los principales resultados obtenidos en cada una de ellas.

4.1. Influencia de la aplicación foliar del alga *Ascophyllum nodosum* en la composición fenólica, nitrogenada y volátil de las uvas y de los vinos de Tempranillo Blanco

4.1.1. Publicación n°1

Título: Phenolic composition of Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) grapes and wines after biostimulation through a foliar seaweed application.

Publicado en: Journal of the Science of Food and Agriculture (2020), 100, 825-835. Factor de impacto: 2.422. Cuartil: Q1 (Agricultura, Multidisciplinaria).

Autores: Gastón Gutiérrez Gamboa, Teresa Garde Cerdán, Leticia Martínez Lapuente, Bianca Souza da Costa, Pilar Rubio Bretón y Eva Pilar Pérez Álvarez.

Resumen:

Los objetivos de este trabajo fueron evaluar el efecto de la aplicación foliar de dos dosis de un extracto comercial del alga *Ascophyllum nodosum* a las vides de la variedad Tempranillo Blanco en el contenido de compuestos fenólicos de la uva y del vino durante las añadas 2017 y 2018, así como también caracterizar estos compuestos en las uvas y en los vinos de esta variedad. La aplicación consistió en una dosis baja a 0,25 % (v/v) y una dosis alta a 0,50 % (v/v) del extracto del alga realizadas en el estado fenológico de envero y una semana después. La precipitación anual y la evapotranspiración de referencia (ET₀) en 2017 fue de 180 mm y de 893 mm, respectivamente, mientras que en 2018 fue de 354 mm y 790 mm, respectivamente. La humedad relativa en 2017 fue de 60,1 % y en 2018 fue de 69,4 %.

Los resultados mostraron que en ambas añadas, la aplicación de la dosis alta del alga a las vides de Tempranillo Blanco aumentó la concentración de catequina, y de la mayoría de los flavonoles de la uva, incluida su concentración total comparado al control. La aplicación de la dosis baja del alga a las vides dio lugar a vinos con el mayor contenido de catequina en 2017, mientras que la aplicación de la dosis alta dio lugar a vinos con un mayor contenido de catequina que las muestras de vino de control en 2018. Los tratamientos aplicados a las vides apenas afectaron a la concentración de los ácidos hidroxicinámicos de las uvas y de los vinos y no afectaron al contenido de estilbenos de los vinos. En 2017, las vides tratadas con la dosis alta del alga produjeron uvas con un mayor contenido de ácido siríngico en comparación a las uvas de las vides tratadas con la dosis baja del alga, mientras que en 2018, la aplicación de la dosis baja del alga produjo uvas con el contenido más bajo de ácido siríngico. La aplicación de la dosis alta dio lugar a vinos con el mayor contenido de ácido gálico y de ácido hidroxicinámicos totales en 2017, mientras que en 2018 los tratamientos no afectaron al contenido de los ácidos hidroxicinámicos del vino.

La concentración de catequina en las uvas y en los vinos fue mayor en 2017 que en 2018, mientras que el contenido de ácido siríngico en las uvas fue mayor en 2018 que en 2017. Los vinos del 2017 presentaron un mayor contenido de ácido *cis*-caftárico, de ácido gálico y de ácidos hidroxibenzoicos totales que los vinos del 2018, mientras que el ácido *p*-cumárico, el ácido siríngico y los estilbenos mostraron un mayor contenido en 2018 que en 2017. Es posible que las diferencias anuales en el contenido de estos compuestos fenólicos puedan ser atribuidas a la mayor presión de enfermedades debido a las altas precipitaciones y humedad relativa ocurrida en 2018.

La catequina fue el único flavanol identificado y el compuesto fenólico más abundante que se encontró en las uvas y en los vinos de la variedad Tempranillo Blanco. La quercetina-3-*O*-

glucósido y la quercetina-3-*O*-glucurónido fueron los flavonoles más abundantes encontrados en las uvas de esta variedad. Los flavonoles de tipo quercetina dominaron el perfil de flavonoles de las uvas Tempranillo Blanco, seguidos por los de tipo kaempferol y finalmente por los de tipo isorhamnetina. Los ácidos hidroxicinámicos fueron la familia más importante de compuestos fenólicos analizados en los vinos Tempranillo Blanco. Los ácidos *trans*-caftárico, *cis*-cutárico y cafeico fueron los ácidos hidroxicinámicos más abundantes en las uvas Tempranillo Blanco, mientras que el menos abundante fue el ácido *trans*-cutárico. Los estilbenos más abundantes encontrados en los vinos Tempranillo Blanco fueron el *trans*-resveratrol y el *trans*-piceido.

En síntesis, los resultados muestran que la catequina fue el compuesto fenólico más abundante en las uvas y en los vinos de la variedad Tempranillo Blanco. El perfil de flavonoles de las uvas de esta variedad estuvo dominado por los de tipo quercetina, seguido por los flavonoles de tipo kaempferol y finalmente, los de tipo isorhamnetina. La aplicación de la dosis alta del extracto del alga a las vides de Tempranillo Blanco aumentó la concentración de catequina y la mayoría de los flavonoles individuales en las uvas en 2017 y 2018, mientras que la aplicación de la dosis baja no tuvo efectos significativos en el contenido de los compuestos fenólicos analizados en las uvas y en los vinos. Los incrementos en el contenido de flavonoles tras la aplicación de la dosis alta del extracto de alga oscilaron entre un 42 y un 308 % comparado a los efectos en las vides sin tratar. Los resultados de este trabajo sugieren que las algas pueden actuar como inductores bióticos regulando la actividad de las enzimas relacionadas con la acumulación de ciertos compuestos fenólicos, principalmente de la catequina y de los flavonoles en las uvas de la variedad Tempranillo Blanco, independiente de las condiciones climáticas de la añada.

4.1.2. Publicación nº2

Título: Study of must and wine amino acids composition after seaweed applications to Tempranillo blanco grapevines.

Publicado en: Food Chemistry (2020), 308, 125605. Factor de impacto: 5.399. Cuartil: Q1 (Ciencia y Tecnología de los Alimentos).

Autores: Gastón Gutiérrez Gamboa, Teresa Garde Cerdán, Pilar Rubio Bretón y Eva Pilar Pérez Álvarez.

Resumen:

Durante los últimos años se ha demostrado que la aplicación foliar de algas a las vides puede desencadenar la síntesis de ciertos metabolitos secundarios en las uvas, en especial de los compuestos fenólicos. Sin embargo, hasta la fecha, no existen estudios que evalúen su efecto en el contenido de compuestos nitrogenados en las uvas y en los vinos. Por otro lado, la producción y la elaboración de uva y de vino de la variedad Tempranillo Blanco ha sido recientemente autorizada por la Denominación de Origen Calificada (D.O.Ca.) Rioja y no existen estudios que caractericen la composición nitrogenada de los mostos y de los vinos de esta variedad.

Por lo tanto, los objetivos de este estudio fueron evaluar los impactos de la aplicación foliar de una dosis alta (0,50 % v/v) y de una dosis baja (0,25 % (v/v) de un extracto comercial del alga *Ascophyllum nodosum* a las vides de la variedad Tempranillo Blanco en el contenido de los aminoácidos y del amonio del mosto y del vino durante dos añadas consecutivas (2017 y 2018),

así como también caracterizar el contenido de los aminoácidos del mosto y del vino de esta variedad.

Los resultados climáticos mostraron que la añada 2017 fue más seca que la añada 2018. Así, en 2017, la precipitación anual caída fue de 180 mm y en 2018 fue de 354 mm, mientras que la evapotranspiración de referencia (ET_0) fue de 893 mm en 2017 y de 790 mm en 2018. La humedad relativa fue de 60,1 % en 2017 y de 69,4 % en 2018.

Los aminoácidos más abundantes encontrados en los mostos de la variedad Tempranillo Blanco fueron la arginina, el ácido glutámico, la citrulina + treonina, la glutamina, el ácido aspártico y la α -alanina, los cuales representaron un 69,6 % del total de aminoácidos; mientras que los aminoácidos menos abundantes fueron la leucina, la isoleucina, la metionina, la lisina, la ornitina y la glicina, los que representaron un 2,5 % del total de aminoácidos. La relación prolina a arginina de los mostos de Tempranillo Blanco fue inferior a 1 en todas las muestras. La prolina de forma individual representó el 84,2 % del total de los aminoácidos en los vinos. La cisteína no se identificó en los mostos, mientras que si se encontró en los vinos.

En 2017, la dosis baja del extracto del alga aplicada foliarmente a las vides de Tempranillo Blanco no afectó significativamente el contenido de los aminoácidos del mosto. Sin embargo, la dosis alta del extracto del alga aplicada a las vides de Tempranillo Blanco aumentó la concentración en el mosto del ácido γ -aminobutírico, del ácido aspártico, del ácido glutámico, de la α -alanina, de la arginina, de la citrulina + treonina, de la fenilalanina, de la glutamina, de la isoleucina, de la leucina, de la lisina, de la serina, de la tirosina, del triptófano y de la valina. En 2018, los tratamientos aplicados a las vides no tuvieron un efecto significativo en el contenido de aminoácidos del mosto. Es importante destacar que, la aplicación de la dosis alta del alga a las vides aumentó la concentración de fenilalanina y de isoleucina del mosto en 2017 y 2018. La

concentración de la mayoría de los aminoácidos y del amonio en los mostos fue mayor en 2018 que en 2017, mientras que la concentración de prolina y de tirosina fue mayor en los mostos del 2017 que en los del 2018.

La concentración de aminoácidos del vino fue afectada en mayor medida por el contenido inicial de nitrógeno fácilmente asimilable del mosto. La concentración de la mayoría de los aminoácidos de los vinos control fue mayor en 2018 que en 2017. El contenido de ciertos aminoácidos en los vinos tales como el ácido glutámico, la ornitina y el triptófano fue mayor en 2018, mientras que el contenido de cisteína, de glutamina y de tirosina fue mayor en 2017.

En síntesis, la variedad Tempranillo Blanco se comportó como una variedad acumuladora de arginina. En 2017, la dosis alta del alga aplicada a las vides aumentó la concentración de varios de los aminoácidos analizados en los mostos en comparación con las muestras control, mientras que, en 2018, los tratamientos no tuvieron efectos significativos en la concentración de los aminoácidos del mosto. Los tratamientos fueron más efectivos en la estación más seca, factor que se vio afectado por las condiciones climáticas de la añada. La dosis alta del alga aplicada foliarmente a las vides aumentó la concentración de fenilalanina en el mosto en ambas añadas, indicando probablemente que las aplicaciones de algas a nivel foliar, pueden ejercer un efecto elicitor en las vides de la variedad Tempranillo Blanco.

4.1.3. Publicación nº3

Título: Seaweed foliar applications at two dosages to Tempranillo Blanco (*Vitis vinifera* L.) grapevines in two seasons: Effects on grape and wine volatile composition.

Publicado en: Food Research International (2020), 130, 108918. Factor de impacto: 3.579.

Cuartil: Q1 (Ciencia y Tecnología de los Alimentos).

Autores: Gastón Gutiérrez Gamboa, Teresa Garde Cerdán, Pilar Rubio Bretón y Eva Pilar Pérez Álvarez.

Resumen:

El objetivo principal de este trabajo fue evaluar el efecto de una dosis baja (0,25 % v/v) y una dosis alta (0,50 % v/v) de un extracto comercial del alga *Ascophyllum nodosum* aplicado foliarmente a las vides de Tempranillo Blanco en el contenido de compuestos volátiles de la uva y del vino en las añadas 2017 y 2018. El objetivo secundario de este trabajo fue caracterizar la composición volátil del mosto y del vino Tempranillo Blanco. Los compuestos volátiles fueron analizados por cromatografía gaseosa y el análisis sensorial de los vinos se realizó por medio de un panel de catorce catadores expertos.

Los resultados mostraron que los terpenos más abundantes en los mostos Tempranillo Blanco fueron la geranil acetona, el α -terpineol, el ρ -cimeneno, el ρ -cimeno y el linalool. En 2017, el tratamiento de la dosis baja del extracto del alga aplicada a las vides de Tempranillo Blanco disminuyó el contenido de geraniol, de linalool y de α -terpineol en los mostos, mientras que la aplicación de la dosis alta disminuyó la concentración de geraniol. En 2018, los tratamientos no

afectaron el contenido de terpenos en los mostos. La concentración de linalool, de ρ -cimeno y de α -terpineol fue mayor en 2017, mientras que el contenido de geraniol fue mayor en 2018. El compuesto varietal más abundante en los mostos de Tempranillo Blanco fue la (E)- β -damascenona. En general, los tratamientos no afectaron a la concentración de C₁₃ norisoprenoides de los mostos. El contenido de β -ionona y de β -ciclocitral fue mayor en 2017 que en 2018. El acetato de hexilo, el 2-hexanoato de etilo y el salicilato de metilo fueron los únicos ésteres identificados en los mostos. El salicilato de metilo fue el éster más abundante en 2017. La dosis baja del alga disminuyó la concentración de salicilato de metilo y de ésteres totales, mientras que la aplicación de la dosis alta aumentó el contenido de acetato de hexilo. En 2018, las aplicaciones no afectaron la concentración de ésteres en los mostos. El benzaldehído y el alcohol bencílico fueron los bencénicos más abundantes en los mostos. En 2017, la dosis baja del alga disminuyó el contenido de 2-feniletanal y 2-feniletanol. En 2018, ambos tratamientos disminuyeron el contenido de 2-feniletanol y la dosis baja del alga disminuyó la concentración de alcohol bencílico en los mostos. La concentración total de bencénicos y del benzaldehído fue más alta en 2018 que en 2017, mientras que el contenido de alcohol bencílico fue más alto en 2017 que en 2018. El 1-octenol fue el alcohol más abundante en los mostos. En 2017, la dosis baja del alga disminuyó la concentración de 1-nonanol, de 1-octenol y de los alcoholes totales, mientras que en 2018, aumentó el contenido de 1-octenol y de los alcoholes totales. La concentración del alcohol bencílico fue mayor en 2017, mientras que la concentración de alcoholes totales fue mayor en 2018. El nonanal y el E,E-2,4-hexadienal fueron los compuestos carbonílicos más abundantes en los mostos. En 2017, la dosis baja del alga disminuyó la concentración de octanal, de decanal, de nonanal, y de los carbonílicos totales. En 2018, los tratamientos no afectaron el contenido de los compuestos carbonílicos en los mostos. La concentración de decanal, de nonanal y de los compuestos

carbonílicos totales fue mayor en 2017 que en 2018, mientras que el contenido de E,E-2,4-heptadienal y de γ -decalactona fue mayor en 2017 que en 2018. Los compuestos C6 fueron la familia más abundante de compuestos volátiles en los mostos, siendo el (E)-2-hexenal y el hexanal los compuestos C6 más abundantes. En 2018, ambos tratamientos aumentaron el contenido de hexanal en los mostos. La concentración de (Z)-3-hexenol y de (E)-2-hexenal fue mayor en 2018 que en 2017, mientras que el contenido de hexanal fue mayor en 2017 que en 2018.

Los tratamientos apenas afectaron al contenido de los compuestos volátiles en los vinos en 2017, mientras que los vinos control mostraron una mayor concentración en la mayoría de los compuestos volátiles en 2018. La concentración de 2-feniletanol, de isobutanol, de alcohol bencílico, de los alcoholes superiores totales y de acetato de 2-feniletilo fue mayor en 2017 que en 2018, mientras que el contenido de (Z)-3-hexenol, de acetato de hexilo, de octanoato de etilo, de decanoato de etilo, de acetato de isoamilo, de lactato de etilo, de ácido octanoico, de ácido isobutírico y de los ácidos grasos totales fue mayor en 2018 que en 2017.

En síntesis, los compuestos C6, como el (E)-2-hexenal, el (E)-2-hexenol y el hexanal fueron los compuestos volátiles más abundantes en los mostos. La (E)- β -damascenona fue el compuesto varietal más importante de esta variedad. La concentración de terpenos y de C₁₃ norisoprenoides fue escasamente afectada por la aplicación de los tratamientos a las vides. La dosis alta del alga tendió a aumentar el contenido de compuestos C6 en los mostos. Los tratamientos apenas afectaron la concentración de los compuestos volátiles del vino en 2017, mientras que los vinos control mostraron el mayor contenido de varios compuestos volátiles en los vinos producidos en 2018. El panel sensorial no mostró las mismas diferencias que el análisis químico del mosto, probablemente porque estas diferencias no fueron amplias en su concentración. Estos fueron los primeros resultados publicados respecto a la composición volátil del mosto de Tempranillo Blanco.

4.2. Influencia de la aplicación foliar del alga *Ascophyllum nodosum* en la composición fenólica, nitrogenada y volátil de las uvas y de los vinos Tempranillo

4.2.1. Publicación nº4

Título: *Ascophyllum nodosum* applications to Tempranillo grapevines: Effects on grape and wine phenolic compounds.

Enviado: Australian Journal of Grape and Wine Research. Factor de impacto: 2.343. Cuartil: Q1 (Horticultura).

Autores: Gastón Gutiérrez Gamboa, Teresa Garde Cerdán, Belén Ayestarán, Miriam González-Lázaro, Pilar Rubio Bretón y Eva Pilar Pérez Álvarez.

Resumen:

Se ha demostrado que la aplicación foliar de algas en las vides desencadena la síntesis de ciertos compuestos fenólicos en las uvas, en especial de antocianos. Sin embargo, hasta la fecha no existen estudios acerca de sus efectos en el contenido de estilbenos en los vinos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de una dosis baja (0,25 % v/v) y una dosis alta (0,50 % v/v) de un extracto comercial del alga *Ascophyllum nodosum* a las hojas de vides de la variedad Tempranillo en el contenido de compuestos fenólicos de la uva y del vino durante dos añadas (2017 y 2018).

Los resultados mostraron que los tratamientos aplicados a las vides apenas afectaron el contenido de antocianos en las uvas y en los vinos, siendo la dosis baja del extracto del alga, el

tratamiento más efectivo. En 2017, la dosis baja del alga aumentó el contenido en las uvas de los antocianos mayoritarios, así como también de los antocianos totales no acilados y de los antocianos totales. En esta temporada, a pesar de que la aplicación de la dosis alta del alga no tuvo efectos significativos en el contenido de los antocianos de las uvas, los vinos producidos presentaron un mayor contenido de varios antocianos en comparación al control. En 2018, los tratamientos aplicados a las vides no afectaron el contenido de antocianos de las uvas ni de los vinos.

En 2017, la dosis baja del alga aumentó el contenido en uvas de la mayoría de los flavonoles, así como también el contenido total de miricetinas, quercetinas y flavonoles, mientras que la dosis alta aumentó el contenido de miricetina-3-*O*-galactósido y de miricetina-3-*O*-glucósido. En esta temporada, a pesar de que la aplicación de la dosis alta del alga no tuvo efectos significativos en el contenido de flavonoles de las uvas, los vinos producidos presentaron el mayor contenido de miricetina-3-*O*-glucurónido, de quercetina-3-*O*-galactósido, de quercetina-3-*O*-glucurónido y de isorhamnetina libre.

En 2017, la dosis baja del alga aumentó el contenido en las uvas del ácido *trans*-caftárico, del ácido *trans*-cutárico, del ácido cafeico, de los ácidos hidroxicinámicos totales, incluido el contenido individual y total de los estilbenos. La dosis alta del alga aumentó el contenido de la uva del ácido cafeico y también el contenido individual y total de los estilbenos. Las uvas cosechadas de las vides tratadas con la dosis alta del alga mostraron el mayor contenido de todos los estilbenos. En 2018, la dosis baja del alga aumentó el contenido de ácido *trans*-caftárico, de ácido *trans*-cutárico, de los ácidos hidroxicinámicos totales y del contenido de *trans*-piceido, mientras que la dosis alta del alga aumentó el contenido de *trans*-piceido y de los estilbenos totales. En esta añada, los vinos control presentaron un menor contenido total de ácidos hidroxicinámicos y una mayor concentración total e individual de cada uno de los ácidos hidroxibenzoicos que los vinos

producidos de uvas cosechadas de vides tratadas con la dosis baja del alga. Asimismo, los vinos control presentaron el contenido más bajo de ácido cafeico y el contenido más alto de *trans*-resveratrol.

En síntesis, la aplicación de la dosis baja del alga a las vides de Tempranillo en la añada 2017 aumentó la concentración de varios compuestos fenólicos en las uvas tales como la mayoría de los antocianos mayoritarios, de los antocianos no acilados, de los antocianos totales, de los flavonoles mayoritarios como los de tipo miricetina y de quercetina, incluyendo los flavonoles totales, de varios ácidos hidroxicinámicos y de todos los estilbenos. La aplicación de la dosis alta en 2017 aumentó el contenido de los derivados de miricetina y de todos los estilbenos en las uvas. En general, ambas dosis aumentaron el contenido de la uva de *trans*-piceido y de los estilbenos totales en ambas añadas. Los tratamientos aplicados a las vides de Tempranillo no tuvieron un efecto significativo en el contenido de compuestos fenólicos de la uva en 2018. Por lo tanto, las aplicaciones de algas a las vides de Tempranillo podrían actuar como inductores, desencadenando la síntesis de estilbenos en las uvas.

4.2.2. Publicación nº5

Título: Biostimulation to Tempranillo grapevines (*Vitis vinifera* L.) through a brown seaweed during two seasons: Effects on grape juice and wine nitrogen compounds.

En revisión: Scientia Horticulturae (2020), 264, 109177. Factor de impacto: 1.961. Cuartil: Q1 (Horticultura).

Autores: Gastón Gutiérrez Gamboa, Teresa Garde Cerdán, Pilar Rubio Bretón y Eva Pilar Pérez Álvarez.

Resumen:

Los compuestos nitrogenados juegan un rol fundamental en la cinética de la fermentación alcohólica ya que un contenido bajo de estos compuestos en el mosto puede dar lugar a ralentizaciones o paradas de fermentación. Por otro lado, pocos trabajos estudian el efecto de la aplicación de algas en las vides en el contenido de compuestos nitrogenados de las uvas y de los vinos. El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la aplicación foliar de una dosis baja (0,25 % v/v) y una dosis alta (0,50 % v/v) de un extracto comercial del alga *Ascophyllum nodosum* a vides de la variedad Tempranillo en el contenido de aminoácidos y de amonio en el mosto y en el vino durante dos temporadas consecutivas (2017 y 2018).

Los datos climáticos mostraron que la añada 2018 fue más húmeda que la añada 2017. En este sentido, en 2018, la precipitación anual de la añada fue de 354 mm, mientras que en 2017 fue de 180 mm. La evapotranspiración de referencia (ET_0) de ambas añadas fue similar y alcanzó un

valor de 790 mm en 2018 y de 893 mm en 2017. Por otro lado, la humedad relativa fue de 69,4 % en 2018 y de 60,1 % en 2017.

Los resultados del ensayo mostraron que en 2017, la dosis baja del alga aplicada foliarmente a las vides de Tempranillo aumentó la concentración en los mostos de ácido γ -aminobutírico, de α -alanina, de arginina, de histidina, de isoleucina, de lisina, de metionina, de ornitina, de prolina, de triptófano, de valina, de los aminoácidos totales y de los aminoácidos totales sin considerar la prolina. En 2018, los mostos control presentaron el menor contenido de glicina. En esta misma añada, los mostos producidos de la uva proveniente de vides tratadas con la dosis alta del alga mostraron el mayor contenido de citrulina + treonina y de histidina, y un mayor contenido de triptófano que los mostos control.

En 2017, las vides tratadas con la dosis alta del alga dieron lugar a vinos con la mayor concentración de ácido γ -aminobutírico y de fenilalanina y de un mayor contenido de aminoácidos totales sin considerar la prolina que los vinos producidos de uvas de vides tratadas con la dosis baja del alga. En 2018, los vinos control mostraron una mayor concentración de la mayoría de los aminoácidos, y del amonio, así como también de las fracciones nitrogenadas que los vinos producidos de uvas cosechadas de vides tratadas con la dosis alta del alga. Los vinos control presentaron la mayor concentración de arginina, de glicina, de metionina, de amonio, incluido el contenido total de aminoácidos sin considerar la prolina y de todas las fracciones nitrogenadas.

Los mostos en 2018 mostraron una mayor concentración de varios aminoácidos, tales como el ácido aspártico, el ácido glutámico, la α -alanina, la citrulina + treonina, la fenilalanina, la glicina, la lisina, la serina, así como también de los aminoácidos totales, de las fracciones nitrogenadas y del amonio que los mostos de la añada 2017. Por otro lado, los vinos producidos en 2018, con la excepción de los vinos producidos de las uvas cosechadas de las vides tratadas con la dosis alta

del alga, presentaron una mayor concentración de varios aminoácidos que los vinos producidos en 2017.

En resumen, durante la añada más seca, la dosis baja del extracto del alga aplicada foliarmente a las vides de Tempranillo aumentó la concentración de la mayoría de los aminoácidos en los mostos, mientras que, en la añada más húmeda, la dosis alta del extracto de algas aumentó la concentración de ciertos aminoácidos en los mostos. Los mostos producidos en la añada más seca presentaron una menor concentración de aminoácidos que los mostos elaborados en la estación más lluviosa. Por lo tanto, la aplicación de algas en vides de Tempranillo podría desencadenar la síntesis de aminoácidos en las uvas dependiendo de la dosis aplicada y de las condiciones climáticas de la añada.

4.2.3. Publicación nº6

Título: Effects on grape and wine volatile composition after biostimulation with a brown alga to Tempranillo grapevines in two seasons.

Enviado: Journal of the Science of Food and Agriculture. Factor de impacto: 2.422. Cuartil: Q1 (Agricultura, Multidisciplinaria).

Autores: Gastón Gutiérrez Gamboa, Teresa Garde Cerdán, Pilar Rubio Bretón y Eva Pilar Pérez Álvarez.

Resumen:

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de una dosis baja (0,25 % v/v) y una alta (0,50 % v/v) de un extracto comercial de alga *Ascophyllum nodosum* aplicadas foliarmente a las vides de Tempranillo en el contenido de compuestos volátiles de la uva y del vino durante 2017 y 2018.

Los resultados mostraron que los tratamientos disminuyeron la concentración de ρ -cimeno en los mostos, mientras que los mostos control presentaron un contenido más alto de terpenos totales que los mostos obtenidos de las vides tratadas con la dosis alta del alga. Este tratamiento disminuyó el contenido de ρ -cimeneno y aumentó el de geranil acetona. En 2018, los mostos de las vides tratadas con la dosis alta del alga presentaron el contenido más alto de ρ -cimeno, de óxido de nerol y de terpenos totales, mientras que los mostos de las vides tratadas con la dosis baja del alga presentaron el contenido más bajo de geraniol. La concentración de geranil acetona, de óxido de nerol, de geraniol y de terpenos totales fue mayor en 2018 que en 2017.

Respecto a los C₁₃ norisoprenoides, la dihidro- β -ionona solo fue detectada en 2017, mientras que el jasmonato de metilo solo fue detectado en 2018. En 2017, ambos tratamientos disminuyeron el contenido de 1,1,6,-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN) en los mostos. En 2018, los mostos de las vides tratadas con la dosis alta del alga presentaron el mayor contenido de (E)- β -damascenona, de (Z)- β -damascenona, de TDN, de β -ciclocitral y de C₁₃ norisoprenoides totales, y un mayor contenido de dihidro- β -ionona que los mostos control. El contenido de (Z)- β -damascenona y de TDN fue mayor en 2018 que en 2017.

Respecto a los ésteres, el salicilato de metilo y el 2-hexenoato de etilo no pudieron ser identificados en los mostos en 2018. En 2017, ambos tratamientos disminuyeron el contenido de acetato de 2-hexenol, mientras que en 2018 aumentaron su contenido. En 2018, los mostos de las vides tratadas con la dosis alta del alga presentaron el mayor contenido de acetato de hexilo y de ésteres totales.

En 2017, la dosis baja del alga disminuyó el contenido de benzaldehído en los mostos, mientras que la dosis alta disminuyó el contenido de alcohol bencílico. En 2018, los mostos de las vides tratadas con la dosis alta del alga presentaron el mayor contenido de todos los bencénicos, incluida su concentración total, y la dosis baja del alga disminuyó el contenido de 2-feniletanol. La concentración de benzaldehído y de 2-feniletanol en 2018 fue más alta que en 2017, mientras el contenido de 2-feniletanal y del alcohol bencílico fue más alto en 2017 que en 2018.

En 2017, la dosis alta del alga disminuyó la concentración de 1-nonanol y de 1-decanol en los mostos. En 2018, ambos tratamientos aumentaron el contenido de 2-etil-1-hexanol en los mostos, mientras que la dosis alta del alga aumentó el contenido de 1-nonanol y de 1-heptanol. El contenido de 1-octenol fue mayor en 2018 que en 2017.

En 2017, la dosis alta del alga aumentó el contenido de nonanal, decanal, octanal, así como también el contenido total de compuestos carbonílicos. En 2018, este tratamiento aumentó el contenido de E,E-2,4-hexadienal de los mostos. Ambos tratamientos aumentaron el contenido decanal y octanal en los mostos. La concentración en los mostos de la mayoría de los compuestos carbonílicos con la excepción de E,E-2,4-hexadienal fue mayor en 2018 que en 2017.

En 2017, ambos tratamientos aumentaron el contenido de hexanal en los mostos. En 2018, la dosis alta del alga aumentó el contenido de (Z)-3-hexenol en los mostos. Los mostos obtenidos de las vides tratadas con la dosis alta del alga presentaron el mayor contenido total de compuestos C6. El contenido de hexanal en los mostos fue mayor en 2018 que en 2017, lo que coincidió con un mayor contenido de acidez total y de ácido málico y un pH más bajo. El contenido de 1-hexanol y del contenido total de compuestos C6 en los mostos fue mayor en 2017 que en 2018.

Respecto a la composición volátil de los vinos, los tratamientos tuvieron un escaso efecto en su contenido. La concentración de la mayoría de los alcoholes superiores, del acetato de isoamilo, del acetato de 2-feniletilo y del ácido isobutírico fue mayor en 2018 que en 2017, mientras que el contenido de 4-vinilfenol fue mayor en 2017 que en 2018.

De este modo, en 2017, la aplicación de la dosis baja del alga tendió a disminuir el contenido de ciertos compuestos volátiles, pero la dosis alta aumentó el contenido de ciertos compuestos carbonílicos, incluido su contenido total. En 2018, la dosis alta aumentó la concentración de la mayoría de los compuestos volátiles, incluido el contenido total de la mayoría de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados, excepto el de los alcoholes totales. Los tratamientos apenas afectaron la composición volátil del vino. Por lo tanto, las aplicaciones foliares de algas a las vides de Tempranillo pueden ejercer un efecto elicitor dependiendo del efecto de la añada, desencadenando la síntesis de compuestos volátiles en la uva.

5. Discusión general

5.1. Efecto de la aplicación foliar del alga *Ascophyllum nodosum* en las uvas y en los vinos de Tempranillo Blanco

5.1.1. Compuestos fenólicos

De acuerdo con los resultados expuestos anteriormente, la aplicación foliar de algas en una dosis alta a las vides, dio lugar a un aumento significativo de la concentración de catequina en ambas añadas de estudio. Así, la enzima leucoantocianidina reductasa (LAR) regula la biosíntesis de leucocianidina en catequina y luego la conversión enzimática de catequina en epicatequina (Bogs et al., 2005). De forma adicional, la antocianidina reductasa (AR) implica la conversión de cianidina en catequina (Dixon et al., 2004). Como se ha mencionado, las algas poseen en su contenido una amplia gama de polisacáridos los cuales pueden actuar como elicitores en horticultura, desencadenando la síntesis de ciertos metabolitos secundarios en las frutas, en especial, de compuestos fenólicos (Mercier et al., 2001; Jayaraj et al., 2008; Craigie, 2011; Shukla et al., 2016, 2019; Ben Salah et al., 2018). Horbowicz et al. (2011) mostraron que la aplicación foliar de un elicitador de tipo abiótico podría aumentar la actividad de las enzimas LAR y/o AR en plántulas de trigo sarraceno común (*Fagopyrum esculentum*). Recientemente, Frioni et al. (2019) han demostrado que la aplicación foliar de un extracto comercial de *Ascophyllum nodosum* a las vides de la variedad Sangiovese indujo una mayor actividad de varias enzimas relacionadas con la síntesis de compuestos fenólicos, tales como la flavonoide 3-*O*-glucosil transferasa (UFGT), la leucoantocianidina dioxigenasa (LDOX), la flavonoide-3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) y la flavonoide-3'-hidroxilasa (F3'H). Por tanto, es probable que las aplicaciones foliares de algas a las vides de Tempranillo Blanco en dosis altas puedan desencadenar la activación de las enzimas LAR o AR, induciendo la síntesis de catequina en las uvas. Por otro lado, el tratamiento fue el factor de mayor importancia que afectó al contenido de catequina en las uvas. En 2018, las precipitaciones caídas

fueron significativamente más altas que en 2017, y ciertos racimos de uvas se vieron afectados por *Botrytis cinerea*. La concentración de catequina fue menor en las uvas cosechadas en la añada 2018 que en las uvas cosechadas en 2017, debido probablemente al hecho de que los flavanoles se descomponen por la actividad enzimática de *B. cinerea* (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Por otra parte, la radiación anual acumulada fue mayor en la añada 2017 que en la 2018. Así, ciertos autores han mostrado resultados contradictorios acerca de los efectos de los factores microclimáticos en la biosíntesis de flavanoles en las uvas. Downey et al. (2008) informaron de que el sombreado de racimos no afectó al contenido de taninos condensados en los hollejos y en las pepitas de la uva, mientras que Koyama et al. (2012) mostraron que el sombreado en los racimos disminuyó el contenido de proantocianidinas de las uvas. Por el contrario, se ha demostrado que la exposición a la luz solar después de envero aumentó los niveles de antocianos y de flavanoles en los hollejos en comparación con las uvas expuestas a la sombra (Cortell y Kennedy, 2006). La catequina y los ácidos hidroxicinámicos son los compuestos responsables de la coloración de los vinos blancos, que inicialmente son incoloros, pero que pueden oxidarse enzimática o químicamente para formar productos de color amarillo y/o pardo-marrón (Harbertson y Spayd, 2006). Es así como, las diferencias anuales en el contenido de la catequina en los vinos, pueden atribuirse a las reacciones de oxidación que involucran a la catequina en estos pasos o a la afección de enfermedades criptogámicas en las uvas.

Por otro lado, la acumulación de flavonoles en las uvas parece ocurrir antes del envero, alcanzando un contenido máximo en esta etapa fenológica, y su biosíntesis ocurre solo en las células de los hollejos de la uva (Ribéreau-Gayon et al., 2006). De acuerdo con lo expuesto en la literatura, existen pocos trabajos que estudien el efecto de la aplicación de extractos de algas en el contenido pormenorizado de flavonoles en la uva (Frioni et al., 2019). Estos autores, a diferencia

de nuestros resultados, mostraron que la aplicación de un extracto de alga aplicado a las vides disminuyó la concentración de catequina, de epicatequina, de quercetina-3-glucósido, de quercetina-3-glucurónido y de kaempferol-3-glucósido, mientras que su aplicación aumentó el contenido de miricetina-3-glucósido. Los autores demostraron que la activación de las enzimas relacionadas con la biosíntesis de los flavonoles cuyo anillo B se encuentra trisustituido, está relacionada con niveles más altos de transcritores para la enzima flavonoide-3',5'-hidroxilasa (F3'5'H) en el momento en que la uva alcanza cerca de los 19 °Brix y, los niveles más bajos de transcritores para la enzima flavonoide-3'-hidroxilasa (F3'H) en el momento en que la uva alcanza cerca de los 22 °Brix. Es posible que una dosis alta de algas aplicadas foliarmente a las vides de la variedad Tempranillo Blanco pueda incrementar la actividad de las enzimas responsables en la biosíntesis de la catequina, permitiendo la síntesis de estos compuestos en la uva.

La concentración de los ácidos hidroxicinámicos en las uvas no se vio afectada significativamente por los tratamientos aplicados al viñedo. Los ácidos hidroxicinámicos son sustratos de las enzimas polifenol oxidasas (PPOs) en las uvas (Ribéreau-Gayon et al., 2006). Es posible que el grado de oxidación del mosto una vez que las muestras de uva fueron descongeladas y trituradas haya afectado al contenido de los ácidos hidroxicinámicos sobre los tratamientos aplicados en el viñedo. Estos compuestos tienen una importancia relevante en la calidad del vino, ya que son la causa principal del oscurecimiento en los vinos blancos y del origen de la formación del 4-etilfenol y del 4-etilguaiacol en los vinos (du Toit et al., 2006). El contenido de los ácidos hidroxicinámicos durante el proceso de oxidación de los vinos disminuye, aparentemente, sin relación con el grado de pardeamiento del vino (Fernández-Zurbano et al., 1998). El pardeamiento enzimático parece seguir reacciones de oxidación acopladas, donde las quinonas de los ácidos hidroxicinámicos oxidan a los grupos catecol, regenerando nuevamente a estos ácidos

hidroxicinámicos (Waterhouse et al., 2016). Por otro lado, estos compuestos tienen la capacidad de formar copigmentos con los antocianos y pueden, de esta forma, contribuir al amargor y a la astringencia de los vinos (Bimpilas et al., 2016). Debido a estas razones, es posible que el contenido de los ácidos hidroxicinámicos de las uvas y de los vinos haya estado más afectado por las reacciones químicas dadas durante el análisis de la uva y a lo largo la vinificación, respectivamente, que por los tratamientos aplicados foliarmente a las vides.

Los ácidos hidroxibenzoicos como los ácidos vanílico, gálico, siríngico y salicílico están unidos a las paredes celulares de los hollejos de las bayas (Cosme et al., 2018). El ácido gálico se produce en el vino mediante la hidrólisis de los ésteres de galato que se encuentran en los taninos condensados e hidrolizables (Waterhouse et al., 2016). Al igual que los ácidos hidroxicinámicos, los ácidos hidroxibenzoicos con funcionalidad catecol o galoilo también son susceptibles a las reacciones de oxidación y, por lo tanto, el contenido de los ácidos hidroxibenzoicos en los vinos también pudo verse más afectado por los procesos de oxidación que ocurrieron durante la vinificación que por las aplicaciones foliares del alga al viñedo.

Los estilbenos son fitoalexinas que se sintetizan de forma glucosilada en las uvas en respuesta a la incidencia de enfermedades criptogámicas y a la radiación UV-B, y pueden ser liberados a los vinos por efecto de la actividad enzimática de las levaduras durante la vinificación (Flamini et al., 2013; Hasan y Bae, 2017). Como ha sido mencionado, el nivel de precipitaciones y de humedad relativa fue mayor en la añada 2018 que en la 2017, por lo que ciertos racimos fueron afectados por *B. cinerea*. Es posible que, los vinos producidos en la añada 2018 tuvieran una mayor concentración de estilbenos que los vinos elaborados en 2017, debido a la diferencia en las condiciones fitosanitarias de las vides entre ambas añadas.

5.1.2. Compuestos nitrogenados

La composición de aminoácidos que se encontró en los mostos de la variedad Tempranillo Blanco es similar a la de la variedad Tempranillo según lo expuesto en la literatura, con la excepción de la prolina, el cual es un aminoácido abundante en esta variedad. Algunos autores han mostrado que los aminoácidos más abundantes encontrados en los mostos de Tempranillo son la arginina, la prolina, la glutamina, el ácido glutámico y el ácido γ -aminobutírico (Garde-Cerdán et al., 2017b; Gutiérrez-Gamboa et al., 2017c). En comparación con otras variedades de uva blanca, la composición de aminoácidos del mosto de la variedad Tempranillo Blanco es similar a las de las variedades Godello y Treixadura (Bouzas-Cid et al., 2015). En este estudio, la arginina, la α -alanina, la treonina, el ácido γ -aminobutírico, la glutamina y el ácido glutámico fueron los aminoácidos más abundantes en los mostos, representando entre el 69 y el 76% del total de los aminoácidos. La relación prolina a arginina se usa comúnmente para clasificar las variedades de vid de acuerdo con su capacidad de acumular uno de estos dos aminoácidos (Bell y Henschke, 2005; Garde-Cerdán et al., 2009; Bouzas-Cid et al., 2015). La relación prolina a arginina en los mostos de Tempranillo Blanco fue inferior a 1. Esta relación es aún más evidente cuando se calcula en términos de nitrógeno asimilable, ya que la prolina contiene un átomo de nitrógeno por molécula, mientras que la arginina presenta cuatro átomos de nitrógeno por molécula en su composición (Stines et al., 2000). Por lo tanto, según los resultados expuestos en la presente Tesis Doctoral, Tempranillo Blanco se comportó como una variedad acumuladora de arginina, acumulando de esta forma, una mayor proporción de nitrógeno asimilable (arginina) en lugar de nitrógeno no asimilable (prolina) para la levadura. Estos resultados son interesantes ya que la mayoría de los estudios sobre la relación prolina a arginina de los mostos de la variedad Tempranillo han mostrado que esta variedad tiende a comportarse como una variedad acumuladora

de prolina (Garde-Cerdán et al., 2014; Garde-Cerdán et al., 2017b; Pérez-Álvarez et al., 2017a; Gutiérrez-Gamboa et al., 2018d). Las vides que alcanzan una alta asimilación de nitrógeno pueden convertir el exceso de glutamina en arginina, mientras que, durante la sequía, el estrés salino o las deficiencias de nitrógeno, una mayor proporción de glutamina parece convertirse en prolina (Keller, 2015). Es posible que las diferencias en las concentraciones de arginina y prolina entre las variedades Tempranillo Blanco y Tempranillo se atribuyan a que la mutación natural proporcionó una pérdida de material genético (Carbonell-Bejerano et al., 2017), incluyendo también posiblemente cambios en la absorción de nitrógeno por las vides y en la actividad de las enzimas responsables de convertir glutamina en arginina o en prolina.

Como ha sido mencionado con anterioridad, las algas contienen una amplia gama de polisacáridos, los cuales han sido usados como elicitores en diversos cultivos agrícolas (Ben Salah et al., 2018). Nuestros resultados han mostrado que la aplicación foliar de una dosis alta del extracto comercial del alga *A. nodosum* a las vides de Tempranillo Blanco aumentó la concentración en el mosto de fenilalanina y de isoleucina en ambas añadas. Ciertos metabolitos secundarios, tales como la lignina, las poliaminas, los flavonoles, los antocianos, los taninos, los flavonoles, los isoflavonoles y las cumarinas y sus derivados se generan a partir de la fenilalanina en la ruta del ácido shikímico (Tohge et al., 2013). Además, la producción en los vinos de alcohol amílico y de 2-feniletanol, así como también de sus correspondientes ésteres derivan de la isoleucina y de la fenilalanina, respectivamente (Bell y Henschke, 2005; Trinh et al., 2010). En este sentido, la fenilalanina es un aminoácido precursor de compuestos fenólicos en las uvas y de compuestos aromáticos en los vinos. Por otro lado, ciertos autores han demostrado que la aplicación de distintos tipos de elicitores puede inducir a una mayor actividad de la fenilalanina

amonio liasa (PAL), enzima clave que cataliza el primer paso de la biosíntesis de los compuestos fenólicos (Romanazzi et al., 2002; Belhadj et al., 2008; Trotel-Aziz et al., 2006; Deng et al., 2019).

Las diferencias anuales en el contenido de los aminoácidos del mosto y de los vinos pueden estar asociadas al estado hídrico de las vides y a su efecto en el tamaño de las bayas. En este sentido, el estado hídrico de las vides depende del agua disponible en el suelo y de la cantidad total de agua evaporada, que incluye el agua transpirada por las plantas y la evaporada por el suelo (Keller, 2015). Las precipitaciones caídas en la añada 2018 fueron más abundantes que en 2017, mientras que la evapotranspiración de referencia (ET_0) a lo largo de la temporada de crecimiento de la vid fue similar en ambas añadas, lo que afectó al peso de las bayas. Las vides cultivadas en condiciones de mayor estrés hídrico presentan, en general, menor vigor y bayas más pequeñas que las vides manejadas con un suministro constante de agua (Peyrot des Gachons et al., 2005).

El contenido de ácido aspártico y de ácido glutámico de los mostos tras la aplicación foliar de las distintas dosis del extracto comercial del alga fue significativamente influenciado por la interacción entre el tratamiento y la añada. La síntesis del ácido aspártico y del ácido glutámico ocurre temprano en la temporada de crecimiento de la vid, cuando las uvas alcanzan un valor de sólidos solubles de 10 a 15 °Brix, posteriormente, la concentración de estos aminoácidos disminuye, posiblemente debido a que son precursores de los aminoácidos esenciales de las uvas (Garde-Cerdán et al., 2018a). Asimismo, el ácido glutámico y la glutamina pueden convertirse en otros aminoácidos por la acción de las enzimas transaminasas (Keller, 2015). Es posible que las aplicaciones foliares de las algas afecten de forma diferencial al contenido de ácido aspártico y de ácido glutámico en la uva, dependiendo de las condiciones climáticas de cada añada. En este sentido, la dosis alta del alga aplicada en una añada más seca aumenta el contenido del ácido

aspártico y del ácido glutámico de la uva, mientras que su aplicación en una añada más húmeda causa un efecto opuesto en el contenido de estos aminoácidos.

La concentración de prolina y de tirosina en los mostos fue significativamente mayor en la añada 2017, más seca, que en la añada 2018, más húmeda. Canoura et al. (2018) mostraron que altos niveles de prolina se acumularon en las uvas de las variedades Chardonnay y Syrah en respuesta a la sequía. El metabolismo de la prolina en las plantas permite la acumulación de este aminoácido en los tejidos en respuesta al estrés por eventos de sequía. Así, Haider et al. (2017) demostraron que 18 genes expresados diferencialmente (GED) tenían un funcionamiento significativamente importante en la regulación del metabolismo de la prolina después de un tratamiento de sequía aplicado en vides de dos años de la variedad Summer Black cultivadas en macetas.

Los incrementos en la concentración de los aminoácidos en el mosto después de la aplicación foliar del alga en el viñedo no fueron expresadas en el contenido de aminoácidos de los vinos producidos. La añada fue el factor más importante que afectó al contenido de la mayoría de los aminoácidos estudiados en los vinos, mientras que el contenido de arginina en los mostos y en los vinos no se vio afectado por los factores estudiados. A pesar de que todas las vinificaciones se realizaron de la misma manera, es probable que otros factores puedan afectar a la concentración de este aminoácido, como puede ser la dinámica poblacional de las levaduras de la fermentación alcohólica (Bell y Henschke, 2005). Asimismo, el contenido en el vino de amonio, de histidina, de hidroxiprolina, de glicina y de prolina no se vio afectado por ninguno de los factores estudiados. El amonio, la arginina y la histidina son fuentes de nitrógeno fácilmente disponibles para las levaduras, mientras que la glicina, la hidroxiprolina y la prolina se liberan tras la autólisis de las levaduras al final del proceso de la fermentación alcohólica (Bell y Henschke, 2005).

5.1.3. Compuestos volátiles

Las concentraciones de la mayoría de los terpenos obtenidos en los mostos de la variedad Tempranillo Blanco fueron menores que las reportadas por diversos autores en distintas variedades de vid no amoscoteladas (López-Tamames et al., 1997; Ripoll et al., 2017). Teniendo en cuenta el aroma varietal, los mostos de Tempranillo Blanco presentaron una concentración de terpenos mucho menor que los mostos de las variedades de vides amoscoteladas (Agosin et al., 2000). Por lo tanto, la variedad Tempranillo Blanco podría definirse como una variedad aromática neutra, ya que el contenido de terpenos libres totales de la uva no es importante en su composición volátil global.

En general, los tratamientos aplicados foliarmente a las vides no afectaron a la concentración de terpenos y de C₁₃ norisoprenoides, siendo la añada el factor más importante que afectó a su contenido en los mostos. La síntesis de terpenos y de C₁₃ norisoprenoides en las uvas, depende principalmente de la exposición de los racimos a la luz solar y de la temperatura incidente en éstos (Fang y Qian, 2006). Algunos autores han informado que la exposición de los racimos a la luz es esencial para la biosíntesis del linalool, de la β -ionona y de la β -damascenona en las uvas (Fang y Qian, 2006; Sasaki et al., 2016). Según lo expuesto en los apartados anteriores, la añada 2018 presentó una radiación promedio más alta durante julio que la añada 2017, sin embargo, la radiación acumulada anual del 2017 fue mayor que la de la añada 2018. Estas condiciones pudieron haber influenciado en que la concentración de la β -ionona y del β -ciclocitral de los mostos fuese mayor en la añada 2017 que en la 2018. Por otro lado, se ha demostrado que la aplicación de elicitores de tipo abiótico en las vides de la variedad Monastrell aumentaron el contenido de ciertos compuestos volátiles de la uva, principalmente de terpenos y de C₁₃ norisoprenoides (Gómez-Plaza et al., 2012). Sin embargo, Gutiérrez-Gamboa et al. (2019c) mostraron que la aplicación foliar de

elicitores en las vides de la variedad Tempranillo disminuyó el contenido de compuestos volátiles de la uva, incluyendo la concentración de ciertos terpenos y de C₁₃ norisoprenoides. Se ha demostrado que la elicitación activa el metabolismo de los terpenos al aumentar la actividad de las enzimas geranylgeranyl difosfato sintasa (GGPP) y terpeno sintasa, lo que lleva a la acumulación de estos compuestos en distintos tejidos vegetales (Martín et al., 2003; D'Onofrio et al., 2018). Sin embargo, estos resultados no coinciden con los expuestos en la presente Tesis Doctoral, ya que las condiciones climáticas de la añada influyeron de forma significativa en el contenido de terpenos y de C₁₃ norisoprenoides de las uvas en comparación con los tratamientos aplicados a las vides.

Los ésteres se acumulan en las frutas en muy bajas concentraciones durante su maduración y contribuyen al aroma de las flores y de las frutas maduras (Waterhouse et al., 2016). El salicilato de metilo se ha identificado en mezclas volátiles inducidas por herbívoros en varias especies de plantas y, generalmente, se usa como semioquímicos para el control biológico de plagas (James y Price, 2004). Los ésteres derivados de la uva podrían hidrolizarse durante la fermentación alcohólica y a lo largo de la crianza y del almacenamiento de los vinos, presentando un impacto potencialmente importante en el aroma del vino (Waterhouse et al., 2016). De acuerdo con los resultados obtenidos, durante una añada seca, es posible que una dosis alta de algas aplicadas foliarmente a las vides de Tempranillo Blanco pueda incrementar el contenido de acetato de hexilo en las uvas, mientras que, durante una añada más húmeda, esta aplicación puede tender a disminuir su contenido.

La concentración de los bencénicos analizados en el mosto de la variedad Tempranillo Blanco fue significativamente menor que lo expuesto por García et al. (2003) en los mostos de las variedades blancas Airén, Chardonnay y Macabeo. El feniletil- α -D-glucopiranosido ha sido identificado como uno de los precursores de 2-feniletanol en las uvas (García et al., 2003). Si bien,

las aplicaciones foliares de algas a una dosis alta a las vides incrementaron el contenido de fenilalanina en los mostos durante ambas añadas, no existe una tendencia clara entre este incremento y los cambios en el contenido de 2-feniletanal y de 2-feniletanol en los mostos. La concentración de benzaldehído, así como también el contenido total de bencénicos en los mostos, fue significativamente mayor en la añada 2018 que en la 2017, mientras que la concentración del alcohol bencílico fue significativamente menor. La síntesis de benzaldehído en las uvas se produce principalmente como efecto de la acción enzimática de *B. cinerea* en sus tejidos a través de la utilización del alcohol bencílico como sustrato enzimático (García et al., 2003; Genovese et al., 2007; Negri et al., 2017). Por otro lado, García et al. (2003) mostraron que el contenido de alcohol bencílico tendió a disminuir en los hollejos y en los mostos durante la maduración de la uva, mientras que Fang y Qian (2012) mostraron que la síntesis del alcohol bencílico y del 2-feniletanol aumenta considerablemente durante la maduración de la uva.

Los alcoholes se producen a partir de la reducción de los aldehídos por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) y se sintetizan en estadios de desarrollo tardíos de maduración en las bayas (Kalua y Boss, 2009). En base a los resultados, parece ser que la aplicación del alga a las vides de Tempranillo Blanco en la añada más lluviosa podría desencadenar la síntesis de 1-octenol en las uvas mediante la activación de la enzima ADH.

Por otro lado, el contenido de compuestos carbonílicos del mosto se vio afectado significativamente por el factor añada. Así, la concentración de la mayoría de estos compuestos fue mayor en la añada 2017 que en la 2018. Se ha demostrado que los niveles de las formas ligadas y libres de γ -decalactona son significativamente más altos en frutas maduras en comparación a frutas inmaduras (Aubert et al., 2003). Debido a lo anterior, es probable que las condiciones de maduración afecten el contenido de γ -decalactona y de los demás compuestos carbonílicos en las

uvas de Tempranillo Blanco. Como ocurrió con los alcoholes, las aplicaciones del alga en una dosis baja a las vides disminuyeron el contenido de varios compuestos carbonílicos en los mostos. Sin embargo, la mayoría de los compuestos volátiles analizados, incluidos los compuestos carbonílicos del mosto, se vieron afectados principalmente por el factor añada.

El contenido de compuestos C6 de los mostos de Tempranillo Blanco fue menor que el encontrado en mostos de diferentes variedades de vid blanca como Albariño, Listán, Parellada, Treixadura, Viura y Xarello (López-Tamames et al., 1997). El factor tratamiento afectó significativamente al contenido de (Z)-3-hexenol y de 1-hexanol de los mostos, mientras que el factor añada afectó el contenido de todos los compuestos C6, excepto el del 1-hexanol. Los compuestos C6 se forman enzimáticamente a partir de ácidos grasos poliinsaturados en las uvas, constituyendo los principales compuestos aromáticos responsables del aroma herbáceo de las uvas y de los vinos (Waterhouse et al., 2016). La enzima ADH reduce los aldehídos a los alcoholes C6 correspondientes, es decir, a 1-hexanol, a (Z)-3-hexenol y a (E)-2-hexenol (Oliveira et al., 2006). La aplicación de la dosis alta del alga tendió a aumentar el contenido del mosto de estos tres compuestos C6 en ambas añadas. Es probable que las algas puedan actuar como elicitores de la enzima ADH activando la síntesis de los aldehídos a los alcoholes C6 en las uvas. Por otro lado, el contenido de (Z)-3-hexenol y de (E)-2-hexenal fue mayor en el mosto en la añada 2018 que en la 2017. Esto coincidió con que ciertos parámetros físico-químicos como el contenido de la acidez total y del ácido málico fuera mayor en el mosto en la añada 2018 que en la 2017. Los ácidos linoleico y linolénico son los precursores de los compuestos C6 y su concentración es mayor en las primeras etapas de maduración de la uva, disminuyendo posteriormente (Rambla et al., 2016). La síntesis de los aldehídos C6 en las uvas alcanza su máximo nivel alrededor del envero y disminuye a lo largo de la maduración de la uva (Dennis et al., 2012; Waterhouse et al., 2016).

Como resultado, los alcoholes C6 se encuentran comúnmente en gran cantidad en vinos elaborados a partir de uvas inmaduras (Bindon et al., 2013; Waterhouse et al., 2016).

Respecto a los compuestos volátiles en el vino, en general, la concentración de los compuestos que más impactos tienen en el aroma del vino, tales como el acetato de hexilo, el octanoato de etilo, el decanoato de etilo, el ácido octanoico, así como también el contenido total de los ácidos grasos fue más elevado en los vinos de la añada 2018 que en la 2017. Estas diferencias podrían atribuirse al contenido inicial de nitrógeno fácilmente asimilable encontrado en el mosto. En este ensayo, en la añada 2017, la concentración promedio de nitrógeno fácilmente asimilable en el mosto fue de 203 mg N/L, mientras que en la añada 2018 fue de 357 mg N/L. La formación de alcoholes superiores muestra un aumento inicial a bajos niveles de nitrógeno fácilmente asimilable y tiende a disminuir después de una concentración de nitrógeno fácilmente asimilable superior a 200-300 mg N/L (Ugliano et al., 2007). Por otro lado, la producción de ésteres de etilo, así como de ésteres acéticos, generalmente aumenta cuando el nitrógeno fácilmente asimilable es mayor de 300 mg N/L (Ugliano et al., 2007). Debido a esto, es posible que los efectos de las aplicaciones del alga a las vides de Tempranillo Blanco no tuvieran efectos significativos en el contenido de compuestos volátiles de los vinos.

En síntesis, la aplicación foliar del extracto comercial del alga *A. nodosum* a una dosis baja en las vides de Tempranillo Blanco tuvo un escaso efecto en el contenido de los compuestos fenólicos, los nitrogenados y los volátiles de la uva. Por otro lado, la aplicación foliar de la dosis alta de este extracto a las vides incrementó el contenido de ciertos aminoácidos en los mostos, en especial de la fenilalanina en las añadas 2017 y 2018, así como también el de la catequina y el de los flavonoles y de algunos compuestos C6 de la uva. En este sentido, la fenilalanina es un aminoácido esencial y la mayoría de los compuestos fenólicos y ciertos volátiles derivan de su

metabolismo a partir de la ruta del ácido shikímico. Por lo tanto, es posible que la aplicación foliar de una dosis alta del extracto comercial del alga a las vides de Tempranillo Blanco pudiera desencadenar la actividad de ciertas enzimas relacionadas con la producción de flavanoles, de flavonoles y de alcoholes, tales como la AR, la LAR y la ADH, utilizando a la fenilalanina como substrato y de esta forma, permitir una mayor síntesis de estos compuestos en las uvas. Por otro lado, el contenido de las demás familias de compuestos químicos se vio más afectado por las características climáticas de la añada que por la aplicación foliar del extracto del alga a las vides. Es así como, el nivel de precipitaciones y de humedad relativa condicionó el tamaño de las bayas y la aparición de ciertas enfermedades criptogámicas en la uva afectando, probablemente, al contenido y a la síntesis de ciertos compuestos volátiles, fenólicos y nitrogenados en las uvas. Por último, la aplicación foliar del alga en ambas dosis a las vides no tuvo un efecto significativo en el contenido de compuestos volátiles del vino de Tempranillo Blanco y parece ser que su producción dependió más del contenido inicial de nitrógeno fácilmente asimilable del mosto que de los tratamientos aplicados al viñedo.

5.2. Efecto de la aplicación foliar del alga *Ascophyllum nodosum* en las uvas y en los vinos de Tempranillo

5.2.1. Compuestos fenólicos

El contenido de los antocianos acetilados se vio afectado significativamente por el factor añada. Tarara et al. (2008) mostraron que la exposición a la radiación solar de las uvas que estuvieron previamente a la sombra, disminuyó la concentración de ciertos antocianos acetilados. Las escasas diferencias anuales en el contenido de los antocianos podrían explicarse debido a que el peso de la baya, que fue condicionado por la disponibilidad de agua en el suelo, no determina la concentración de antocianos de la uva, siendo la acumulación de sólidos solubles la variable que más afecta a su contenido (Ferrer et al., 2014; Martínez-Gil et al., 2018). La dosis baja del extracto del alga aplicado foliarmente a las vides de la variedad Tempranillo, aumentó el contenido de los antocianos mayoritarios de la uva solo en la añada 2017. Frioni et al. (2018) han demostrado que la aplicación foliar de un extracto comercial del alga *A. nodosum* a las vides de las variedades Cabernet Franc, Pinot Noir y Sangiovese no afectó el intercambio gaseoso de las hojas, ni el rendimiento, ni el tamaño de las bayas, pero si aumentó la acumulación de los antocianos en las uvas. Resultados similares han sido mostrados por Salvi et al. (2019) tras la aplicación foliar de un extracto comercial del alga *A. nodosum* a las vides de la variedad Sangiovese. Asimismo, Taskos et al. (2019) demostraron que la aplicación foliar de un extracto comercial del alga *A. nodosum* aplicado a vides de la variedad Merlot permitió aumentar el contenido de los antocianos en las bayas, mejorando la capacidad de extracción de estos compuestos de los hollejos. Al parecer, ciertos mecanismos de regulación de genes relacionados con la defensa de las vides en contra de factores bióticos y abióticos son activados después de las aplicaciones foliares de las algas. En este sentido, Frioni et al. (2019) han demostrado que el aumento en la concentración de antocianos y

otros compuestos fenólicos en las bayas después de las aplicaciones de las algas en las vides, se correlacionó con una modulación específica de genes involucrados en las rutas metabólicas de la síntesis de los compuestos flavonoideos. Con respecto al contenido de los antocianos del vino, el factor añada afectó significativamente al contenido de la mayoría de estos compuestos. Las diferencias anuales en el contenido de los antocianos probablemente se deben atribuir a la duración de la fermentación maloláctica de los vinos, la cual tuvo una mayor duración en la añada 2018 que en la 2017. Abrahamse y Bartowsky (2012) demostraron que, al inocular bacterias lácticas al comienzo de la fermentación alcohólica, el tiempo de las vinificaciones se reducía en seis semanas. Estos autores mostraron que el contenido de antocianos individuales no acilados, acetilados y cumaroilados, incluido el contenido de los antocianos totales, fue mayor en los vinos coinoculados (en los cuales la duración de las vinificaciones fue menor) que en los vinos inoculados después de que finalizara la fermentación alcohólica. Por otro lado, el fenómeno de copigmentación es responsable, en una proporción sustancial, del color de los vinos tintos jóvenes (Hermosín-Gutiérrez et al., 2005). Este fenómeno se basa en las interacciones producidas entre los antocianos y otras moléculas que actúan como copigmentos (Boulton, 2001; Gombau et al., 2019). Dado que los antocianos están involucrados en diferentes reacciones para producir nuevos pigmentos, es probable que la acumulación de antocianos disminuya en los vinos a medida que avanza el proceso de vinificación.

El contenido de catequina en la uva no se vio afectado por la aplicación de los tratamientos a las vides de Tempranillo. Sin embargo, el contenido de catequina fue mayor en las muestras de las uvas cosechadas en la añada 2017 en comparación a las del 2018. En general, el contenido de catequina es mayor en las bayas cosechadas de las vides que poseen un bajo vigor en comparación a las bayas provenientes de las vides que presentan un alto vigor, debido principalmente a la

influencia de la disponibilidad de agua y nutrientes para las vides y su efecto en el tamaño de la baya (Ojeda et al., 2002; Teixeira et al., 2013a).

Como en el caso de los antocianos, la dosis baja del alga aumentó el contenido de la mayoría de los flavonoles de la uva solo en la añada 2017. Es posible que la aplicación del alga a las vides de Tempranillo en una añada seca permita la activación de enzimas relacionadas con la biosíntesis de antocianos y de flavonoles. El contenido de flavonoles fue mayor en los vinos elaborados en la añada 2017 que en la 2018, mientras que el contenido de catequina en los vinos fue similar en ambas añadas. En este sentido, los antocianos pueden formar interacciones no covalentes con otros compuestos fenólicos para crear los fenómenos de copigmentación (Waterhouse et al., 2016; de Freitas et al., 2017). Los mejores cofactores de los antocianos para formar copigmentos son las estructuras aromáticas planas, ya que las estructuras aromáticas no planas se ven desfavorecidas por efectos estéricos (de Freitas et al., 2017; Gombau et al., 2019). De esta manera, la quercetina (plana) tiene una constante de disociación de 2.900 M^{-1} , mientras que la catequina (no plana) tiene una constante de disociación de 90 M^{-1} (Waterhouse et al., 2016). Por otro lado, la acidez volátil fue significativamente mayor en los vinos producidos en la añada 2018 que en la 2017. En este sentido, el contenido de la acidez volátil de los vinos y de los fenómenos de copigmentación asociados a una mayor duración de las vinificaciones, podrían haber afectado negativamente al contenido de los compuestos flavonoideos monoméricos de los vinos producidos en la añada 2018.

Los ácidos hidroxicinámicos se acumulan generalmente en los hollejos y, predominantemente, en la pulpa de las uvas (Teixeira et al., 2013b). Debido a esto, es probable que el aumento en el tamaño de las bayas debido a las altas precipitaciones caídas en 2018 en comparación con la añada 2017, permitiera alcanzar un mayor contenido de ciertos ácidos

hidroxicinámicos en 2018 en comparación con la añada 2017. Como se ha mencionado, los estilbenos se sintetizan en las hojas de la vid y en los hollejos de la uva en forma glucosilada en respuesta a la afección de enfermedades criptogámicas y a la radiación UV excesiva (Teixeira et al., 2013b; Waterhouse et al., 2016). Es posible que la afección de *B. cinerea* en las bayas de Tempranillo haya aumentado la síntesis de estilbenos, principalmente de *trans*-piceido, en 2018 en comparación con la añada 2017. Las aplicaciones del alga tuvieron un efecto positivo en la síntesis de los ácidos hidroxicinámicos y de los estilbenos en las uvas, y no así, en la síntesis de los antocianos. Así, la enzima estilbeno sintasa (STS) puede competir con la chalcona sintasa (CHS), disminuyendo la capacidad de sintetizar antocianos en respuesta al estrés biótico y abiótico como consecuencia de un aumento en la biosíntesis de los estilbenos (Jeandet et al., 1995). Es posible que las aplicaciones foliares del alga a las vides puedan desencadenar la actividad de la enzima STS sobre la CHS, induciendo la biosíntesis de los estilbenos en lugar de los antocianos en las bayas. Asimismo, ambas dosis de la aplicación foliar del extracto comercial del alga permitieron aumentar el contenido de los estilbenos en las uvas en 2017 y 2018, siendo la aplicación de la dosis alta del alga, el tratamiento que más incrementó su contenido. Por lo tanto, es posible que la aplicación del alga a las vides desencadene la síntesis de los estilbenos en la uva a través de la activación de enzimas relacionada con su formación. Respecto al contenido de los compuestos no flavonoideos en los vinos, Bimpilas et al. (2016), demostraron que la adición de extractos vegetales ricos en ácidos hidroxicinámicos permitió un aumento de los antocianos copigmentados y mejoraron la intensidad del color de los vinos entre un 15 y 50 %, lo que confirma la capacidad de estos compuestos para formar copigmentos. De esta manera, es probable que la acumulación de ácidos hidroxicinámicos, principalmente de los ácidos *cis*-caftárico y *trans*-fertárico disminuya en los vinos a medida que avanza el proceso de vinificación. Por otro lado, el

ácido gálico es uno de los ácidos hidroxibenzoicos que más abundantemente se encuentra en los vinos y no solo se origina en la uva, sino que también se produce por hidrólisis de taninos hidrolizables y condensados (Waterhouse et al., 2016). Debido a esto, es probable que una mayor duración de la vinificación permita alcanzar una alta hidrólisis de flavanoles, razón por la cual probablemente el contenido de los ácidos hidroxibenzoicos en los vinos haya sido mayor en la añada 2018 en comparación con la 2017.

5.2.2. Compuestos nitrogenados

El contenido de ciertos aminoácidos en el mosto se vio incrementado con la aplicación foliar de la dosis baja del extracto del alga a las vides de Tempranillo solo en la añada 2017. Sin embargo, en 2018, no hubo diferencias significativas en el contenido de los aminoácidos del mosto después de la aplicación de ambas dosis del alga. Solo un trabajo ha estudiado los efectos de las aplicaciones de un extracto comercial de alga a las vides en el contenido de aminoácidos de la uva (Gutiérrez-Gamboa et al., 2017c). Este estudio mostró que un extracto comercial del alga *Durvillaea antarctica* aplicado a vides de la variedad Cabernet Sauvignon aumentó la concentración de varios aminoácidos tales como la alanina, la arginina, la glutamina, la metionina, la serina, la treonina, así como también el contenido de nitrógeno amino en las uvas. En otros cultivos, se ha demostrado que las aplicaciones foliares de fertilizantes comerciales producidos a partir de diversas especies de algas como la *Ecklonia maxima* y la *A. nodosum* a manzanos (*Malus domestica*) aumentaron el contenido total de nitrógeno en las manzanas (Basak, 2008). La aplicación de un extracto comercial de *A. nodosum* a plantas de colza (*Brassica napus*) mejoró el crecimiento de las raíces y de los brotes al estimular la acumulación del nitrógeno y del sulfato (Jannin et al., 2013). En otro estudio, la aplicación de un extracto comercial de *A. nodosum* a las

raíces de espinacas (*Spinacia oleracea*) desencadenó la expresión de las enzimas glutamina sintetasa (GS) y de nitrato reductasa (NR) (Fan et al., 2013). Además, las aplicaciones de *A. nodosum* en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) cultivadas en condiciones de estrés salino permitieron la acumulación de minerales, antioxidantes y, en especial de aminoácidos esenciales en los frutos (Di Stasio et al., 2018). Por lo tanto, parece ser que las aplicaciones de algas pueden inducir a la expresión de genes involucrados en la asimilación de nitratos y en el metabolismo de síntesis de aminoácidos (Shukla et al., 2019).

Se observó, además, que el tratamiento afectó significativamente a la concentración de citrulina + treonina, de histidina, de isoleucina, de leucina, de prolina y de valina en los mostos. Estos aminoácidos, con la excepción de la citrulina, de la histidina y de la prolina, son precursores de ciertos alcoholes superiores de los vinos, tales como el 1-propanol, el 2-metil-1-propanol, el 2-metil-1-butanol y el 3-metil-1-butanol, que son liberados por las levaduras durante la fermentación alcohólica (Bell y Henschke, 2005). El factor añada afectó considerablemente a la concentración de amonio y de la mayoría de los aminoácidos del mosto y de su contenido total. En este sentido, durante la añada más seca, la aplicación de la dosis baja del alga a las vides Tempranillo aumentó considerablemente a la concentración de varios de los aminoácidos en el mosto, mientras que, durante la añada más húmeda, la dosis alta aplicada a las vides fue el tratamiento más efectivo, aumentando el contenido de ciertos compuestos nitrogenados del mosto. La disponibilidad de agua para las vides podría condicionar la maduración de la uva, afectando al tamaño de la baya y a la síntesis de varios metabolitos secundarios en las uvas (Keller, 2015; Gutiérrez-Gamboa et al., 2018a). Ciertos aminoácidos, tales como el ácido γ -aminobutírico, la arginina, la fenilalanina, la histidina, la isoleucina, la leucina, la metionina, la prolina, la serina, el triptófano y la valina, así como también, el contenido total de aminoácidos presentan una concentración máxima cuando el

contenido de sólidos solubles es cercana a los 25 °Brix (Garde-Cerdán et al., 2018a). Por otra parte, las uvas de vides cultivadas en sitios frescos, bajo condiciones de alta disponibilidad de agua, presentaron un mayor contenido de aminoácidos que las uvas de vides cultivadas en sitios cálidos, bajo condiciones de baja disponibilidad de agua (Gutiérrez-Gamboa y Moreno-Simunovic, 2018; Gutiérrez-Gamboa et al., 2018a). Como ha sido mencionado anteriormente, durante la añada 2017, las precipitaciones caídas fueron significativamente menores que las del 2018, mientras que la ET_0 fue similar en ambas añadas. En este sentido, en 2017, las vides tuvieron un mayor nivel de estrés hídrico que las vides de la añada 2018, lo que pudo condicionar la acumulación de aminoácidos en la uva. Por otro lado, se ha demostrado que en general, la inducción de resistencia mediante el uso de elicitores a menudo resulta en costos fisiológicos para las plantas, tales como la degradación de compuestos nitrogenados y/o la redistribución de estos compuestos en órganos de reserva (Barbosa et al., 2008; Gutiérrez-Gamboa et al., 2017b). Como se mencionó anteriormente, las algas se consideran actualmente como bio-elicitors (Ben Salah et al., 2018). Por lo tanto, de acuerdo con nuestros resultados, es posible que una dosis alta del alga aplicada foliarmente a las vides con menos disponibilidad de agua no afecte o incluso degrade los aminoácidos que se sintetizan en las uvas. Por el contrario, es posible que la elicitación a través de la aplicación de una dosis baja del tratamiento foliar del alga a las vides con alta disponibilidad de agua, no tenga efectos sobre el contenido de los aminoácidos de la uva, ya que la concentración de algas aplicada a las vides no fue lo suficientemente abundante para inducir algún tipo de resistencia en las vides. Por lo tanto, las condiciones climáticas de la añada parecen ser un factor importante que pueden afectar al contenido de los compuestos nitrogenados de la uva Tempranillo tras la aplicación foliar de las distintas dosis del extracto comercial del alga a las vides.

Respecto al contenido de los aminoácidos del vino, este fue afectado significativamente por el factor añada. El amonio es un componente importante del nitrógeno fácilmente asimilable y es una de las fuentes de nitrógeno preferenciales para las levaduras (Bell y Henschke, 2005). De acuerdo con nuestros resultados, el contenido de amonio en los mostos representó alrededor del 13 al 21 % del nitrógeno fácilmente asimilable en la añada 2017 y, alrededor del 37 al 42 % del nitrógeno fácilmente asimilable en 2018. Huang y Ough (1989) mostraron que el porcentaje de amonio en los mostos de distintas variedades de vides oscila entre el 2 y el 53% del nitrógeno fácilmente asimilable. Durante la fermentación alcohólica, las levaduras pueden usar un mecanismo denominado represión catabólica nitrogenada (NCR) para regular su preferencia por ciertas fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables mediante la expresión de permeasas y la degradación de permeasas no apropiadas (Magasanik y Kaiser 2002; Bell y Henschke, 2005). De acuerdo con esto, la asparagina, la glutamina y el amonio se acumulan preferentemente sobre otros aminoácidos a lo largo de la fermentación alcohólica, tales como el ácido aspártico, el ácido glutámico, la alanina, la arginina y la glicina, y posteriormente, las fuentes de nitrógeno menos preferidas, tales como la urea y la prolina pueden ser acumuladas (Bell y Henschke, 2005). En este sentido, a partir de un nivel entre bajo y moderado de nitrógeno fácilmente asimilable (como en la añada 2017), todas las fuentes fácilmente asimilables de nitrógeno se acumulan en la levadura, cambiando la expresión de las permeasas a medida que el nitrógeno fácilmente asimilable del mosto se consume (Beltran et al., 2004; Bell y Henschke, 2005). En condiciones de alto nitrógeno fácilmente asimilable en el mosto (como en la añada 2018), cuando las mejores fuentes de nitrógeno, principalmente amonio, no se agotan, la NCR puede prevalecer durante la fermentación alcohólica, limitando el consumo de los aminoácidos por las levaduras (Bell y Henschke, 2005). Las diferencias anuales en la concentración de los aminoácidos y del amonio de los vinos

producidos podría estar condicionado por la concentración inicial del nitrógeno fácilmente asimilable de los mostos, la cual se vio influenciada principalmente por las condiciones climáticas de cada añada.

5.2.3. Compuestos volátiles

El perfil de los terpenos sintetizados en las bayas durante las diversas etapas de maduración de la uva es cambiante, por lo que los mecanismos involucrados en su biosíntesis también difieren a lo largo de la maduración (Zhang et al., 2016). Estos autores sugirieron que los terpenos producidos durante el desarrollo temprano de la baya pueden degradarse en otros compuestos o convertirse en formas no volátiles. Los terpenos juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de las plantas en contra de las enfermedades provocadas por hongos y por bacterias, así como también en contra de la herbivoría (Paré y Tumlinson, 1999; Tholl, 2006; Gershenzon y Dudareva, 2007; Alem et al., 2019). De esta manera, durante la añada 2018 se produjo una mayor presión de enfermedades como consecuencia del alto nivel de precipitación y de humedad relativa en comparación con la añada 2017, lo cual ha dado lugar probablemente a una síntesis mayor en la añada 2018 de ciertos terpenos como la geranil acetona, el geraniol y el oxido de linalool en la uva. Por otro lado, se ha demostrado que la aplicación de elicitores a las vides permite inducir la activación del metabolismo de los terpenos al aumentar la actividad de las enzimas geranilgeranil difosfato sintasa y terpeno sintasa, dando lugar a la síntesis de terpenos en las uvas (D'Onofrio et al., 2018). Es posible que, debido a lo mencionado anteriormente, durante la temporada en la que se alcanzó una alta presión de enfermedades criptogámicas debido a las altas precipitaciones y la humedad relativa, la aplicación foliar de una dosis alta del alga a las vides permitiera aumentar la concentración de la mayoría de los terpenos analizados en las uvas.

Como lo afirman ciertos autores, el jasmonato de metilo es emitido por plantas que han sufrido heridas y funciona como mediador de respuestas a estímulos externos, como las heridas y la invasión de patógenos (Yu et al., 2011; Rohwer y Erwin, 2008). Es posible que, debido a estas condiciones, el jasmonato de metilo fuera detectado solo en los mostos de la añada 2018. El tratamiento no afectó significativamente al contenido de los C₁₃ norisoprenoides de los mostos, mientras que la añada tuvo una influencia significativa en el contenido de (Z)- β -damascenona, de 1,1,6-trimetil-1,2-dihidronaftaleno (TDN) y de β -ionona en los mostos. El contenido de (Z)- β -damascenona y de TDN fue mayor en los mostos de en la añada 2018 que en los del 2017. Se ha observado que los racimos expuestos al sol presentaron un mayor contenido de compuestos C₁₃ norisoprenoides en las uvas en comparación a los racimos expuestos a la zona de sombra, y estas diferencias se mantuvieron en los vinos producidos (Marais et al., 1992). La exposición de racimos a la radiación UV aumentó ligeramente el contenido de β -ionona en comparación con los racimos que no fueron expuestos (Song et al., 2015). Es posible que las diferencias anuales en el contenido de (Z)- β -damascenona y de TDN en los mostos se debiera a la mayor radiación alcanzada en el mes más cálido de la añada 2018 en comparación al mismo mes de la añada 2017.

Los ésteres se empiezan a sintetizar en etapas tempranas de maduración de la uva y se producen debido a la actividad de la enzima alcohol acetil transferasa (*AAT*) (Kalua y Boss, 2009). En este sentido, es probable que durante la añada en la que la presión de enfermedades fue mayor debido a la alta cantidad de lluvias caídas y de la alta humedad relativa, la aplicación foliar del alga en una dosis alta a las vides de Tempranillo podría desencadenar la actividad de la enzima *AAT*, aumentando la concentración de acetato de hexilo y ésteres totales en las uvas.

Como ocurrió con los mostos de la variedad Tempranillo Blanco, la concentración de benzaldehído y de 2-feniletanol en los mostos de Tempranillo de la añada 2018 fue

significativamente mayor que la de los mostos obtenidos en 2017, mientras que los mostos obtenidos en 2017 mostraron un mayor contenido de 2-feniletanal y de alcohol bencílico que los mostos del 2018. Así, una alta producción de benzaldehído y de 2-feniletanol en las uvas, está asociada a la actividad enzimática de *B. cinerea* a través de la utilización del alcohol bencílico como sustrato enzimático (Genovese et al., 2007; Negri et al., 2017). Por otro lado, de acuerdo a los resultados expuestos anteriormente, es posible que la aplicación foliar del alga a las vides de Tempranillo durante una añada húmeda pueda desencadenar una mayor actividad de enzimas relacionadas con la síntesis de bencénicos en las uvas.

Los alcoholes se producen a partir de la reducción de aldehídos por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) (Kalua y Boss, 2009). Por lo tanto, parece ser que el extracto comercial del alga aplicado en una dosis alta a las vides de Tempranillo en la añada más húmeda pudo desencadenar la síntesis del 1-heptanol y del 2-etil-1-hexanol en las uvas mediante la activación de la enzima ADH.

Respecto al contenido de compuestos carbonílicos, la concentración en el mosto de la mayoría de estos compuestos fue mayor en 2018 que en 2017. Así, se ha demostrado que una alta presión de enfermedades en la vid puede causar un incremento general de la γ -decalactona en las uvas y probablemente de otros compuestos carbonílicos (Barbe et al., 2000; Lopez Pinar et al., 2017). Por otro lado, la dosis alta del alga aplicada foliarmente a las vides de Tempranillo aumentó el contenido individual de algunos compuestos carbonílicos en los mostos como el decanal y el octanal en ambas añadas. En este sentido, parece ser que la aplicación de una dosis alta del extracto comercial del alga en las vides de la variedad Tempranillo, independientemente de las condiciones climáticas de la añada, podría desencadenar la síntesis de ciertos compuestos carbonílicos en las uvas debido a la activación de las enzimas relacionadas con su síntesis.

Respecto al contenido de compuestos C6 en los mostos, ambos factores (tratamiento y añada) de forma individual afectaron significativamente al contenido de todos los compuestos C6 analizados. El contenido de hexanal fue mayor en los mostos obtenidos en 2018 que en los de 2017, lo que coincidió con una mayor acidez total y un mayor contenido del ácido málico, así como también de un pH más bajo. El contenido de 1-hexanol, así como también el contenido total de compuestos C6, fue mayor en los mostos obtenidos en 2017 que en 2018. Esto posiblemente se debe a que los alcoholes C6 disminuyen durante la maduración de la uva, mientras que los aldehídos C6 se acumulan hasta la cosecha y posteriormente, su síntesis comienza a disminuir (Fang y Qian, 2012). Se ha demostrado que la concentración de ciertos compuestos C6, tales como el hexanal, el (E)-2-hexenal y el 1-hexanol disminuye en respuesta al estrés hídrico de las vides (Song et al., 2012). Estos resultados solo coincidieron con el contenido de 1-hexanol de los mostos obtenidos en 2017 (añada seca) comparando a las de 2018 (añada húmeda). Por otro lado, de acuerdo a los resultados expuestos anteriormente, es posible que la aplicación foliar del alga a las vides de Tempranillo en una añada seca pueda desencadenar la síntesis de hexanal en las uvas.

Respecto al contenido de compuestos volátiles de los vinos, la concentración de la mayoría de los alcoholes superiores fue superior en los vinos producidos en la añada 2018 que en los vinos elaborados en 2017. Esta misma tendencia se observó en el contenido de nitrógeno fácilmente asimilable de los mostos. Como ha sido mencionado anteriormente, los alcoholes superiores pueden producirse de forma anabólica a partir de los azúcares y la vía catabólica a partir de los aminoácidos a través de la vía de Eirlich (Bell y Henschke, 2005).

Es posible que, al igual que los alcoholes superiores, el contenido de ésteres esté condicionado por el contenido inicial del nitrógeno fácilmente asimilable del mosto ya que el factor añada afectó el contenido de la mayoría de los ésteres, a excepción del acetato de 2-feniletilo.

Los ésteres se forman por reacción de un ácido carboxílico y un alcohol a través de la esterificación enzimática o no enzimática de los ácidos carboxílicos (Waterhouse et al., 2016). Los alcoholes que participan en estas reacciones son subproductos de la biosíntesis de los aminoácidos o pueden derivar de las uvas (Waterhouse et al., 2016).

Respecto a los ácidos grasos en el vino, el factor añada afectó significativamente al contenido de todos los ácidos grasos, incluido su contenido total. Los ésteres de ácidos grasos de cadena media son componentes importantes de la composición celular de la levadura y su autólisis proporciona ciertos compuestos al vino, tales como ácidos grasos, aminoácidos, entre otros (González-Marco et al., 2010). Por lo tanto, es probable que la producción de ácidos grasos en los vinos también pueda estar relacionada con el contenido inicial del nitrógeno fácilmente asimilable de los mostos debido a sus implicaciones en el crecimiento y en el desarrollo de la levadura durante la fermentación alcohólica.

En síntesis, durante la añada seca, la dosis baja de la aplicación foliar del alga aumentó la concentración de varios de los aminoácidos en los mostos, así como también de varios de los antocianos no acilados, de los antocianos totales, de flavonoles derivados de la miricetina y de la quercetina, de los flavonoles totales, de varios de los ácidos hidroxicinámicos y de los estilbenos en las uvas. En la añada húmeda la dosis alta del alga aumentó la concentración en el mosto de algunos de los aminoácidos y de los compuestos fenólicos de la uva, y de la mayoría de los compuestos volátiles analizados, incluyendo el contenido total de la mayoría de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados, excepto el de los alcoholes totales en el mosto. Los mostos obtenidos en la añada seca presentaron una concentración más baja de aminoácidos, de ciertos compuestos carbonílicos y de alcoholes que los mostos obtenidos en la añada húmeda. En las dos añadas, la aplicación foliar de ambas dosis del alga, aumentó el contenido de los

estilbenos de las uvas. La composición de nitrógeno del mosto parece haber condicionado la concentración de aminoácidos y de compuestos volátiles en los vinos ya que los vinos producidos en la añada húmeda presentaron una mayor cantidad de estos compuestos que los vinos producidos en la añada seca. Por lo tanto, la aplicación foliar en una dosis baja a las vides de Tempranillo que crecen bajo condiciones hídricas limitadas podría activar la síntesis de varios aminoácidos y de compuestos fenólicos en las uvas, mientras que la aplicación foliar del alga aplicada a una dosis alta a las vides de Tempranillo que crecen bajo una alta presión de enfermedades podría activar la síntesis de la mayoría de los compuestos volátiles de las uvas.

6. Conclusiones

6.1. Efectos de la aplicación foliar del alga *Ascophyllum nodosum* en el contenido de compuestos fenólicos, nitrogenados y volátiles de la uva y del vino de Tempranillo Blanco

Las distintas dosis de algas aplicadas foliarmente a las vides de Tempranillo Blanco y de Tempranillo, afectaron de forma diferencial al contenido de compuestos fenólicos, nitrogenados y volátiles de las uvas y de los vinos, lo cual estuvo influenciado por las condiciones climáticas de las añadas evaluadas.

Se ha demostrado que la catequina ha sido el compuesto fenólico más abundante encontrado en las uvas y en los vinos de la variedad Tempranillo Blanco. El perfil de los flavonoles de las uvas de esta variedad estuvo dominado por los flavonoles de tipo quercetina, seguido por los de tipo kaempferol y por último por los de tipo isorhamnetina. Respecto al contenido de aminoácidos en el mosto, Tempranillo Blanco se comportó como una variedad acumuladora de arginina. En general, los aminoácidos más abundantes en los mostos de esta variedad fueron la arginina, el ácido glutámico, la citrulina + treonina, la glutamina, el ácido aspártico y la α -alanina, que representaron un 69,6 % del total de aminoácidos, mientras que los aminoácidos menos abundantes fueron la leucina, la isoleucina, la metionina, la lisina, la ornitina y la glicina, que representaron un 2,5 % del total de aminoácidos. Los compuestos C6, tales como el (E)-2-hexenal, el (E)-2-hexenol y el hexanal fueron los compuestos volátiles más abundantes encontrados en los mostos de Tempranillo Blanco, mientras que la (E)- β -damascenona fue el compuesto varietal más importante en los mostos de esta variedad.

La aplicación foliar del extracto comercial del alga a una dosis alta a las vides de Tempranillo Blanco aumentó la concentración de catequina y de la mayoría de los flavonoles

individuales de las uvas en las añadas 2017 y 2018. En la añada 2017, este tratamiento aumentó la concentración de varios de los aminoácidos analizados en los mostos, mientras que en la añada 2018, ambas dosis aplicadas a las vides no afectaron significativamente a la concentración de los aminoácidos de los mostos. La aplicación de la dosis alta del extracto del alga a las vides, permitió aumentar la concentración de fenilalanina de los mostos en ambas añadas de estudio. Debido a esto, es posible que las aplicaciones de algas, en especial las aplicadas a una dosis alta, puedan ejercer un efecto elicitor en las vides desencadenando la síntesis de ciertos aminoácidos, de compuestos fenólicos y volátiles en las uvas. La concentración de terpenos y de C₁₃ norisoprenoides en los mostos se vio más afectada por las condiciones climáticas de la añada que por las aplicaciones de las dosis del alga a las vides. La aplicación del alga a una dosis alta a las vides de Tempranillo Blanco aumentó, en general, la concentración de la mayoría de los compuestos C₆ de los mostos.

Las diferencias anuales en el peso de la baya, en el contenido de ciertos parámetros enológicos del mosto y del vino, en el contenido de la mayoría de los aminoácidos, y de ciertos compuestos fenólicos y volátiles de la uva y del vino, se pueden atribuir a que la humedad relativa y, en especial las precipitaciones, fueron significativamente mayores en la añada 2018 que en la 2017. Es así como el contenido de prolina y tirosina en los mostos, mostró una mayor concentración en la añada más seca, mientras que el contenido de la mayoría de los aminoácidos analizados en el mosto y en el vino, así como también el del nitrógeno fácilmente asimilable fue mayor en la añada más húmeda. Es probable que la prolina y la tirosina sean sintetizados de forma acelerada en condiciones de limitación de agua en las vides, por lo que podrían ser propuestos como indicadores de ciertos niveles de estrés hídrico en las vides.

El contenido de ácidos hidroxicinámicos de las uvas y de los vinos no se vio afectado de manera significativa por las dosis del extracto comercial del alga aplicadas foliarmente a las vides de Tempranillo Blanco. Es posible que, el contenido de ácidos hidroxicinámicos y de ácidos hidroxibenzoicos se viera afectado por las diversas reacciones de oxidación que ocurren en los mostos y en los vinos, mientras que el contenido de estilbenos en los vinos pudo haber sido afectado por la incidencia de enfermedades criptogámicas en las uvas. La aplicación foliar del extracto comercial de algas a las vides tampoco afectó de forma significativa al contenido de compuestos volátiles y de aminoácidos del vino. Es así como, el contenido de nitrógeno fácilmente asimilable de los mostos podría haber condicionado la composición volátil y de aminoácidos del vino Tempranillo Blanco.

Por lo tanto, según lo estudiado, la aplicación foliar de una dosis alta del alga *A. nodosum* a las vides de Tempranillo Blanco pudo desencadenar la síntesis de fenilalanina en los mostos, independientemente de las condiciones climáticas de la temporada, comportándose como un elicitador de tipo biótico. El contenido de catequina, de flavonoles y de ciertos compuestos volátiles en las uvas también se vio incrementado por la aplicación de la dosis alta del alga. Es posible que estos cambios desencadenados por la aplicación foliar del extracto comercial del alga a las vides Tempranillo Blanco se deban a que la fenilalanina es usada como sustrato por las enzimas responsables de la síntesis de compuestos flavonoideos y de ciertos volátiles en las uvas.

6.2. Efectos de la aplicación foliar del alga *Ascophyllum nodosum* en el contenido de compuestos fenólicos, nitrogenados y volátiles de la uva y del vino Tempranillo

La aplicación foliar de la dosis baja del extracto comercial del alga *A. nodosum* a las vides de la variedad Tempranillo permitió aumentar la concentración en las uvas de los antocianos

mayoritarios, de los antocianos no acilados, de los antocianos totales, de los flavonoles de tipo miricetina y quercetina, de los flavonoles totales, de varios de los ácidos hidroxicinámicos, de los estilbenos y de la mayoría de los aminoácidos del mosto en la añada 2017. La aplicación de una dosis alta del extracto comercial del alga aumentó el contenido de ciertos flavonoles de tipo miricetina, el contenido individual y total de los estilbenos de las uvas y el contenido de ciertos compuestos carbonílicos del mosto en la añada 2017. La dosis alta del extracto comercial del alga aumentó la concentración de la mayoría de los compuestos volátiles analizados en los mostos, incluido el contenido total de la mayoría de las familias químicas de los compuestos volátiles analizados, excepto el de los alcoholes, e incrementó el contenido de algunos aminoácidos en los mostos en la añada 2018. En general, las aplicaciones de ambas dosis del alga a las vides de Tempranillo aumentaron el contenido de *trans*-piceido y de los estilbenos totales en las uvas en ambas añadas de estudio.

En los vinos, la concentración de antocianos y flavonoles disminuyó a medida que la duración de la fermentación maloláctica y la acidez volátil era mayor, mientras que el contenido de ácidos hidroxibenzoicos y de estilbenos en los vinos tuvo un efecto opuesto. La composición de nitrógeno del mosto condicionó la concentración de los aminoácidos en los vinos, así como también la producción de los compuestos volátiles del vino ya que las muestras producidas en la añada 2018 presentaron una mayor cantidad estos compuestos en comparación con las muestras obtenidas en 2017.

Por lo tanto, el alga *A. nodosum* podría actuar como elicitador en las vides de la variedad Tempranillo desencadenando la síntesis de los estilbenos en las uvas independientemente de las condiciones climáticas de la añada. La aplicación de una dosis baja del alga a las vides de Tempranillo en una añada en la que la disponibilidad de agua para las vides es baja, podría

aumentar el contenido de aminoácidos, y de amonio en el mosto, y de la mayoría de los compuestos fenólicos de la uva, mientras que la aplicación de una dosis alta del alga a las vides de esta variedad en una añada húmeda podría aumentar el contenido de ciertos aminoácidos, del amonio y de la mayoría de los compuestos volátiles del mosto.

7. Conclusions

7.1. Effects of *Ascophyllum nodosum* seaweed application in the content of phenolic, nitrogen and volatile compounds of Tempranillo Blanco grapes and wines

Both dosages of the seaweed commercial extract applied foliarly to Tempranillo Blanco and Tempranillo grapevines differentially affected the content of phenolic, nitrogen and volatile compounds of grapes and wines, which depended on the climatic conditions of the season.

As it was aforementioned, catechin was the most abundant phenolic compound found in grapes and wines of Tempranillo Blanco grapevine variety. The flavonols profile of the grapes from this variety was dominated by the quercetin-type flavonols, followed by kaempferol-type flavonols, and finally by the isorhamnetin-type flavonols. Regarding the must amino acid content, Tempranillo Blanco behaved as an arginine accumulator grapevine variety. Generally, the most abundant amino acids found in the Tempranillo Blanco musts were arginine, glutamic acid, citrulline + threonine, glutamine, aspartic acid and α -alanine, respectively, which represented around 69.6 % of the total amino acids, while the least abundant amino acids in the musts were leucine, isoleucine, methionine, lysine, ornithine and glycine, respectively, which represented 2.5 % of the total amino acids. The most abundant volatile compounds in Tempranillo Blanco musts were C6 compounds, such as (E)-2-hexenal, (E)-2-hexenol and hexanal, while (E)- β -damascenone was the most important varietal volatile compound in the musts of this variety.

The foliar seaweed application at a high dosage to Tempranillo Blanco grapevines increased the concentration of catechin and most of the individual flavonols in grapes in the 2017 and 2018 seasons. In 2017, this treatment increased the concentration of several amino acids in the musts, while in 2018, the content of amino acids in the musts was barely affected by the treatments.

The high dosage of the seaweed commercial extract applied to the grapevines allowed to increase the concentration of phenylalanine in the musts in both seasons. Due to this, it is possible that seaweed applications, mainly applied at a high dosage, can exert an elicitor effect in grapevines, triggering the synthesis of certain amino acids, phenolic and volatile compounds in grapes. The concentration of terpenes and C₁₃ norisoprenoids in the musts was affected by the climatic conditions of the season more than the seaweed applications to the grapevines. The seaweed commercial extract applied at a high dosage to Tempranillo Blanco grapevines generally increased the concentration of most of C₆ compounds in grapes.

The annual differences in the weight of berries, in the content of certain oenological parameters of musts and wines, in the content of the majority of the amino acids, of certain phenolic and volatile compounds of the grapes and the wines can be attributed to the fact that relative humidity and, especially, rainfall were significantly higher in the 2018 than in 2017 season. Additionally, the content of proline and tyrosine in the musts showed a higher concentration in the driest season, while the content of most of the amino acids analyzed in the musts and wines, and the yeast assimilable nitrogen in the musts was higher in the wettest season. It seems to be that the proline and the tyrosine are synthesized in an accelerated way under water limitation conditions, so they could be proposed as indicators of certain levels of water stress in the grapevines.

The content of hydroxycinnamic acids in grapes and wines was barely affected by the foliar seaweed applications to Tempranillo Blanco grapevines. It is possible that the content of hydroxycinnamic acids and hydroxybenzoic acids has been affected by the oxidation reactions occurred in musts and wines, while the stilbene content in wines was probably altered by the cryptogamic diseases in grapes. Seaweed applications to the grapevines also did not significantly affect the content of volatile compounds and amino acids in wines. Thus, the yeast assimilable

nitrogen content of musts could have affected the volatile and amino acid composition of Tempranillo Blanco wines.

Therefore, it is possible that the foliar application of the *A. nodosum* seaweed extract at a high dosage to Tempranillo Blanco grapevines allowed to trigger the synthesis of phenylalanine in grapes, regardless the climate conditions of the season, behaving as a biotic-type elicitor. The content of catechin, flavonols and certain volatile compounds in the grapes was also increased by the application of the high dosage of the seaweed. It is possible that these changes triggered by the foliar application of the commercial extract of the seaweed to Tempranillo grapevines are due to the fact that phenylalanine is used as a substrate by the enzymes responsible for the synthesis of flavonoids and certain volatiles compounds.

7.2. Effects of *Ascophyllum nodosum* seaweed application in the content of phenolic, nitrogen and volatile compounds of Tempranillo grapes and wines

The *A. nodosum* seaweed foliar applications at a low dosage to Tempranillo grapevines allowed to increase the concentration in grapes of the majority anthocyanins, of the non-acylated anthocyanins, of the total anthocyanins, of the myricetin and quercetin flavonols, of the total flavonols, of the several hydroxycinnamic acids, of the stilbenes and most of the amino acids in the musts in 2017 season. The seaweed applied at a high dosage to grapevines increased the content of certain myricetin-type flavonols, the content of individual and total stilbenes in grapes and certain carbonyl compounds in musts in 2017 season. The seaweed application at a high dosage to the Tempranillo grapevines increased the content in the musts of most of the individual volatile compounds, including the total content of most of the chemical families of volatile compounds, except for total alcohols, and also increased the content of some amino acids in the musts in 2018.

Generally, the seaweed applications at both dosages to the grapevines increased the content of *trans*-piceid and total stilbenes in grapes in both seasons.

In wines, the concentration of anthocyanins and flavonols decreased as the duration of malolactic fermentation and volatile acidity was greater, while the content of hydroxybenzoic acids and stilbenes in wines had the opposite effect. The must nitrogen composition affected the concentration of amino acids in wines, as well as the formation of volatile compounds since the samples produced in the 2018 season had a greater amount of these compounds compared to the samples obtained in the 2017 one.

Therefore, the *A. nodosum* seaweed can act as elicitor in Tempranillo grapevines, triggering the synthesis of stilbenes in grapes, regardless the climatic conditions of the season. Seaweeds applied at a low dosage to Tempranillo grapevines in a season in which the grapevine water availability is low could increase the content of amino acids and ammonium in the musts, and most of the phenolic compounds in grapes, while a high dosage of the seaweed applied to the Tempranillo grapevines in a wet season could increase the content of certain amino acids, ammonium and most of the chemical families of volatile compounds in the musts.

8. Bibliografía

- Abrahamse, C. E., y Bartowsky, E. J. (2011). Timing of malolactic fermentation inoculation in Shiraz grape must and wine: influence on chemical composition. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 255-265.
- Adams, C., y van Vuuren, J. J. (2010). Effect of timing of diammonium phosphate addition to fermenting grape must on the production of ethyl carbamate in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 125-129.
- Agosin, E., Belancic, A., Ibacache, A., Baumes, R., Bordeu, E., Crawford, A., y Bayonove, C. (2000). Aromatic potential of certain Muscat grape varieties important for Pisco production in Chile. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 404-408.
- Alem, H., Rigou, P., Schneider, R., Ojeda, H., y Torregrosa, L. (2019). Impact of agronomic practices on grape aroma composition: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 975-985.
- Alcaide-Hidalgo, J. M., Moreno-Arribas, M. V., Martín-Álvarez, P. J., y Polo, M. C. (2007). Influence of malolactic fermentation, postfermentative treatments and ageing with lees on nitrogen compounds of red wines. *Food Chemistry*, 103(2), 572-581.
- Alva, O., Roa-Roco, R. N., Pérez-Díaz, R., Yáñez, M., Tapia, J., Moreno, Y., Ruiz-Lara, S., y González, E. (2015). Pollen morphology and boron concentration in floral tissues as factors triggering natural and GA-induced parthenocarpic fruit development in grapevine. *PLOS ONE*, 10(10), e0139503.
- Añón, A., López, J. F., Hernando, D., Orriols, I., Revilla, E., y Losada, M. M. (2014). Effect of five enological practices and of the general phenolic composition on fermentation-related aroma compounds in Mencía young red wines. *Food Chemistry*, 148, 268-275.
- Arias-Gil, M., Garde-Cerdán, T., y Ancín-Azpilicueta, C. (2007). Influence of addition of ammonium and different amino acid concentrations on nitrogen metabolism in spontaneous must fermentation. *Food Chemistry*, 103(4), 1312-1318.
- Aubert, C., Ambid, C., Baumes, R., y Günata, Z. (2003). Investigation of bound aroma constituents of yellow-fleshed nectarines (*Prunus persica* L. Cv. Springbright). Changes in bound aroma profile during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6280-6286.
- Audibert, L., Fauchon, M., Blanc, N., Hauchard, D., y Ar Gall, E. (2010). Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: distribution and radical-scavenging activities. *Phytochemical Analysis*, 21(5), 399-405.

- Ayestarán, B., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Canals, C., Adell, E., y Vilanova, M. (2019). Effect of the winemaking process on the volatile composition and aromatic profile of Tempranillo Blanco wines. *Food Chemistry*, 276, 187-194.
- Baby, T., Gilliam, M., Tyerman, S. D., y Collins, C. (2015). Differential fruitset between grapevine cultivars is related to differences in pollen viability and amine concentration in flowers. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(1), 149-158.
- Balboa, E. M., Conde, E., Moure, A., Falqué, E., y Domínguez, H. (2013). In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1764-1785.
- Barbe, J.-C., de Revel, G., Joyeux, A., Lonvaud-Funel, A., y Bertrand, A. (2000). Role of carbonyl compounds in SO₂ binding phenomena in musts and wines from botrytized grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3413-3419.
- Barbosa, M.A.G., Laranjeira, D., y Coelho, R.S.B. (2008). Physiological cost of induced resistance in cotton plants at different nitrogen levels. *Summa Phytopathologica*. 34, 338-342.
- Bardi, L., Cocito, C., y Marzona, M. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* cell fatty acid composition and release during fermentation without aeration and in absence of exogenous lipids. *International Journal of Food Microbiology*, 47(1-2), 133-140.
- Basak, A. (2008). Effect of preharvest treatment with seaweed products, Kelpak® and Goëmar BM 86®, on fruit quality in apple. *International Journal of Fruit Science*, 8(1-2), 1-14.
- Basalekou, M., Pappas, C., Kotseridis, Y., Tarantilis, P. A., Kontaxakis, E., y Kallithraka, S. (2017). Red wine age estimation by the alteration of its color parameters: Fourier transform infrared spectroscopy as a tool to monitor wine maturation time. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2017, 1-9.
- Bate, N. J., y Rothstein, S. J. (1998). C6-volatiles derived from the lipoxygenase pathway induce a subset of defense-related genes. *The Plant Journal*, 16(5), 561-569.
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., y Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Scientia Horticulturae*, 196, 39-48.
- Bavaresco, L., Fregoni, M., Trevisan, M., Mattivi, F., Vrhovsek, U., y Falchetti R. (2002). The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. *Vitis*, 41, 133-136.

- Bavaresco, L., Mattivi, F., de Rosso, M., y Flamini, R. (2012). Effects of elicitors, viticultural factors, and enological practices on resveratrol and stilbenes in grapevine and wine. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 12, 1366-1381.
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., y Mérillon, J.-M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 493-499.
- Bell, S.-J., y Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242-295.
- Beltran, G., Novo, M., Rozes, N., Mas, A., y Guillamon, J. (2004). Nitrogen catabolite repression in during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 625-632.
- Ben Salah, I., Aghrouss, S., Douira, A., Aissam, S., El Alaoui-Talibi, Z., Filali-Maltouf, A., y El Modafar, C. (2018). Seaweed polysaccharides as bio-elicitors of natural defenses in olive trees against *Verticillium wilt* of olive. *Journal of Plant Interactions*, 13(1), 248-255.
- Berli, F., D'Angelo, J., Cavagnaro, B., Bottini, R., Wuilloud, R., y Fernanda Silva, M. (2008). Phenolic composition in grape (*Vitis vinifera* L. cv. Malbec) Ripened with Different Solar UV-B radiation levels by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(9), 2892-2898.
- Bimpilas, A., Panagopoulou, M., Tsimogiannis, D., y Oreopoulou, V. (2016). Anthocyanin copigmentation and color of wine: The effect of naturally obtained hydroxycinnamic acids as cofactors. *Food Chemistry*, 197, 39-46.
- Bindon, K. A., Dry, P. R., y Loveys, B. R. (2007). Influence of plant water status on the production of C₁₃-norisoprenoid precursors in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon grape berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(11), 4493-4500.
- Bindon, K., Varela, C., Kennedy, J., Holt, H., y Herderich, M. (2013). Relationships between harvest time and wine composition in *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon 1. *Grape and wine chemistry*. *Food Chemistry*, 138, 1696-1705.
- Bindon, K. A., Kassara, S., Cynkar, W. U., Robinson, E. M. C., Scrimgeour, N., y Smith, P. A. (2014). Comparison of extraction protocols to determine differences in wine-extractable tannin and anthocyanin in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz and Cabernet Sauvignon grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(20), 4558-4570.

- Bisson, L. F. (1991). Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. In proceedings of the international symposium on nitrogen in grapes and wine. American Society for Enology and Viticulture, Davis, 78-89.
- Bisson, L. F., y Butzke, C. E. (2000). Diagnosis and rectification of stuck and sluggish fermentations. American Journal of Enology and Viticulture, 51, 168-177.
- Black, C. A., Parker, M., Siebert, T. E., Capone, D. L., y Francis, I. L. (2015). Terpenoids and their role in wine flavour: recent advances. Australian Journal of Grape and Wine Research, 21, 582-600.
- Blunden, G., Morse, P. F., Mathe, I., Hohmann, J., Critchley, A. T., y Morrell, S. (2010). Betaine yields from marine algal species utilized in the preparation of seaweed extracts used in agriculture. Natural Product Communications, 5(4), 581-585.
- Bogs, J., Downey, M. O., Harvey, J. S., Ashton, A. R., Tanner, G. K., y Robinson, S. P. (2005). Proanthocyanidin synthesis and expression of genes encoding leucoanthocyanidin reductase and anthocyanidin reductase in developing grape berries and grapevine leaves. Plant Physiology, 139(2), 652-663.
- Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. American Journal of Enology and Viticulture, 52, 67-87.
- Bouzas-Cid, Y., Falqué, E., Orriols, I., Trigo-Córdoba, E., Díaz-Losada, E., Fornos-Rivas, D., y Mirás-Avalos, J. M. (2015). Amino acids profile of two galician white grapevine cultivars (Godello and Treixadura). Ciência e Técnica Vitivinícola, 30(2), 84-93.
- Bouzas-Cid, Y., Portu, J., Pérez-Álvarez, E. P., Gonzalo-Diago, A., y Garde-Cerdán, T. (2016). Effect of vegetal ground cover crops on wine anthocyanin content. Scientia Horticulturae, 211, 384-390.
- Bouzas-Cid, Y., Trigo-Córdoba, E., Orriols, I., Falqué, E., y Mirás-Avalos, J. (2018a). Influence of soil management on the red grapevine (*Vitis vinifera* L.) Mencía must amino acid composition and wine volatile and sensory profiles in a humid region. Beverages, 4(4), 76.
- Bouzas-Cid, Y., Falqué, E., Orriols, I., y Mirás-Avalos, J. M. (2018b). Effects of irrigation over three years on the amino acid composition of Treixadura (*Vitis vinifera* L.) musts and wines, and on the aromatic composition and sensory profiles of its wines. Food Chemistry, 240, 707-716.
- Butzke, C. E. (1998). Survey of yeast assimilable nitrogen status in musts from California, Oregon, and Washington. American Journal of Enology and Viticulture, 49, 220-224.

- Butzke, C. E y Park, S. K. (2011). Impact of fermentation rate changes on potential hydrogen sulfide concentrations in wine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(5), 519-524.
- Cai, J., Zhu, B.-Q., Wang, Y.-H., Lu, L., Lan, Y.-B., Reeves, M. J., y Duan, C.-Q. (2014). Influence of pre-fermentation cold maceration treatment on aroma compounds of Cabernet Sauvignon wines fermented in different industrial scale fermenters. *Food Chemistry*, 154, 217-229.
- Cano-López, M., Pardo-Mínguez, F., Schmauch, G., Saucier, C., Teissedre, P.-L., López-Roca, J. M., y Gómez-Plaza, E. (2008). Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(14), 5932-5941.
- Cano-López, M., López-Roca, J. M., Pardo-Mínguez, F., y Gómez Plaza, E. (2010). Oak barrel maturation vs. micro-oxygenation: Effect on the formation of anthocyanin-derived pigments and wine colour. *Food Chemistry*, 119(1), 191-195.
- Canoura, C., Kelly, M. T., y Ojeda, H. (2018). Effect of irrigation and timing and type of nitrogen application on the biochemical composition of *Vitis vinifera* L. cv. Chardonnay and Syrah grapeberries. *Food Chemistry*, 241, 171-181.
- Capozzi, V., Fragasso, M., Romaniello, R., Berbegal, C., Russo, P., y Spano, G. (2017). Spontaneous food fermentations and potential risks for human health. *Fermentation*, 3(4), 49.
- Carbonell-Bejerano, P., Royo, C., Torres-Pérez, R., Grimplet, J., Fernández, L., Franco-Zorrilla, J. M., Lijavetzki, D., Baroja, E., Martínez, J., García-Escudero, E., Ibáñez, J., y Martínez-Zapater, J. M. (2017). Catastrophic unbalanced genome rearrangements cause somatic loss of berry color in grapevine. *Plant Physiology*, 175, 786-801.
- Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., y Hermosín-Gutiérrez, I. (2009). Red-color related phenolic composition of Garnacha Tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7883-7891.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., y Hermosín-Gutiérrez, I. (2010). Flavonol profiles of *Vitis vinifera* white grape cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(7), 699-705.
- Chatonnet, P., Dubourdie, D., Boidron, J., y Pons, M. (1992). The origin of ethylphenols in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 60(2), 165-178.

- Chaves, M. M., Santos, T. P., Souza, C. R., Ortuño, M. F., Rodrigues, M. L., Lopes, C. M., Maroco, J. P., y Pereira, J. S. (2007). Deficit irrigation in grapevine improves water-use efficiency while controlling vigour and production quality. *Annals of Applied Biology*, 150(2), 237-252.
- Cheng, G., Zhou, S.-H., Wen, R.-D., Xie, T.-L., Huang, Y., Yang, Y., Guan, J.-X., Xie, L.-J., y Zhang, J. (2017). Anthocyanin characteristics of wines in *Vitis* germplasms cultivated in southern China. *Food Science and Technology*, 38(3), 513-521.
- Chun, S. C., Paramasivan, M., y Chandrasekaran, M. (2018). Proline accumulation influenced by osmotic stress in arbuscular mycorrhizal symbiotic plants. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2525.
- 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8510-8520.
- Cortell, J. M., Halbleib, M., Gallagher, A. V., Righetti, T. L., y Kennedy, J. A. (2005). Influence of vine vigor on grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5798-5808.
- Cosme, F., Gonçalves, B., Ines, A., Jordão, A. M., y Vilela, A. (2016). Grape and wine metabolites: Biotechnological approaches to improve wine quality. In *grape and wine biotechnology*, edition 1.; Morata, A.; Loira, I., Eds.; IntechOpen Limited, London, United Kingdom, 187-224.
- Cosme, F., Pinto, T., y Vilela, A. (2018). Phenolic compounds and antioxidant activity in grape juices: A chemical and sensory view. *Beverages*, 4(1), 22.
- Coulon, J., Husnik, J. I., Inglis, D. L., van der Merwe, G. K., Lonvaud, A., Erasmus, D. J., y van Vuuren, J. J. (2006). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 113-124.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *Journal of Applied Phycology*, 23(3), 371-393.
- Cramer, A. C., Vlassides, S., y Block D. E. (2002). Kinetic model for nitrogen-limited wine fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(1), 49-60.

- Crépin, L., Truong, N. M., Bloem, A., Sanchez, I., Dequin, S., y Camarasa, C. (2017). Management of multiple nitrogen sources during wine fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(5), e02617-16.
- Crupi, P., Coletta, A., y Antonacci, D. (2010). Analysis of carotenoids in grapes to predict norisoprenoid varietal aroma of wines from Apulia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(17), 9647-9656.
- D'Onofrio, C., Matarese, F., y Cuzzola, A. (2018). Effect of methyl jasmonate on the aroma of Sangiovese grapes and wines. *Food Chemistry*, 242, 352-361.
- de la Fuente-Blanco, A., Sáenz-Navajas, M.-P., y Ferreira, V. (2016). On the effects of higher alcohols on red wine aroma. *Food Chemistry*, 210, 107-114.
- de la Fuente-Blanco, A., Sáenz-Navajas, M.-P., y Ferreira, V. (2017). Levels of higher alcohols inducing aroma changes and modulating experts' preferences in wine model solutions. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 23(2), 162-169.
- de Freitas, V. A. P., Fernandes, A., Oliveira, J., Teixeira, N., y Mateus, N. (2017). A review of the current knowledge of red wine colour. *OENO One*, 51(1), 1001-1021.
- de Torres, C., Schumacher, R., Alañón, M. E., Pérez-Coello, M. S., y Díaz-Maroto, M. C. (2015). Freeze-dried grape skins by-products to enhance the quality of white wines from neutral grape varieties. *Food Research International*, 69, 97-105.
- Del Álamo, M., Nevares, I., Gallego, L., Martín, C., y Merino, S. (2008). Aging markers from bottled red wine aged with chips, staves and barrels. *Analytica Chimica Acta*, 621(1), 86-99.
- Delaunoy, B., Farace, G., Jeandet, P., Clément, C., Baillieul, F., Dorey, S., y Cordelier, S. (2013). Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(7), 4837-4846.
- Delcambre, A., y Saucier, C. (2012). Identification of new flavan-3-ol monoglycosides by UHPLC-ESI-Q-TOF in grapes and wine. *Journal of Mass Spectrometry*, 47(6), 727-736.
- Deluc, L. G., Decendit, A., Papastamoulis, Y., Mérillon, J.-M., Cushman, J. C., y Cramer, G. R. (2011). Water deficit increases stilbene metabolism in Cabernet Sauvignon berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(1), 289-297.

- Deng, Q., Xia, H., Lin, L., Wang, J., Yuan, L., Li, K., Zhang, J., Lv, X., y Liang, D. (2019). SUNRED, a natural extract-based biostimulant, application stimulates anthocyanin production in the skins of grapes. *Scientific Reports*, 9(1), 2590.
- Dennis, E. G., Keyzers, R. A., Kalua, C. M., Maffei, S. M., Nicholson, E. L., y Boss, P. K. (2012). Grape contribution to wine aroma: Production of hexyl acetate, octyl acetate, and benzyl acetate during yeast fermentation is dependent upon precursors in the must. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2638-2646.
- Di Stasio, E., Van Oosten, M. J., Silletti, S., Raimondi, G., dell'Aversana, E., Carillo, P., y Maggio, A. (2018). *Ascophyllum nodosum*-based algal extracts act as enhancers of growth, fruit quality, and adaptation to stress in salinized tomato plants. *Journal of Applied Phycology*, 30(4), 2675-2686.
- Dimitrovska, M., Bocevska, M., Dimitrovski, D., y Murkovic, M. (2011). Anthocyanin composition of Vranec, Cabernet Sauvignon, Merlot and Pinot Noir grapes as indicator of their varietal differentiation. *European Food Research and Technology*, 232(4), 591-600.
- Dixon, R. A., Xie, D.-Y., y Sharma, S. B. (2004). Proanthocyanidins - a final frontier in flavonoid research? *New Phytologist*, 165(1), 9-28.
- DOCa Rioja, (2019a). Denominación de Origen Calificada. Consultado el 01 de octubre de 2019 (<https://www.riojawine.com/es-es/>).
- DOCa Rioja, (2019b). Estadísticas presentadas por el Consejo Regulador DOCa Rioja. Consultado el 01 de octubre de 2019 (<https://www.riojawine.com/es-es/consejo-regulador-doca-rioja/estadisticas/>).
- Doneva-Šapčeska, D., Dimitrovski, A., Bojadžiev, T., Milanov, G., y Vojnovski, B. (2006). Free and potentially volatile monoterpenes in grape varieties from the Republic of Macedonia. *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 25(1), 51-56.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., y Robinson, S. P. (2003a). Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(2), 110-121.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., y Robinson, S. P. (2003b). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 9(1), 15-27.

- Downey, M. O., Dokoozlian, N. K., y Krstic, M. P. (2006). Cultural practice and environmental impacts on the flavonoid composition of grapes and wine: A review of recent research. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 257-268.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., y Robinson, S. P. (2008). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 55-73.
- du Toit, W. J., Marais, J., Pretorius, I. S., y du Toit, M. (2006). Oxygen in must and wine: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 27(1), 76-94.
- Duteau, J., Guilloux-Benatier, M., y Seguin, G. (1981). Influence des facteurs naturels sur la maturation du raisin, en 1979, à Pomerol et Saint-Emilion. *OENO One*, 15(1), 1-27.
- Emanuelli, F., Battilana, J., Costantini, L., Le Cunff, L., Boursiquot, J.-M., This, P., y Grando, M. S. (2010). A candidate gene association study on muscat flavor in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*, 10(1), 241.
- Es-Safi, N.-E., Ghidouche, S., y Ducrot, P. (2007). Flavonoids: Hemisynthesis, reactivity, characterization and free radical scavenging activity. *Molecules*, 12(9), 2228-2258.
- 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(4), 409-420.
- Falcone Ferreyra, M. L., Rius, S. P., y Casati, P. (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. *Frontiers in Plant Science*, 3, 222.
- Fan, D., Hodges, D. M., Critchley, A. T., y Prithiviraj, B. (2013). A commercial extract of brown macroalga (*Ascophyllum nodosum*) affects yield and the nutritional quality of Spinach in vitro. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 44(12), 1873-1884.
- Fang, Y., y Qian, M. C. (2006). Quantification of selected aroma-active compounds in Pinot Noir wines from different grape maturities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8567-8573.
- Fang, Y., y Qian, M. C. (2012). Development of C6 and other volatile compounds in Pinot Noir grapes determined by Stir Bar Sorptive Extraction-GC-MS. In *flavor chemistry of wine and other alcoholic beverages*, edition 1.; Qian, M. C.; Shellhammer, T. H., Eds.; American Chemical Society, Washington, USA, 81-99.

- Fanzone, M., Peña-Neira, A., Jofré, V., Assof, M., y Zamora, F. (2010). Phenolic characterization of Malbec wines from Mendoza Province (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(4), 2388-2397.
- Feng, H., Yuan, F., Skinkis, P. A., y Qian, M. C. (2015). Influence of cluster zone leaf removal on Pinot noir grape chemical and volatile composition. *Food Chemistry*, 173, 414-423.
- FAO. (2017). Water pollution from agriculture: a global review. Executive summary. Consultado el 05 de septiembre de 2019 (<http://www.fao.org/3/a-i7754e.pdf>).
- Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., Escudero, A., y Cacho, J. (1998). Role of hydroxycinnamic acids and flavanols in the oxidation and browning of white wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(12), 4937-4944.
- Ferrer, M., Echeverría, G., y Carbonneau, A. (2014). Effect of berry weight and its components on the contents of sugars and anthocyanins of three varieties of *Vitis vinifera* L. under different water supply conditions. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35(1), 103-113.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2014). Sensory evaluation of bitterness and astringency sub-qualities of wine phenolic compounds: synergistic effect and modulation by aromas. *Food Research International*, 62, 1100-1107.
- Flamini, R., Mattivi, F., Rosso, M., Arapitsas, P., y Bavaresco, L. (2013). Advanced knowledge of three important classes of grape phenolics: Anthocyanins, stilbenes and flavonols. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19651-19669.
- Fleurence, J. (1999). Seaweed proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 10(1), 25-28.
- Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.-L., y Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, 19(3), 286-291.
- Ford, C. M., Boss, P. K., y Høj, P. B. (1998). Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose: flavonoid 3-O-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the Maize bronze-1locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins in vivo. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15), 9224-9233.
- Fraga, C. G., Croft, K. D., Kennedy, D. O., y Tomás-Barberán, F. A. (2019). The effects of polyphenols and other bioactives on human health. *Food and Function*, 10, 514-528.
- Frankel, L. E., Waterhouse, A. L., y Kinsella, J. E. (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *The Lancet*, 341(8852), 1103-1104.

- Frioni, T., Sabbatini, P., Tombesi, S., Norrie, J., Poni, S., Gatti, M., y Palliotti, A. (2018). Effects of a biostimulant derived from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* on ripening dynamics and fruit quality of grapevines. *Scientia Horticulturae*, 232, 97-106.
- Frioni, T., Tombesi, S., Quaglia, M., Calderini, O., Moretti, C., Poni, S., Gatti, M., Moncalvo, A., Sabbatini, P., García Berrios, J., y Palliotti, A. (2019). Metabolic and transcriptional changes associated with the use of *Ascophyllum nodosum* extracts as tools to improve the quality of wine grapes (*Vitis vinifera* cv Sangiovese) and their tolerance to biotic stress. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(14), 6350-6363.
- Galet, P. (2000). *Précis de viticulture*. 7 ed. Editorial Pierre Galet. pp. 602.
- Ganss, S., Kirsch, F., Winterhalter, P., Fischer, U., y Schmarr, H.-G. (2011). Aroma changes due to second fermentation and glycosylated precursors in Chardonnay and Riesling sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 2524-2533.
- Gao, L., Girard, B., Mazza, G., y Reynolds, A. G. (1997). Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot Noir wines during different vinification processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2003-2008.
- García, E., Chacón, J. L., Martínez, J., y Izquierdo, P. M. (2003). Changes in volatile compounds during ripening in grapes of Airén, Macabeo and Chardonnay white varieties grown in La Mancha Region (Spain). *Food Science and Technology International*, 9(1), 33-41.
- García-Escudero, E., Martínez, J., y López, D. (2011). Control del rendimiento en Tempranillo blanco mediante deshojado y aclareo de racimos. *Vida Rural*, 325, 34-40.
- Garde-Cerdán, T., y Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Trends in Food Science and Technology*, 17(8), 438-447.
- Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Lara, J. F., Pardo, F., Ancín-Azpilicueta, C., y Salinas, M. R. (2009). Study of the evolution of nitrogen compounds during grape ripening. Application to differentiate grape varieties and cultivated systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(6), 2410-2419.
- Garde-Cerdán, T., López, R., Portu, J., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., y Santamaría, P. (2014). Study of the effects of proline, phenylalanine, and urea foliar application to Tempranillo vineyards on grape amino acid content. Comparison with commercial nitrogen fertilisers. *Food Chemistry*, 163, 136-141.
- Garde-Cerdán, T., Santamaría, P., Rubio-Bretón, P., González-Arenzana, L., López-Alfaro, I., y López, R. (2015). Foliar application of proline, phenylalanine, and urea to Tempranillo vines: Effect on grape volatile composition

- and comparison with the use of commercial nitrogen fertilizers. *LWT - Food Science and Technology*, 60(2), 684-689.
- Garde-Cerdán, T., Mancini, V., Carrasco-Quiroz, M., Servili, A., Gutiérrez-Gamboa, G., Foglia, R., Pérez-Álvarez, E. P., y Romanazzi, G. (2017a). Chitosan and laminarin as alternatives to copper for *Plasmopara viticola* control: Effect on grape amino acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(34), 7379-7386.
- Garde-Cerdán, T., Gutiérrez-Gamboa, G., Portu, J., Fernández-Fernández, J. I., y Gil-Muñoz, R. (2017b). Impact of phenylalanine and urea applications to Tempranillo and Monastrell vineyards on grape amino acid content during two consecutive vintages. *Food Research International*, 102, 451-457.
- Garde-Cerdán, T., Gutiérrez-Gamboa, G., Fernández-Navales, J., Pérez-Álvarez, E. P., y Diago, M. P. (2018a). Towards the definition of optimal grape harvest time in Grenache grapevines: Nitrogenous maturity. *Scientia Horticulturae*, 239, 9-16.
- Garde-Cerdán, T., Gutiérrez-Gamboa, G., López, R., Rubio-Bretón, P., y Pérez-Álvarez, E. P. (2018b). Influence of foliar application of phenylalanine and urea at two doses to vineyards on grape volatile composition and amino acids content. *Vitis*, 57(4), 137-141.
- Garde-Cerdán, T., Gutiérrez-Gamboa, G., Baroja, E., Rubio-Bretón, P., y Pérez-Álvarez, E. P. (2018c). Influence of methyl jasmonate foliar application to vineyard on grape volatile composition over three consecutive vintages. *Food Research International*, 112, 274-283.
- Genovese, A., Gambuti, A., Piombino, P., y Moio, L. (2007). Sensory properties and aroma compounds of sweet Fiano wine. *Food Chemistry*, 103(4), 1228-1236.
- Gershenson, J., y Dudareva, N. (2007). The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3(7), 408-414.
- Ghadiriasli, R., Lorber, K., Wagenstaller, M., y Buettner, A. (2019). Smoky, Vanilla, or Clove-Like? Sex, Smoke, and Spirits: The Role of Chemistry, 43-54.
- Ghimire, R., Norton, J. B., Stahl, P. D., y Norton, U. (2014). Soil microbial substrate properties and microbial community responses under irrigated organic and reduced-tillage crop and forage production systems. *PLoS ONE*, 9(8), e103901.
- Gil, G. (2012). *Fruticultura: Madurez de la fruta y manejo de poscosecha. Frutas de clima templado y subtropical*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile.

- Gil, M., Kontoudakis, N., González, E., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., y Zamora, F. (2012). Influence of grape maturity and maceration length on color, polyphenolic composition, and polysaccharide content of Cabernet Sauvignon and Tempranillo wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(32), 7988-8001.
- Gil-Muñoz, R., Fernández-Fernández, J. I., Crespo-Villegas, O., y Garde-Cerdán, T. (2017a). Elicitors used as a tool to increase stilbenes in grapes and wines. *Food Research International*, 98, 34-39.
- Gil-Muñoz, R., Bautista-Ortín, A. B., Ruiz-García, Y., Fernández-Fernández, J. I., y Gómez-Plaza, E. (2017b). Improving phenolic and chromatic characteristics of Monastrell, Merlot and Syrah wines by using methyl jasmonate and benzothiadiazole. *OENO One*, 51(1), 17-27.
- Giovinazzo, G., Carluccio, M. A., y Grieco, F. (2019). Wine polyphenols and health. Reference series in phytochemistry. In *bioactive molecules in food*, edition 1.; Mérillon, J. M.; Ramawat, K. G., Eds.; Springer Nature Switzerland, 1135-1155.
- Girard, B., Fukumoto, L., Mazza, G., Delaquis, P., y Ewert, B. (2002). Volatile terpene constituents in maturing Gewürztraminer grapes from British Columbia. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 99-109.
- Giribaldi, M., Perugini, I., Sauvage, F.-X., y Schubert, A. (2007). Analysis of protein changes during grape berry ripening by 2-DE and MALDI-TOF. *Proteomics*, 7(17), 3154-3170.
- Gombau, J., Vignault, A., Pascual, O., Gómez-Alonso, S., Gracia-Romero, E., Hermosín, I., Canals, J. M., Teissedre, P.-L., y Zamora, F. (2019). Influence of oenological tannins on malvidin-3-*O*-monoglucoside copigmentation in a model wine solution. *OENO One*, 53(3), 531-547.
- Gomes, F. P., Oliva, M. A., Mielke, M. S., Almeida, A.-A. F., y Aquino, L. A. (2010). Osmotic adjustment, proline accumulation and cell membrane stability in leaves of *Cocos nucifera* submitted to drought stress. *Scientia Horticulturae*, 126(3), 379-384.
- Gómez-Alonso, S., Hermosín-Gutiérrez, I., y García-Romero, E. (2007). Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 608-613.
- Gómez-Plaza, E., Gil-Muñoz, R., López-Roca, J. M., De La Hera-Orts, M. L., y Martínez-Cuñillas, A. (2000). Effect of the addition of bentonite and polyvinylpyrrolidone on the colour and long-term stability of red wines. *Journal of Wine Research*, 11(3), 223-231.

- Gómez-Plaza, E., Mestre-Ortuño, L., Ruiz-García, Y., Fernández-Fernández, J. I., y López-Roca, J. M. (2012). Effect of benzothiadiazole and methyl jasmonate on the volatile compound composition of *Vitis vinifera* L. Monastrell grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 63, 394-401.
- González Álvarez, M., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., y Simal-Gándara, J. (2011). Relationships between Godello white wine sensory properties and its aromatic fingerprinting obtained by GC-MS. *Food Chemistry*, 129, 890-898.
- González-Barreiro, C., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., y Simal-Gándara, J. (2015). Wine aroma compounds in grapes: A critical review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(2), 202-218.
- González-Lázaro, M., Martínez-Lapuente, L., Palacios, A., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Bueno-Herrera, M., de La Cuesta, P. L., y Perez-Magarino, S. (2019) Effect of different oenological techniques to obtain adequate base wines for red sparkling wine production: Phenolic composition sensory analysis and foam parameters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(10), 4580-4592.
- González-Marco, A., Jiménez-Moreno, N., y Ancín-Azpilicueta, C. (2010). Influence of nutrients addition to nonlimited-in-nitrogen must on wine volatile composition. *Journal of Food Science*, 75(4), 206-211.
- Gutiérrez-Gamboa, G., y Moreno-Simunovic, Y. (2019). Terroir and typicity of Carignan from Maule Valley (Chile): the resurgence of a minority variety. *OENO One*, 53(1), 75-93.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Portu, J., Moreno-Simunovic, Y., y Martínez-Gil, A. M. (2017a). Foliar nitrogen application in Cabernet Sauvignon vines: Effects on wine flavonoid and amino acid content. *Food Research International*, 96, 46-53.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Portu, J., Santamaría, P., López, R., y Garde-Cerdán, T. (2017b). Effects on grape amino acid concentration through foliar application of three different elicitors. *Food Research International*, 99, 688-692.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Gonzalo-Diago, A., Moreno-Simunovic, Y., y Martínez-Gil, A. M. (2017c). Effect of different foliar nitrogen applications on the must amino acids and glutathione composition in Cabernet Sauvignon vineyard. *LWT Food-Science and Technology*, 75, 147-154.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Verdugo-Vásquez, N., Carrasco-Quiroz, M., Garde-Cerdán, T., Martínez- Gil, A. M., y Moreno-Simunovic, Y. (2018a). Carignan phenolic composition in wines from ten sites of the Maule Valley (Chile): Location and rootstock implications. *Scientia Horticulturae*, 234, 63-73.

- Gutiérrez-Gamboa, G., Carrasco-Quiroz, M., Martínez-Gil, A. M., Pérez-Álvarez, E. P., Garde-Cerdán, T., y Moreno-Simunovic, Y. (2018b). Grape and wine amino acid composition from Carignan noir grapevines growing under rainfed conditions in the Maule Valley, Chile: Effects of location and rootstock. *Food Research International*, 105, 344-352.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Marín-San Román, S., Jofré, V., Rubio-Bretón, P., Pérez-Álvarez, E. P., y Garde-Cerdán, T. (2018c). Effects on chlorophyll and carotenoid contents in different grape varieties (*Vitis vinifera* L.) after nitrogen and elicitor foliar applications to the vineyard. *Food Chemistry*, 269, 380-386.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Portu, J., López, R., Santamaría, P., y Garde-Cerdán, T. (2018d). Elicitor and nitrogen applications to Garnacha, Graciano and Tempranillo vines: effect on grape amino acid composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(6), 2341-2349.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Souza-Da Costa, B., y Moreno-Simunovic, Y. (2018e). Strategies for the improvement of fruit set in *Vitis vinifera* L. cv. "Carménère" through different foliar biostimulants in two different locations. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 33(2), 177-183.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Carrasco-Quiroz, M., Martínez-Gil, A. M., y Moreno-Simunovic, Y. (2018f). Improvement of wine volatile composition through foliar nitrogen applications to "Cabernet Sauvignon" grapevines in a warm climate. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 78(2), 216-227.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Moreno-Simunovic, Y., y Pérez-Álvarez, E. P. (2019a). Amino acid composition of grape juice and wine: Principal factors that determine its content and contribution to the human diet. In *nutrients in beverages*, volume 12.; Grumezescu, A.; Holban, A. M., Eds.; Springer Nature Switzerland, 369-391.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Romanazzi, G., Garde-Cerdán, T., y Pérez-Álvarez, E. P. (2019b). A review of the use of biostimulants in the vineyard for improved grape and wine quality: Effects on prevention of grapevine diseases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(3), 1001-1009.
- Gutiérrez-Gamboa, G., Pérez-Álvarez, E. P., Rubio-Bretón, P., y Garde-Cerdán, T. (2019c). Changes on grape volatile composition through elicitation with methyl jasmonate, chitosan, and a yeast extract in Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grapevines. *Scientia Horticulturae*, 244, 257-262.

- Haider, M. S., Zhang, C., Kurjogi, M. M., Pervaiz, T., Zheng, T., Zhang, C., Lide, C., Shangguan, L., y Fang, J. (2017). Insights into grapevine defense response against drought as revealed by biochemical, physiological and RNA-Seq analysis. *Scientific Reports*, 7(1), 13134.
- Hannam, K. D., Neilsen, G. H., Neilsen, D., Midwood, A.J., Millard, P., Zhang, Z., y Steinke, D. (2016). Amino acids composition of grape (*Vitis vinifera* L.) juice in response to applications of urea to the soil or foliage. *American Journal of Enology and Viticulture*, 67, 47-55.
- Harbertson, J. F., y Spayd, S. (2006). Measuring phenolics in the winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 280-288.
- Hasan, M., y Bae, H. (2017). An overview of stress-induced resveratrol synthesis in grapes: Perspectives for resveratrol-enriched grape products. *Molecules*, 22(2), 294.
- Hazelwood, L. A., Daran, J.-M., van Maris, A. J. A., Pronk, J. T., y Dickinson, J. R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(8), 2259-2266.
- He, F., He, J.-J., Pan, Q.-H., y Duan, C.-Q. (2010a). Mass-spectrometry evidence confirming the presence of pelargonidin-3-*O*-glucoside in the berry skins of Cabernet Sauvignon and Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(3), 464-468.
- He, F., Mu, L., Yan, G.-L., Liang, N.-N., Pan, Q.-H., Wang, J., Reeves, M. J., y Duan, C.-Q. (2010b). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*, 15(12), 9057-9091.
- Herderich, M. J., y Smith, P. A. (2005). Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 205-214.
- Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Copigmentación y piranoantocianos: el papel de los flavonoles y los ácidos hidroxicinámicos en el color del vino tinto. *Acenología*.
- Hernández-Orte, P., Lapeña, A. C., Peña-Gallego, A., Astrain, J., Baron, C., Pardo, I., Polo, L., Ferrer, S., Cacho, J., y Ferreira, V. (2008). Biogenic amine determination in wine fermented in oak barrels: Factors affecting formation. *Food Research International*, 41(7), 697-706.
- Hidalgo, L. (2002). *Tratado de viticultura general*. 3 ed. Editorial Mundi-Prensa. pp. 1,235.
- Hjelmeland, A. K., y Ebeler, S. E. (2015). Glycosidically bound volatile aroma compounds in grapes and wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 66(1), 1-11.

- Horbowicz, M., Kosson, R., Wiczowski, W., Koczkodaj, D., y Mitrus, J. (2011). The effect of methyl jasmonate on accumulation of 2-phenylethylamine and putrescine in seedlings of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*). *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3), 897-903.
- Huang, Z., y Ough, C. S. (1989). Effect of vineyard locations, varieties, and rootstocks on the juice amino acid composition of several cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 135-139.
- Huang, Z., y Ough, C. S. (1991). Amino acid profiles of commercial grape juices and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 261-267.
- Hufnagel, J. C., y Hofmann, T. (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1376-1386.
- Hung, L. Chen, J. K., Huang, S. S., Lee, R. S., y Su, M. J. (2000). Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovascular Research*, 47(3), 549-555.
- Ilc, T., Werck-Reichhart, D., y Navrot, N. (2016). Meta-analysis of the core aroma components of grape and wine aroma. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1472.
- Intrigliolo, D. S., y Castel, J. R. (2010). Interactive effects of deficit irrigation and shoot and cluster thinning on grapevine cv. Tempranillo. Water relations, vine performance and berry and wine composition. *Irrigation Science*, 29(6), 443-454.
- Isemura, M. (2019). Catechin in human health and disease. *Molecules*, 24(3), 528.
- Izquierdo-Cañas, P. M., García-Romero, E., Mena-Morales, A., y Gómez-Alonso, S. (2016). Effects of malolactic fermentation on colour stability and phenolic composition of Petit Verdot red wines. *Wine Studies*, 5(1).
- James, D. G., y Price, T. S. (2004). Field-testing of methyl salicylate for recruitment and retention of beneficial insects in grapes and hops. *Journal of Chemical Ecology*, 30, 1613-1628.
- Jannin, L., Arkoun, M., Etienne, P., Laîné, P., Goux, D., Garnica, M., Fuentes, M., San Francisco, S., Baigorri, R., Cruz, F., Houdusse, F., Garcia-Mina, J.-M., Yvin, J.-C. y Ourry, A. (2013). *Brassica napus* growth is promoted by *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. Seaweed Extract: Microarray analysis and physiological characterization of N, C, and S metabolisms. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32(1), 31-52.
- Jayaraj, J., Wan, A., Rahman, M., y Punja, Z. K. (2008). Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. *Crop Protection*, 27(10), 1360-1366.

- Jeandet, P., Sbaghi, M., Bessis, R., y Meunier, P. (1995). The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins. *Vitis*, 34(2), 91-94.
- Jiranek, V., Langridge, P., y Henschke, P. A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 75-83.
- Jones, G. V., y Davis, R. E. (2000). Climate influences on grapevine phenology, grape composition, and wine production and quality for Bordeaux, France. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 249-261.
- Kalua, C. M., y Boss, P. K. (2009). Evolution of volatile compounds during the development of Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3818-3830.
- Keller, M. (2015). *The science of grapevines: Anatomy and physiology*. 2nd edition. Elsevier Inc, Oxford, United Kingdom.
- Kelly, M., Gill Giese, W., Velasco-Cruz, C., Lawson, L., Ma, S., Wright, M., y Zoecklein, B. (2017). Effect of foliar nitrogen and sulfur on petit manseng (*Vitis vinifera* L.) grape composition. *Journal of Wine Research*, 28(3), 165-180.
- Kennedy, J. A., Hayasaka, Y., Vidal, S., Waters, E. J., y Jones, G. P. (2001). Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5348-5355.
- Kennedy, J. A., Saucier, C., y Glories, Y. (2006). Grape and wine phenolics: History and perspective. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(3), 239-248.
- Keyrouz, R., Abasq, M. L., Bourvellec, C. L., Blanc, N., Audibert, L., ArGall, E., y Hauchard, D. (2011). Total phenolic contents, radical scavenging and cyclic voltammetry of seaweeds from Brittany. *Food Chemistry*, 126(3), 831-836.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J., y Prithiviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28(4), 386-399.
- Khan, A. S., Ahmad, B., Jaskani, M. J., Ahmad, R., y Malik, A. U. (2012). Foliar application of mixture of amino acids and seaweed (*Ascophyllum nodosum*) extract improve growth and physico-chemical properties of grapes. *International Journal of Agriculture and Biology*, 14, 383-388.

- Kizildeniz, T., Irigoyen, J. J., Pascual, I., y Morales, F. (2018). Simulating the impact of climate change (elevated CO₂ and temperature, and water deficit) on the growth of red and white Tempranillo grapevine in three consecutive growing seasons (2013–2015). *Agricultural Water Management*, 202, 220-230.
- Kliewer, W. M. (1970). Free amino acids and other nitrogenous fractions in wine grapes. *Journal of Food Science*, 35, 17-21.
- Koundouras, S., Marinos, V., Gkoulioti, A., Kotseridis, Y., y van Leeuwen, C. (2006). Influence of vineyard location and vine water status on fruit maturation of nonirrigated cv. Agiorgitiko (*Vitis vinifera* L.). Effects on wine phenolic and aroma components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 5077-5086.
- Koundouras, S., Hatzidimitriou, E., Karamolegkou, M., Dimopoulou, E., Kallithraka, S., Tsialtas, J. T., Zioziou, E., Nikolau, N., y Kotseridis, Y. (2009). Irrigation and rootstock effects on the phenolic concentration and aroma potential of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(17), 7805-7813.
- Koyama, K., Ikeda, H., Poudel, P. R., y Goto-Yamamoto, N. (2012). Light quality affects flavonoid biosynthesis in young berries of Cabernet Sauvignon grape. *Phytochemistry*, 78, 54-64.
- Kritzinger, E. C., Bauer, F. F., y du Toit, W. J. (2013). Role of glutathione in winemaking: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(2), 269-277.
- Lacroux, F., Trégoat, O., van Leeuwen, C., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne-Cruège, V., y Dubourdieu, D. (2008). Effect of foliar nitrogen and sulphur application on aromatic expression of *Vitis vinifera* L. cv. Sauvignon blanc. *OENO One*, 42(3), 125-132.
- Lambrechts, M. G., y Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma - A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21(1), 97-129.
- Laqui-Estaña, J., López-Solís, R., Peña-Neira, Á., Medel-Marabolí, M., y Obreque-Slier, E. (2019). Wines in contact with oak wood: the impact of the variety (Carménère and Cabernet Sauvignon), format (barrels, chips and staves), and aging time on the phenolic composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 436-448.
- Lasa, B., Menendez, S., Sagastizabal, K., Cervantes, M. E. C., Irigoyen, I., Muro, J., Aparicio-Tejo, P. M., y Ariz, I. (2012). Foliar application of urea to “Sauvignon Blanc” and “Merlot” vines: doses and time of application. *Plant Growth Regulation*, 67(1), 73-81.

- Lee, J., y Steenwerth, K. L. (2013). "Cabernet Sauvignon" grape anthocyanin increased by soil conservation practices. *Scientia Horticulturae*, 159, 128-133.
- Lee, S.-H., Seo, M.-J., Riu, M., Cotta, J. P., Block, D. E., Dokoozlian, N. K., y Ebeler, S. E. (2007). Vine microclimate and norisoprenoid concentration in Cabernet Sauvignon grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 291-301.
- Lichtenthaler, H. K., Rohmer, M., y Schwender, J. (1997). Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, 101(3), 643-652.
- Liu, S., Liu, E., Zhu, B., Chai, B., Liu, R., Gao, Q., y Zhang, B. (2018). Impact of maceration time on colour-related phenolics, sensory characteristics and volatile composition of mulberry wine. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(1), 45-56.
- Liu, P.-T., Duan, C.-Q., y Yan, G.-L. (2019). Comparing the effects of different unsaturated fatty acids on fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma compounds during red wine fermentation. *Molecules*, 24(3), 538.
- Lleixà, J., Martín, V., Giorello, F., Portillo, M. C., Carrau, F., Beltran, G., y Mas, A. (2019). Analysis of the NCR mechanisms in *Hanseniaspora vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking. *Frontiers in Genetics*, 9, 747.
- Lonvaud-Funel, A. (2001). Biogenic amines in wines: role of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, 199(1), 9-13.
- Lopez Pinar, A., Rauhut, D., Ruehl, E., y Buettner, A. (2017). Effects of bunch rot (*Botrytis cinerea*) and powdery mildew (*Erysiphe necator*) fungal diseases on wine aroma. *Frontiers in Chemistry*, 5, 20.
- Lopez-Gallego, F., Agger, S. A., Abate-Pella, D., Distefano, M. D., y Schmidt-Dannert, C. (2010). Sesquiterpene synthases Cop4 and Cop6 from *Coprinus cinereus*: Catalytic promiscuity and cyclization of farnesyl pyrophosphate geometric isomers. *ChemBioChem*, 11(8), 1093-1106.
- López-Tamames, E., Carro-Mariño, N., Gunata, Y. Z., Sapis, C., Baumes, R., y Bayonove, C. (1997). Potential aroma in several varieties of Spanish grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1729-1735.
- Lorenzo, C., Bordiga, M., Pérez-Álvarez, E. P., Travaglia, F., Arlorio, M., Salinas, M. R., Coïson, J. D., y Gardel-Cerdán, T. (2017). The impacts of temperature, alcoholic degree and amino acids content on biogenic amines and their precursor amino acids content in red wine. *Food Research International*, 99, 328-335.

- Ma, T.-T., Sun, X.-Y., Gao, G.-T., Wang, X.-Y., Liu, X.-Y., Du, G.-R., y Zhan, J.-C. (2014). Phenolic characterisation and antioxidant capacity of young wines made from different grape varieties grown in Helanshan Donglu wine zone (China). *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35(2), 321-331.
- MacKinnon, S. L., Hiltz, D., Ugarte, R., y Craft, C. A. (2010). Improved methods of analysis for betaines in *Ascophyllum nodosum* and its commercial seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology*, 22(4), 489-494.
- Magasanik, B., y Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 290, 1-18.
- Mandl, K., Silhavy-Richter, K., Korntheuer, K., Prinz, M., Patzl-Fischerleitner, E., y Eder, R. (2017). Influence of different yeasts on the amino acid pattern of rosé wine. *BIO Web of Conferences*, 9, 02014.
- Marais, J. (1983). Terpenes in the aroma of grapes and wines: A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 4(2), 49-58.
- Marais, J., van Wyk, C. J., y Rapp, A. (1992). Effect of sunlight and shade on norisoprenoid levels in maturing Weisser Riesling and Chenin blanc grapes and Weisser Riesling wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 13(1), 23-31.
- Martin, D. M., Gershenzon, J., y Bohlmann, J. (2003). Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of Norway Spruce. *Plant Physiology*, 132(3), 1586-1599.
- Martínez, J., y García-Escudero, E. (2017). Tempranillo blanco: una variedad fruto de la variación genética de la vid (*Vitis vinifera* L.). *Acenología*. Consultado el 31 de agosto de 2019 (<http://www.acenologia.com/>).
- Martínez, J., Gonzalo, A., Terroba, E., Baroja, E., y García-Escudero, E. (2016). Deshojado precoz en Viura y Malvasía riojana. *Cuaderno de Campo*, 58, 30-33.
- Martínez-Gil, A. M., Garde-Cerdán, T., Lorenzo, C., Félix Lara, J., Pardo, F., y Rosario Salinas, M. (2012). Volatile compounds formation in alcoholic fermentation from grapes collected at 2 maturation stages: Influence of nitrogen compounds and grape variety. *Journal of Food Science*, 77(1), 71-79.
- Martínez-Gil, A. M., Cadahía, E., Fernández de Simón, B., Gutiérrez-Gamboa, G., Nevares, I., y del Álamo-Sanza, M. (2017). *Quercus humboldtii* (Colombian oak): Characterisation of wood phenolic composition with respect to traditional oak wood used in oenology. 32(2), 93-101.
- Martínez-Gil, A. M., Gutiérrez-Gamboa, G., Garde-Cerdán, T., Pérez-Álvarez, E. P., y Moreno-Simunovic, Y. (2018). Characterization of phenolic composition in Carignan noir grapes (*Vitis vinifera* L.) from six wine-growing sites in Maule Valley, Chile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(1), 274-282.

- Martínez-Gil, A., Cadahía, E., Fernández de Simón, B., Gutiérrez-Gamboa, G., Nevares, I., y del Álamo-Sanza, M. (2019). Phenolic and volatile compounds in *Quercus humboldtii* Bonpl. wood: effect of toasting with respect to oaks traditionally used in cooperage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1), 315-324.
- Mathieu, S., Terrier, N., Procureur, J., Bigey, F., y Günata, Z. (2005). A carotenoid cleavage dioxygenase from *Vitis vinifera* L.: functional characterization and expression during grape berry development in relation to C₁₃-norisoprenoid accumulation. *Journal of Experimental Botany*, 56(420), 2721-2731.
- Matthews, M., y Anderson, M. (1988). Fruit ripening in *Vitis vinifera* L.: responses to seasonal water deficits. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 313-320.
- Matthews, M., y Anderson, M. (1989). Reproductive development in grape (*Vitis vinifera* L.): responses to seasonal water deficit. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 52-60.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., y Velasco, R. (2006). Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7692-7702.
- Matus, J. T., Loyola, R., Vega, A., Peña-Neira, A., Bordeu, E., Arce-Johnson, P., y Alcalde, J. A. (2009). Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera*. *Journal of Experimental Botany*, 60(3), 853-867.
- Maury C., Sarni-Manchado P., Lefebvre S., Cheynier V., y Moutounet, M. (2001). Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 140-145.
- Mendes-Pinto, M. M. (2009). Carotenoid breakdown products the-norisoprenoids-in wine aroma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 483(2), 236-245.
- Mercier, L., Laffite, C., Borderies, G., Briand, X., Esquerré-Tugayé, M. T., y Fournier, J. (2001). The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. *New Phytologist*, 149, 43-51.
- Michlmayr, H., Nauer, S., Brandes, W., Schümann, C., Kulbe, K. D., del Hierro, A. M., y Eder, R. (2012). Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry*, 135(1), 80-87.
- Monteiro, S., Piçarra-Pereira, M. A., Loureiro, V. B., Teixeira, A. R., y Ferreira, R. B. (2007). The diversity of pathogenesis-related proteins decreases during grape maturation. *Phytochemistry*, 68(4), 416-425.

- Moreno, D., Valdés, E., Uriarte, D., Gamero, E., Talaverano, I., y Vilanova, M. (2017). Early leaf removal applied in warm climatic conditions: Impact on Tempranillo wine volatiles. *Food Research International*, 98, 50-58.
- Mosedale, J. R., Puech, J. L., y Feuillat, F. (1999). The influence on wine flavor of the oak species and natural variation of heartwood components. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(4), 503-512.
- Murphey, J. M., Spayd, S. E., y Powers, J. R. (1989). Effect of grape maturation on soluble protein characteristics of Gewürztraminer and white Riesling juice and wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 40, 199-207.
- Nagahama, T., Fujimoto, K., Takami, S., Kinugawa, A., y Narusuye, K. (2009). Effective amino acid composition of seaweeds inducing food preference behaviors in *Aplysia kurodai*. *Neuroscience Research*, 64(3), 243-250.
- Nakamura, T., Nagayama, K., Uchida, K., y Tanaka, R. (1996). Antioxidant activity of phlorotannins isolated from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *Fisheries Science*, 62(6), 923-926.
- Negri, A. S., Prinsi, B., Rossoni, M., Failla, O., Scienza, A., Cocucci, M., y Espen, L. (2008). Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening. *BMC Genomics*, 9(1), 378.
- Negri, S., Lovato, A., Boscaini, F., Salvetti, E., Torriani, S., Commisso, M., Danzi, R., Ugliano, M., Polverari, A., Tornielli, G. B., y Guzzo, F. (2017). The induction of noble rot (*Botrytis cinerea*) infection during postharvest withering changes the metabolome of grapevine berries (*Vitis vinifera* L., cv. Garganega). *Frontiers in Plant Science*, 8, 1002.
- Niculcea, M., Martinez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Sánchez-Díaz, M., Ayestarán, B., y Antolín, M. C. (2015). Characterization of phenolic composition of *Vitis vinifera* L. 'Tempranillo' and 'Graciano' subjected to deficit irrigation during berry development. *Vitis*, 54, 9-16.
- Norrie, J., Branson, T., y Keathley, P. E. (2002). Marine plant extracts impact on grape yield and quality. *Acta Horticulturae*, (594), 315-319.
- Núñez, V., Monagas, M., Gomez-Cordovés, M. C., y Bartolomé, B. (2004). *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and Technology*, 31(1), 69-79.
- Nykänen, L. (1986). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 84-96.
- Oberholster, A. (2003). Effect of viticultural and wine making practices on the phenolic composition of grapes and wines, Part II. *Wynboer*, 165, 64-68
- OIV. (2003). *Compendium of international methods of wine and must analysis*. Paris: OIV.

- OIV (2009). Resolution OIV/Concours 332A/2009. OIV standard for international wine and spirituous beverages of vitivinicultural origin competitions. Annex 3.1. Score sheet.
- Ojeda, H., Andary, C., Kraeva, E., Carbonneau, A., y 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. Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 261-267.
- Oliva, J., Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A. M., Rosario Salinas, M., y Barba, A. (2011). Fungicide effects on ammonium and amino acids of Monastrell grapes. *Food Chemistry*, 129(4), 1676-1680.
- Oliveira, J. M., Faria, M., Sá, F., Barros, F., y Araújo, I. M. (2006). C6-alcohols as varietal markers for assessment of wine origin. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 300-309.
- Oliveira, C. M., Ferreira, A. C. S., De Freitas, V., y Silva, A. M. S. (2011). Oxidation mechanisms occurring in wines. *Food Research International*, 44(5), 1115-1126.
- Ough, C. S., Huang, Z., An, D., y Stevens, D. (1991). Amino acid uptake by four commercial yeasts at two different temperatures of growth and fermentation: Effects on urea excretion and readsorption. *American Journal of Enology and Viticulture*, 41, 26-40.
- Paissoni, M. A., Waffo-Teguo, P., Ma, W., Jourdes, M., Rolle, L., y Teissedre, P. -L. (2018). Chemical and sensorial investigation of in-mouth sensory properties of grape anthocyanins. *Scientific reports*, 8(1), 17098.
- Paladines-Quezada, D. F., Moreno-Olivares, J. D., Fernández-Fernández, J. I., Bautista-Ortín, A. B., y Gil-Muñoz, R. (2019). Influence of methyl jasmonate and benzothiadiazole on the composition of grape skin cell walls and wines. *Food Chemistry*, 277, 691-697.
- Pandey, K. B., y Rizvi, S. I. (2009). Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2(5), 270-278.
- Paré, P. W., y Tumlinson, J. H. (1999). Plant volatiles as a defense against insect herbivores. *Plant Physiology*, 121(2), 325-332.
- Parente, D. C., Cajueiro, D. B. B., Moreno, I. C. P., Leite, F. C. B., De Barros Pita, W., y De Moraes, M. A. (2018). On the catabolism of amino acids in the yeast *Dekkera bruxellensis* and the implications for industrial fermentation processes. *Yeast*, 35(3), 299-309.

- Pascual, G. A., Serra, I., Calderón-Orellana, A., Laurie, V. F., y López, M. D. (2017). Changes in concentration of volatile compounds in response to defoliation of Muscat of Alexandria grapevines grown under a traditional farming system. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 77(4), 373-381.
- Peddie, H. A. B. (1990). Ester formation in brewery fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 96(5), 327-331.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., y Noble, A. C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(8), 1123-1128.
- Pérez-Álvarez, E. P., Pérez-Sotés, J. L., García-Escudero, E., y Peregrina, F. (2013). Cover crop short-term effects on soil NO₃⁻-N availability, nitrogen nutritional status, yield, and must quality in a calcareous vineyard of the AOC Rioja, Spain. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 44(1-4), 711-721.
- Pérez-Álvarez, E. P. (2015). Influencia del uso de cubiertas vegetales sobre la fertilidad del suelo, la expresión vegetativa de la vid y la composición de la uva y del vino en un viñedo de Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) de la D.O.C. Rioja. Tesis doctoral. Universidad de La Rioja. pp. 382.
- Pérez-Álvarez, E. P., Garde-Cerdán, T., Santamaría, P., García-Escudero, E., y Peregrina, F. (2015). Influence of two different cover crops on soil N availability, N nutritional status, and grape yeast-assimilable N (YAN) in a cv. Tempranillo vineyard. *Plant and Soil*, 390(1-2), 143-156.
- Pérez-Álvarez, E. P., Garde-Cerdán, T., García-Escudero, E., y Martínez-Vidaurre, J. M. (2017a). Effect of two doses of urea foliar application on leaves and grape nitrogen composition during two vintages. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(8), 2524-2532.
- Pérez-Álvarez, E. P., Garde-Cerdán, T., Cabrita, M. J., García-Escudero, E., y Peregrina, F. (2017b). Influence on wine biogenic amine composition of modifications to soil N availability and grapevine N by cover crops. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(14), 4800-4806.
- Pérez-Navarro, J., García Romero, E., Gómez-Alonso, S., y Izquierdo Cañas, P. M. (2018). Comparison between the phenolic composition of Petit Verdot wines elaborated at different maceration/fermentation temperatures. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 996-1007.
- Pertot, I., Caffi, T., Rossi, V., Mugnai, L., Hoffmann, C., Grando, M. S., Gary, C., Lafond, D., Duso, C., Thiery, D., Mazzoni, V., y Anfora, G. (2017). A critical review of plant protection tools for reducing pesticide use on grapevine and new perspectives for the implementation of IPM in viticulture. *Crop Protection*, 97, 70-84.

- Petit, A.-N., Baillieul, F., Vaillant-Gaveau, N., Jacquens, L., Conreux, A., Jeandet, P., Clément, C., y Fontaine, F. (2009). Low responsiveness of grapevine flowers and berries at fruit set to UV-C irradiation. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1155-1162.
- Peyrot des Gachons, C., Leeuwen, C. V., Tominaga, T., Soyer, J.-P., Gaudillère, J.-P., y Dubourdieu, D. (2005). Influence of water and nitrogen deficit on fruit ripening and aroma potential of *Vitis vinifera* L cv Sauvignon blanc in field conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 73-85.
- Picariello, L., Gambuti, A., Picariello, B., y Moio, L. (2017). Evolution of pigments, tannins and acetaldehyde during forced oxidation of red wine: Effect of tannins addition. *LWT Food Science and Technology*, 77, 370-375.
- Pineau, B., Barbe, J.-C., Van Leeuwen, C., y Dubourdieu, D. (2007). Which impact for β -damascenone on red wines aroma? *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(10), 4103-4108.
- Plata, C., Mauricio, J. C., Millán, C., y Ortega, J. M. (2005). Influence of glucose and oxygen on the production of ethyl acetate and isoamyl acetate by a *Saccharomyces cerevisiae* strain during alcoholic fermentation. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(2), 115-121.
- Podolyan, A., White, J., Jordan, B., y Winefield, C. (2010). Identification of the lipoxygenase gene family from *Vitis vinifera* and biochemical characterisation of two 13-lipoxygenases expressed in grape berries of Sauvignon Blanc. *Functional Plant Biology*, 37, 767-784.
- Popescu, G. C., y Popescu M. (2014). Effect of the brown alga *Ascophyllum nodosum* as biofertilizer on vegetative growth in grapevine (*Vitis vinifera* L). *Current Trends in Natural Sciences*, 3, 61-67.
- Portu, J., González-Arenzana, L., Hermosín-Gutiérrez, I., Santamaría, P., y Garde-Cerdán, T. (2015a). Phenylalanine and urea foliar applications to grapevine: Effect on wine phenolic content. *Food Chemistry*, 180, 55-63.
- Portu, J., Santamaría, P., López-Alfaro, I., López, R., y Garde-Cerdán, T. (2015b). Methyl jasmonate foliar application to Tempranillo vineyard improved grape and wine phenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(8), 2328-2337.
- Portu, J., López, R., Baroja, E., Santamaría, P., y Garde-Cerdán, T. (2016). Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: Methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. *Food Chemistry*, 201, 213-221.
- Portu, J., López, R., Santamaría, P., y Garde-Cerdán, T. (2017a). Elicitation with methyl jasmonate supported by precursor feeding with phenylalanine: Effect on Garnacha grape phenolic content. *Food Chemistry*, 237, 416-422.

- Prestage, S., Linforth, R., Taylor, A., Lee, E., Speirs, J., y Schuch, W. (1999). Volatile production in tomato fruit with modified alcohol dehydrogenase activity. *Journal of the science of food and agriculture*, 79, 131-136.
- Puech, C., Vidal, S., Pegaz, J. F., Riou, C., y Vuchot, P. (2006). Influence des conditions de conservation des vins en bouteille sur leur evolution. *Revue des Oenologes et des Techniques Vitivinicoles et Oenologiques*, 121, 13-16
- Rambla, J. L., Trapero-Mozos, A., Direccion, G., Rubio-Moraga, A., Granell, A., Gómez-Gómez, L., y Ahrazem, O. (2016). Gene-metabolite networks of volatile metabolism in Airén and Tempranillo grape cultivars revealed a distinct mechanism of aroma bouquet production. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1619.
- Ramey, D. D., y Ough, C. S. (1980). Volatile ester hydrolysis or formation during storage of model solutions and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28(5), 928-934.
- Rapp, A., y Mandery, H. (1986). Wine aroma. *Experientia*, 42(8), 873-884.
- Rayirath, P., Benkel, B., Mark Hodges, D., Allan-Wojtas, P., MacKinnon, S., Critchley, A. T., y Prithiviraj, B. (2009). Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 230(1), 135-147.
- Reed, R. H., Davison, I. R., Chudek, J. A., y Foster, R. (1985). The osmotic role of mannitol in the Phaeophyta: an appraisal. *Phycologia*, 24(1), 35-47.
- Ribèreau-Gayon, Y., Glories, Y., Maujean, A., y Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology: The chemistry of wine stabilization and treatments*. John Wiley and Sons Ltd.
- Ripoll, G., Vazquez, M., y Vilanova, M. (2017). Ultraviolet – visible - near infrared spectroscopy for rapid determination of volatile compounds in white grapes during ripening. *Ciência e Técnica Vitivinícola*, 32, 53-61.
- Ristic, R., Bindon, K., Francis, L. I., Herderich, M. J., y Iland, P. G. (2010). Flavonoids and C₁₃-norisoprenoids in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz: relationships between grape and wine composition, wine colour and wine sensory properties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(3), 369-388.
- Robinson, S. P., Pezhmanmehr, M., Speirs, J., McDavid, D. A. J., Hooper, L. C., Rinaldo, A. R., Bogs, J., Ebadi, A., y Walker, A. R. (2019). Grape and wine flavonoid composition in transgenic grapevines with altered expression of flavonoid hydroxylase genes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 25(3), 293-306.
- Rodríguez Montealegre, R., Romero Peces, R., Chacón Vozmediano, J. L., Martínez Gascueña, J., y García Romero, E. (2006). Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(6-7), 687-693.

- Rohwer, C. L., y Erwin, J. E. (2008). Horticultural applications of jasmonates. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 83(3), 283-304.
- Romanazzi, G., Nigro, F., Ippolito, A., DiVenere, D., y Salerno, M. (2002). Effects of pre- and postharvest chitosan treatments to control storage grey mold of table grapes. *Journal of Food Science*, 67(5), 1862-1867.
- Roubelakis-Angelakis, K.A., y Kliewer, W.M. (1986). Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 275-280.
- Rubio-Bretón, P., Garde-Cerdán, T., y Martínez, J. (2018a). Use of oak fragments during the aging of red wines. Effect on the phenolic, aromatic, and sensory composition of wines as a function of the contact time with the wood. *Beverages*, 4(4), 102.
- Rubio-Bretón, P., Gonzalo-Diago, A., Iribarren, M., Garde-Cerdán, T., y Pérez-Álvarez, E. P. (2018b). Bioprotection as a tool to free additives winemaking: Effect on sensorial, anthocyanic and aromatic profile of young red wines. *LWT Food Science and Technology*, 98, 458-464.
- Ruiz-García, Y., y Gómez-Plaza, E. (2013). Elicitors: A tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture*, 3(1), 33-52.
- Ruiz-García, Y., Romero-Cascales, I., Bautista-Ortín, A. B., Gil-Muñoz, R., Martínez-Cutillas, A., y Gómez-Plaza, E. (2013). Increasing bioactive phenolic compounds in grapes: response of six Monastrell grape clones to benzothiadiazole and methyl jasmonate treatments. *American Journal of Enology and Viticulture*, 64, 459-465.
- Ruiz-García, Y., López-Roca, J. M., Bautista-Ortín, A. B., Gil-Muñoz, R., y Gómez-Plaza, E. (2014). Effect of combined use of benzothiadiazole and methyl jasmonate on volatile compounds of Monastrell wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 65, 238-243.
- Sabir, A., Yazar, K., Sabir, F., Kara, Z., Yazici, M. A., y Goksu, N. (2014). Vine growth, yield, berry quality attributes and leaf nutrient content of grapevines as influenced by seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*) and nanosize fertilizer pulverizations. *Scientia Horticulturae*, 175, 1-8.
- Sablayrolles, J. M. (2009). Control of alcoholic fermentation in winemaking: Current situation and prospect. *Food Research International*, 42(4), 418-424.

- Salinas, M. R., Garijo, J., Pardo, F., Zalacain, A., y Alonso, G. L. (2005). Influence of prefermentative maceration temperature on the colour and the phenolic and volatile composition of rosé wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(9), 1527-1536.
- Saerens, S. M., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., y Thevelein, J. M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial biotechnology*, 3(2), 165-177.
- Salmon, J. M. (1996). Sluggish and stuck fermentations: some actual trends on their physiological basis. *Wein Wissenschaft*, 51, 137-140.
- Salvi, L., Brunetti, C., Cataldo, E., Niccolai, A., Centritto, M., Ferrini, F., y Mattii, G. B. (2019). Effects of *Ascophyllum nodosum* extract on *Vitis vinifera*: Consequences on plant physiology, grape quality and secondary metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 21-32.
- Salzman, R. A., Tikhonova, I., Bordelon, B. P., Hasegawa, P. M., y Bressan, R. A. (1998). Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. *Plant physiology*, 117(2), 465-472.
- Sánchez, J., y Harwood, J. L. (2002). Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 564-573.
- Sánchez-Gómez, R., Garde-Cerdán, T., Zalacain, A., Garcia, R., Cabrita, M. J., y Salinas, M. R. (2016a). Vine-shoot waste aqueous extract applied as foliar fertilizer to grapevines: Effect on amino acids and fermentative volatile content. *Food Chemistry*, 197, 132-140.
- Sánchez-Palomo, E., Pérez-Coello, M. S., Díaz-Maroto, M. C., González Viñas, M. A., y Cabezudo, M. D. (2006). Contribution of free and glycosidically-bound volatile compounds to the aroma of muscat “a petit grains” wines and effect of skin contact. *Food Chemistry*, 95(2), 279-289.
- Sasaki, K., Takase, H., Matsuyama, S., Kobayashi, H., Matsuo, H., Ikoma, G., y Takata, R. (2016). Effect of light exposure on linalool biosynthesis and accumulation in grape berries. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80, 2376-2382.
- Savoi, S., Wong, D. C. J., Arapitsas, P., Miculan, M., Bucchetti, B., Peterlunger, E., Fait, A., Mattivi, F., y Castellarin, S. D. (2016). Transcriptome and metabolite profiling reveals that prolonged drought modulates the phenylpropanoid and terpenoid pathway in white grapes (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biology*, 16, 67.

- Schaller, K., Löhnertz, O., Oswald, D., y Sprengart, B. (1985). Nitratanreicherung in reben. 3. Mitteilung: Nitratdynamik in rappen und beeren während einer vegetationsperiode in verschiedenen rebsorten. *Wein-Wiss*, 40, 147-159.
- Schwab, W., Davidovich-Rikanati, R., y Lewinsohn, E. (2008). Biosynthesis of plant-derived flavor compounds. *The Plant Journal*, 54(4), 712-732.
- Sharma, H. S. S., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. R., y Martin, T. (2014). Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 465-490.
- Shibata, T., Nagayama, K., Tanaka, R., Yamaguchi, K., y Nakamura, T. (2003). Inhibitory effects of brown algal phlorotannins on secretory phospholipase A2s, lipoxygenases and cyclooxygenases. *Journal of Applied Phycology*, 15(1), 61-66.
- Shukla, P. S., Borza, T., Critchley, A. T., y Prithiviraj, B. (2016). Carrageenans from red seaweeds as promoters of growth and elicitors of defense response in plants. *Frontiers in Marine Science*, 31.
- Shukla, P. S., Mantin, E. G., Adil, M., Bajpai, S., Critchley, A. T., y Prithiviraj, B. (2019). *Ascophyllum nodosum*-based biostimulants: Sustainable applications in agriculture for the stimulation of plant growth, stress tolerance, and disease management. *Frontiers in Plant Science*, 10, 655
- Silva, I., Campos, F. M., Hogg, T., y Couto, J. A. (2011). Factors influencing the production of volatile phenols by wine lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 145(2-3), 471-475.
- Sims, C. A., Eastridge, J. S., y Bates, R. P. (1995). Changes in phenols, color, and sensory characteristics of muscadine wines by pre- and postfermentation additions of PVPP, casein, and gelatin. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46(2), 155-158.
- Smith, F. A., y Raven, J. A. (1979). Intracellular pH and its regulation. *Annual Review of Plant Physiology*, 30(1), 289-311.
- Smith, P. A., McRae, J. M., y Bindon, K. A. (2015). Impact of winemaking practices on the concentration and composition of tannins in red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 21, 601-614.
- Song, J., Shellie, K. C., Wang, H., y Qian, M. C. (2012). Influence of deficit irrigation and kaolin particle film on grape composition and volatile compounds in Merlot grape (*Vitis vinifera* L.). *Food Chemistry*, 134(2), 841-850.

- Song, J., Smart, R., Wang, H., Damberg, B., Sparrow, A., y Qian, M. C. (2015). Effect of grape bunch sunlight exposure and UV radiation on phenolics and volatile composition of *Vitis vinifera* L. cv. Pinot noir wine. *Food Chemistry*, 173, 424-431.
- Sparvoli, F., Martin, C., Scienza, A., Gavazzi, G., y Tonelli, C. (1994). Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology*, 24(5), 743-755.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., y Verstrepen, K. J. (2015). Brettanomyces yeasts — From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24-38.
- Stines, A. P., Grubb, J., Gockowiak, H., Henschke, P. A., Høj, P. B., y Heeswijck, R. (2000). Proline and arginine accumulation in developing berries of *Vitis vinifera* L. in Australian vineyards: Influence of vine cultivar, berry maturity and tissue type. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 6(2), 150-158.
- Stirk, W. A., y Van Staden, J. (1997). Comparison of cytokinin- and auxin-like activity in some commercially used seaweed extracts. *Journal of Applied Phycology*, 8(6), 503-508.
- Stirk, W. A., Arthur, G. D., Lourens, A. F., Novák, O., Strnad, M., y Van Staden, J. (2004). Changes in cytokinin and auxin concentrations in seaweed concentrates when stored at an elevated temperature. *Journal of Applied Phycology*, 16(1), 31-39.
- Stirk, W. A., Tarkowská, D., Turečová, V., Strnad, M., y van Staden, J. (2014). Abscisic acid, gibberellins and brassinosteroids in Kelpak®, a commercial seaweed extract made from *Ecklonia maxima*. *Journal of Applied Phycology*, 26(1), 561-567.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., y Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(2), 139-173.
- Taiz, L., y Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*. Edition 5. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Tarara, J. M., Lee, J., Spayd, S. E., y Scagel, C. F. (2008). Berry temperature and solar radiation alter acylation, proportion, and concentration of anthocyanin in Merlot grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59(3), 235-247.
- Taskos, D., Stamatiadis, S., Yvin, J.-C., y Jamois, F. (2019). Effects of an *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. extract on grapevine yield and berry composition of a Merlot vineyard. *Scientia Horticulturae*, 250, 27-32.

- Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S., y Gerós, H. (2013a). Berry phenolics of grapevine under challenging environments. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(9), 18711-18739.
- Teixeira, J., Gaspar, A., Garrido, E. M., Garrido, J., y Borges, F. (2013b). Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*, 2013, 1-11.
- ter Schure, E. G., van Riel, N. A. W., y Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(1), 67-83.
- Tholl, D. (2006). Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(3), 297-304.
- Tohge, T., Watanabe, M., Hoefgen, R., y Fernie, A. R. (2013). Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. *Frontiers in Plant Science*, 4, 62.
- Tomasi, D., Jones, G. V., Giust, M., Lovat, L., y Gaiotti, F. (2011). Grapevine phenology and climate change: Relationships and trends in the Veneto region of Italy for 1964–2009. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62, 329-339.
- Trinh, T. T. T., Woon, W. Y., Yu, B., Curran, P., y Liu, S.-Q. (2016). Effect of L-isoleucine and L-phenylalanine addition on aroma compound formation during longan juice fermentation by a co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Williopsis saturnus*. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 31(2), 116-124.
- Trotel-Aziz, P., Couderchet, M., Vernet, G., y Aziz, A. (2006). Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology*, 114(4), 405-413.
- Turan, M., y Köse, C. (2004). Seaweed extracts improve copper uptake of grapevine. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil and Plant Science*, 54(4), 213-220.
- Ugliano, M., Henschke, P., Herdrich, M. J., y Pretorius, I. S. (2007). Nitrogen management is critical for wine flavour and style. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 22, 24-30.
- Valero, E., Millán, C., Ortega, J. M., y Mauricio, J. C. (2003). Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(8), 830-835.
- van Leeuwen, C., y Seguin, G. (1994). Incidences de l'alimentation en eau de la vigne, appréciée par l'état hydrique de feuillage, sur le développement de l'appareil végétatif et la maturation du raisin (*Vitis vinifera* cv. Cabernet franc, Saint-Emilion, 1990). *OENO One*, 28(2), 91-110.

- van Leeuwen, C., y Seguin, G. (2006). The concept of terroir in viticulture. *Journal of Wine Research*, 17, 1-10.
- van Leeuwen, C. (2010). Terroir: the effect of the physical environment on vine growth, grape ripening and wine sensory attributes. In *managing wine quality*, edition 1.; Reynolds, A. G.; Ed.; Science Direct, Amsterdam, Netherland, 273-315.
- Vezzulli, S., Civardi, S., Ferrari, F., y Bavaresco, L. (2007). Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 530-533.
- Vilanova, M., Ugliano, M., Varela, C., Siebert, T., Pretorius, I. S., y Henschke, P. A. (2007). Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 145-157.
- Vilanova, M., Diago, M. P., Genisheva, Z., Oliveira, J. M., y Tardaguila, J. (2012). Early leaf removal impact on volatile composition of Tempranillo wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(4), 935-942.
- Vincenzini, M., Guerrini, S., Mangani, S., y Granchi, L. (2017). Amino acid metabolisms and production of biogenic amines and ethyl carbamate. In *biology of microorganisms on grapes, in must and in wine*, edition 2.; König, H., Uden, G., Fröhlich, J., Eds.; Springer Nature Switzerland, 231-253.
- Vitalini, S., Ruggiero, A., Rapparini, F., Neri, L., Tonni, M., y Iriti, M. (2014). The application of chitosan and benzothiadiazole in vineyard (*Vitis vinifera* L. cv Groppello Gentile) changes the aromatic profile and sensory attributes of wine. *Food Chemistry*, 162, 192-205.
- Vitrac, X., Bornet, A., Vanderlinde, R., Valls, J., Richard, T., Delaunay, J.-C., Mérillon, J. M., y Teissédre, P.-L. (2005). Determination of stilbenes (δ -viniferin, *trans*-astringin, *trans*-piceid, *cis*- and *trans*-resveratrol, ϵ -viniferin) in Brazilian Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(14), 5664-5669.
- Wang, T., Jónsdóttir, R., y Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240-248.
- Waterhouse, A. L., Sacks, G. L., y Jeffery, D. W. (2016). *Understanding wine chemistry*. John Wiley y Sons, Chichester, United Kingdom.
- Wu, Y., Duan, S., Zhao, L., Gao, Z., Luo, M., Song, S., Xu, W., Zhang, C., Ma, C., y Wang, S. (2016). Aroma characterization based on aromatic series analysis in table grapes. *Scientific Reports*, 6, 31116.

- Yabur, R., Bashan, Y., y Hernández-Carmona, G. (2007). Alginate from the macroalgae *Sargassum sinicola* as a novel source for microbial immobilization material in wastewater treatment and plant growth promotion. *Journal of Applied Phycology*, 19(1), 43-53.
- Yu, M., Shen, L., Zhang, A., y Sheng, J. (2011). Methyl jasmonate-induced defense responses are associated with elevation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase in *Lycopersicon esculentum* fruit. *Journal of Plant Physiology*, 168(15), 1820-1827.
- Yuan, F., y Qian, M. C. (2016). Development of C₁₃-norisoprenoids, carotenoids and other volatile compounds in *Vitis vinifera* L. Cv. Pinot noir grapes. *Food Chemistry*, 192, 633-641.
- Zalacain, A., Marín, J., Alonso, G. L., y Salinas, M. R. (2007). Analysis of wine primary aroma compounds by stir bar sorptive extraction. *Talanta*, 71, 1610-1615.
- Zamora, F. (2013). La química del color del vino. *Acenología*.
- Zhang, B., Liu, R., He, F., Zhou, P.-P., y Duan, C.-Q. (2015). Copigmentation of malvidin-3-*O*-glucoside with five hydroxybenzoic acids in red wine model solutions: Experimental and theoretical investigations. *Food Chemistry*, 170, 226-233.
- Zhang, P., Fuentes, S., Siebert, T., Krstic, M., Herderich, M., Barlow, E. W. R., y Howell, K. (2016). Terpene evolution during the development of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grapes. *Food Chemistry*, 204, 463-474.