



**UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA**

**ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS AGRÓNOMOS Y DE MONTES**

DEPARTAMENTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROFORESTAL Y GENÉTICA

**INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO CON AGUA  
OZONIZADA EN LA APTITUD ENOLÓGICA DE UVAS DE  
CABERNET SAUVIGNON Y MACABEO Y SU  
REPERCUSIÓN EN EL VINO**

Memoria presentada por

**M<sup>a</sup> Mercedes García Martínez**

para optar al título de Doctor por la Universidad de Castilla-La  
Mancha

en Enología, Viticultura y Sostenibilidad

Directores:

**M. Rosario Salinas Fernández**

**Gonzalo L. Alonso Díaz-Marta**

Albacete, 2020





Dña. Ana María Molina Casanova, Directora del Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética de la Universidad de Castilla-La Mancha.

**CERTIFICA:**

Que la presente memoria de investigación titulada: "Influencia del tratamiento con agua ozonizada en la aptitud enológica de uvas de Cabernet Sauvignon y Macabeo y su repercusión en el vino", que presenta Dña. M<sup>a</sup> Mercedes García Martínez para optar al grado de Doctor en Enología, Viticultura y Sostenibilidad, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M<sup>a</sup> Rosario Salinas Fernández y del Dr. Gonzalo Luis Alonso Díaz-Marta en el Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética de la Universidad de Castilla-La Mancha. Y para que conste, firma el presente certificado.

Albacete, 29 de octubre de 2020

Fdo.: Dra. Ana María Molina Casanova





Dña. M<sup>ª</sup> Rosario Salinas Fernández y D. Gonzalo Luis Alonso Díaz-Marta, Catedráticos de Universidad del Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética de la Universidad de Castilla-La Mancha.

**INFORMAN:**

Que la presente memoria de investigación titulada: "Influencia del tratamiento con agua ozonizada en la aptitud enológica de uvas de Cabernet Sauvignon y Macabeo y su repercusión en el vino", que presenta Dña. M<sup>ª</sup> Mercedes García Martínez para optar al grado de Doctor en Enología, Viticultura y Sostenibilidad, ha sido realizada bajo nuestra dirección, y a nuestro juicio, cumple todos los requisitos para proceder a su lectura y defensa pública, por lo que autorizamos su presentación en el Departamento de Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética de la Universidad de Castilla-La Mancha. Y para que así conste, firman el presente documento.

Albacete, 29 de octubre de 2020

Fdo.: Dra. M<sup>ª</sup> Rosario Salinas Fernández      Fdo.: Dr. Gonzalo L. Alonso Díaz-Marta



## **FINANCIACIÓN**

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al Proyecto ININTER ECOSANVID 2015, perteneciente al Programa FEDER ININTERCONECTA (CDTI, EXP: 00093497/ITC-20151026), cuyo título era *“Intervención ecológica para mejorar el estado sanitario de las viñas y su efecto en la calidad de las uvas y sus vinos”*. Dicho proyecto fue financiado por el consorcio interregional de empresas formado por DCOOP-BACO, FINCA ANTIGUA, VIALCON y NUTRicontrol.





## *Agradecimientos*

Llega el momento de agradecer a todas aquellas personas que han confiado en mí y han hecho posible que presente la Tesis Doctoral. Este trabajo es el fruto de mucho esfuerzo, lágrimas, pero también de muchas alegrías, por lo que siempre estaré agradecida a todas las personas que me han ayudado a recorrer este duro y largo camino.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, M<sup>ª</sup> Rosario Salinas y Gonzalo L. Alonso, el haberme dado la oportunidad de trabajar con ellos. Hace prácticamente 8 años que me dieron la bienvenida al grupo y me han dado la ocasión de poder trabajar en diversos temas, hasta que, en 2015, me propusieron trabajar en el Proyecto INNTER ECOSANVID, del cual ha surgido mi Tesis Doctoral. Gracias por haberme orientado, por haber estado disponibles en todo momento y lo más importante, por haberme ayudado tanto a nivel personal como profesional.

A Amaya, por animarme a terminar la Tesis y haber confiado en mí.

A mis chicas de la Cátedra de Química Agrícola, Kortés, Ro, Valle, Candi, Natalia, Ana, Cristina y Esther por vuestra amistad y por los momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio.

Al que ha sido mi principal apoyo durante este camino, Antonio, por su paciencia y comprensión.

A mis padres, Mercedes y José Antonio, y a mi hermana Laura, gracias por vuestra confianza y por haber hecho de mí la persona

que soy hoy en día. También agradecer a mis tíos M<sup>a</sup> Bene y José Félix todo el apoyo recibido desde que empecé este camino.

*En especial, me gustaría dedicar este trabajo **a mi abuela Angelita**, porque sé que se sentiría orgullosa de ver todo lo que he conseguido. Gracias por enseñarme tanto en esta vida.*



# ÍNDICE

---



<b>1. RESUMEN /ABSTRACT</b>	1	6
<b>2. JUSTIFICACIÓN</b>	9	
<b>3. INTRODUCCIÓN</b>	15	
3.1. Situación del sector vitivinícola	17	
3.1.1. El viñedo y el vino en el mundo y en España	17	
3.1.2. El viñedo y el vino en Castilla-La Mancha	20	
3.1.3. La Denominación de origen La Mancha	25	
3.1.4. Estado sanitario del viñedo en Castilla-La Mancha	27	
3.1.4.1. Oídio, mildiu y botritis	27	
3.1.4.2. Enfermedades de la madera de la vid	28	
3.1.4.3. Estrategias de manejo para su control	31	
3.2. Descripción de las variedades	32	
3.2.1. Cabernet Sauvignon	32	
3.2.2. Macabeo	35	
3.3. El ozono en disolución acuosa	38	
3.3.1. Características generales	38	
3.3.2. Acción germicida del ozono	45	
3.3.3. Aplicaciones más habituales del ozono	47	
3.3.4. Aplicaciones del ozono en el sector agroalimentario	48	
3.4. Técnicas para la aplicación de disoluciones acuosas de ozono en viña	51	
3.4.1. Pulverización foliar a la parte aérea	51	
3.4.2. Riego por goteo	54	
3.4.3. Endoterapia	56	
3.5. Calidad de la uva y de vino	60	
3.5.1. Parámetros enológicos convencionales y cromáticos	60	
3.5.1.1. °Baumé	60	
3.5.1.2. Acidez y pH	61	
3.5.1.3. Color	62	
3.5.2. Composición fenólica	64	
3.5.2.1. Madurez fenólica de la uva	64	
3.5.2.2. Compuestos fenólicos	66	
3.5.2.2.1. Compuestos no flavonoides	67	
3.5.2.2.1.1. Ácidos fenólicos	67	
3.5.2.2.1.2. Estilbenos	68	
3.5.2.2.2. Compuestos flavonoides	69	
3.5.2.2.2.1. Antocianos	69	
3.5.2.2.2.2. Flavanoles y taninos	70	
3.5.2.2.2.3. Flavonoles	72	
3.5.3. Composición aromática	73	
3.5.3.1. Madurez aromática de la uva	73	



3.5.3.2. Compuestos aromáticos	76
3.5.3.2.1. Aroma varietal	76
3.5.3.2.1.1. Aroma libre	78
3.5.3.2.1.2. Precursores específicos del aroma	82
3.5.3.2.1.3. Precursores no específicos del aroma	82
3.5.3.2.2. Aroma fermentativo	84
3.5.3.2.3. Aroma post-fermentativo	87
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>89</b>
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>93</b>
5.1. Planteamiento inicial	95
5.2. Selección de parcelas y marcaje de cepas	96
5.2.1. Delimitación de parcelas y marcaje de cepas	99
5.3. Tratamientos con la disolución acuosa de ozono	99
5.3.1. Tratamiento aéreo	102
5.3.2. Tratamiento por riego	102
5.3.3. Tratamiento combinado riego+aéreo	104
5.3.4. Tratamiento por endoterapia	105
5.3.5. Tratamiento combinado endoterapia+aéreo	107
5.4. Seguimiento de la maduración	108
5.5. Vinificaciones y seguimiento de las fermentaciones	111
5.5.1. Vinificación de la variedad Cabernet Sauvignon	111
5.5.2. Vinificación de la variedad Macabeo	114
5.6. Métodos de análisis en uvas	116
5.6.1. Parámetros enológicos convencionales	116
5.6.2. Madurez fenólica	117
5.6.3. Parámetros cromáticos	118
5.6.4. Índice de polifenoles totales (IPT)	119
5.6.5. Índice de potencial aromático varietal (IPAv)	119
5.6.6. Determinación de compuestos volátiles	120
5.6.7. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular	124
5.7. Métodos de análisis en vinos	127
5.7.1. Parámetros enológicos convencionales	127
5.7.2. Parámetros cromáticos	127
5.7.3. Índice de polifenoles totales (IPT)	128
5.7.4. Índice de potencial aromático varietal (IPAv)	128
5.7.5. Determinación de compuestos volátiles	128
5.7.6. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular	131
5.7.7. Determinación de azúcares, ácidos y glicerol	131
5.7.8. Análisis estadístico	132





<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	133
6.1. Uvas	135
6.1.1. Cabernet Sauvignon	135
6.1.1.1. Seguimiento de la maduración	135
6.1.1.2. Momento de vendimia	141
6.1.1.2.1. Parámetros enológicos, cromáticos, madurez fenólica e IPAv de las uvas	141
6.1.1.2.2. Composición fenólica y aromática de las uvas	148
6.1.1.3. Análisis discriminante de las uvas Cabernet Sauvignon	156
6.1.1.4. Resultados más concluyentes en las uvas Cabernet Sauvignon	162
6.1.2. Macabeo	163
6.1.2.1. Seguimiento de la maduración	163
6.1.2.2. Momento de vendimia	169
6.1.2.2.1. Parámetros enológicos, absorbancia a 420 nm e IPAv de las uvas	169
6.1.2.2.2. Composición fenólica y aromática de las uvas	172
6.1.2.3. Análisis discriminante de las uvas Macabeo	177
6.1.2.4. Resultados más concluyentes en las uvas Macabeo	179
6.2. Vinos	180
6.2.1. Cabernet Sauvignon	180
6.2.1.1. Parámetros enológicos	180
6.2.1.2. Parámetros cromáticos	184
6.2.1.3. Composición fenólica	187
6.2.1.4. Composición aromática	192
6.2.1.5. Análisis discriminante de los vinos Cabernet Sauvignon	199
6.2.1.6. Resultados más concluyentes en los vinos Cabernet Sauvignon	207
6.2.2. Macabeo	208
6.2.2.1. Parámetros enológicos	208
6.2.2.2. Parámetros cromáticos	212
6.2.2.3. Composición fenólica	214
6.2.2.4. Composición aromática	217
6.2.2.5. Análisis discriminante de los vinos Macabeo	225
6.2.2.6. Resultados más concluyentes en los vinos Macabeo	229
<b>7. CONCLUSIONES</b>	231
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	237
<b>9. ANEXO</b>	265





# 1. RESUMEN

---

## ABSTRACT



El agua ozonizada se ha utilizado en viñedos para reducir el uso de plaguicidas debido a su demostrada eficacia en el control de enfermedades fúngicas, y a que no deja residuos. Sin embargo, son escasos los trabajos que tratan del efecto de los tratamientos con agua ozonizada sobre las características químicas de las uvas y de los vinos, y por tanto sobre su calidad enológica. Por ello, surge esta Tesis Doctoral, cuyo objetivo es el estudio del efecto que diferentes tratamientos con agua ozonizada tienen sobre la aptitud enológica de uvas de las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo cultivadas en Castilla-La Mancha y su repercusión en el vino.

Para llevar a cabo este estudio, durante tres cosechas consecutivas se emplearon varias estrategias de aplicación de dicha disolución. En la cosecha de 2015, se pulverizó la parte superficial de la planta (aplicación aérea). En 2016, las cepas fueron tratadas con la disolución acuosa de ozono mediante dos estrategias, una aplicando riego por goteo y otra mediante la combinación de riego por goteo con la aplicación aérea. Por último, en 2017 las cepas fueron tratadas inyectando la disolución de ozono en el tronco, endoterapia, y combinando endoterapia con la aplicación aérea.

El efecto de los tratamientos en las uvas y en los vinos dependió de las diferentes estrategias de aplicación utilizadas, pero todas influyeron en el equilibrio azúcar/acidez de las uvas, lo que sugiere un retraso en la maduración.

También en las uvas, se observó que en las de la variedad Cabernet Sauvignon, la aplicación aérea mejoró el potencial aromático y el color. Cuando dicha aplicación se realizó combinando el tratamiento de riego y la aplicación aérea se obtuvieron los mejores resultados en los parámetros de calidad,



tanto a nivel fenólico y aromático como en el color. Sin embargo, cuando se aplicó el agua ozonizada mediante endoterapia, se produjo un efecto supresor en la calidad de la uva, pero éste fue menos negativo cuando se combinó la endoterapia con el tratamiento aéreo.

En la variedad Macabeo los tratamientos por riego y endoterapia aumentaron el contenido de precursores aromáticos glicosilados con respecto a los tratamientos combinados, mientras que los compuestos C6 permanecieron constantes, lo que podría indicar una mejora de la calidad aromática de las uvas. Estos resultados difieren de los obtenidos en uvas Cabernet Sauvignon, lo cual pone de manifiesto que la repercusión de los tratamientos en la calidad de la uva depende también de la variedad.

En relación con el efecto observado en los vinos, tanto de Cabernet Sauvignon como de Macabeo, los procedentes de cepas sometidas a los tratamientos más intensivos (tratamientos combinados de riego y endoterapia con aplicaciones aéreas) tuvieron mejores características que los de los tratamientos menos intensivos (riego y endoterapia), lo que sugiere que el efecto del agua ozonizada en la calidad del vino depende más de la intensidad de la aplicación que de la estrategia utilizada.

Por tanto, los tratamientos con agua ozonizada pueden ser gestionados a criterio del viticultor con el fin de mejorar la composición química de las uvas, y consiguientemente, obtener vinos con una calidad química diferenciada. Si unimos este efecto a su demostrada aptitud plaguicida sin generación de residuos, podríamos considerar al agua ozonizada como una prometedora herramienta ecológica capaz de realizar de forma simultánea una



función de protección de la uva y del medio ambiente y de mejorante de su aptitud enológica.



Ozonated water has been used in vineyards to reduce the use of pesticides due to its proven effectiveness in controlling fungal diseases and because it does not leave residues. However, there are few studies that deal with the effect of ozonated water treatments on the chemical characteristics of grapes and wines, and therefore on their enological quality. For this reason, this Doctoral Thesis arises with the objective of studying the effect that different treatments with ozonated water have on the enological aptitude of grapes of the Cabernet Sauvignon and Macabeo varieties grown in Castilla-La Mancha and their impact on wine.

To carry out this study, during three consecutive harvests, various application strategies of the mentioned solution were used. In the 2015 harvest, the surface part of the plant was sprayed (aerial application). In 2016, the vines were treated with the aqueous ozone solution using two strategies, one applying drip irrigation and the other combining drip irrigation with aerial application. Finally, in 2017 the vines were treated by injecting the ozone solution into the trunk, endotherapy, and combining endotherapy with aerial application.

The effect of the treatments on grapes and wines depended on the different application strategies used, although the greatest impact was on the sugar/acidity balance of the grapes, which suggests a delay in ripening.

In relation to the effect of the treatments on the grapes, it was observed that in the Cabernet Sauvignon variety, the aerial application improved the aromatic potential and colour of the grapes. When the application was carried out combining irrigation treatment and aerial application, the best results were obtained in the quality parameters of the grape, both at the phenolic and



aromatic level as well as in the colour. However, when ozonated water was applied by endotherapy, there was a suppressive effect on the quality of the grape, but less negative when endotherapy was combined with aerial application.

In the Macabeo variety, irrigation and endotherapy treatments increased the content of glycosylated aroma precursors with respect to the combined treatments, while C6 compounds remained constant, which could indicate an improvement in the aromatic quality of the grapes. These results differ from those obtained in Cabernet Sauvignon grapes, which shows that the impact of the treatments on grape quality also depends on the variety.

Regarding the effect observed in the wines, both Cabernet Sauvignon and Macabeo, those from vines subjected to the most intensive treatments (combined irrigation and endotherapy treatments with aerial applications) had better characteristics than those of the less intensive treatments (irrigation and endotherapy). Such results suggest that the effect of ozonated water on wine quality depends more on the intensity of the application than on the strategy used.

Therefore, ozonated water treatments can be managed at the discretion of the winegrower in order to improve the chemical composition of the grapes and, consequently, obtain wines with a differentiated chemical quality. If we combine this effect with its proven pesticide aptitude without generating residues, we could consider ozonated water as a promising ecological tool capable of simultaneously performing a function of protecting the grape and the environment, and improving its enological aptitude.





## 2. JUSTIFICACIÓN

---



El cultivo de la vid en el mundo tiene un gran valor económico, medioambiental y cultural ya que, en 2019, según datos de la Organización Internacional de la Viña y el Vino, la superficie vitícola mundial se situó aproximadamente en unos 7,45 millones de hectáreas, destacando España como el país vitícola por excelencia.

Las enfermedades más comunes que afectan a los viñedos son oídio, mildiu y botritis, pero existen otros problemas fitosanitarios como los causados por las enfermedades de la madera, que afectan tanto a planta joven como adulta, causando un importante impacto económico en Castilla-La Mancha. Diversos factores como la intensificación del cultivo, el uso de material vegetal de propagación de baja calidad sanitaria, la prohibición en el uso del arsenito de sodio y la escasa protección de las heridas de poda, entre otros, han contribuido a un aumento considerable de la incidencia de estas enfermedades en todo el mundo en las últimas dos décadas.

Estudios recientes han revelado que el ozono, en disolución acuosa, es un candidato prometedor para limitar la infección de la vid por hongos de la madera. Por ello, en la actualidad el agua ozonizada se está utilizando en viñedos para reducir el uso de plaguicidas. Además, su empleo en el Sector Agroalimentario es cada vez más demandado, debido al interés creciente por la utilización de tratamientos ecológicos no agresivos con el medio ambiente. Entre ellos, los más utilizados, son como agente desinfectante y desodorizante, y principalmente para reducir la incidencia de la podredumbre en frutos y prolongar su almacenamiento.



En diversos trabajos se ha observado que los tratamientos con agua ozonizada en hojas y racimos de vid pueden estimular el sistema inmunitario de la planta, y como consecuencia se puede modificar el perfil químico de la uva, lo cual repercutiría en su aptitud enológica y por tanto en la calidad del vino. Sin embargo, son escasos los estudios que tratan sobre la influencia de dichos tratamientos en la composición de las uvas y de los vinos, y los que hay llegan a resultados contradictorios, que son dependientes de múltiples factores relacionados con la variedad de uva, la dosis y el tipo de aplicación del agua ozonizada y las condiciones medioambientales. Ante la necesidad de dar respuesta a tanta incertidumbre, surge esta Tesis Doctoral, cuyo objetivo principal es evaluar el efecto que diferentes tratamientos con agua ozonizada tienen sobre la aptitud enológica de uvas de Cabernet Sauvignon y Macabeo cultivadas en Castilla-La Mancha y su repercusión en el vino.

Para ello, se utilizarán cinco estrategias de aplicación incluyendo: 1) pulverización de la parte aérea de la cepa, 2) riego por goteo, 3) combinación de riego y pulverización, 4) endoterapia y 5) combinación de endoterapia y pulverización. El efecto de dichos tratamientos sobre los parámetros enológicos, cromáticos, potencial aromático y la composición fenólica y aromática de la uva y del vino fue estudiado, empleando para ello los métodos analíticos más actuales.

En definitiva, se pretende demostrar que la aplicación de agua ozonizada al viñedo podría ser usada para modular la calidad de la uva. Ello nos permitiría avanzar en la propuesta del uso del agua ozonizada como una interesante herramienta vitícola, pues junto a



su ya conocido potencial fitoquímico y su ausencia de residuos, podría facilitar la producción de uvas de mejor aptitud enológica.







## 3. INTRODUCCIÓN

---





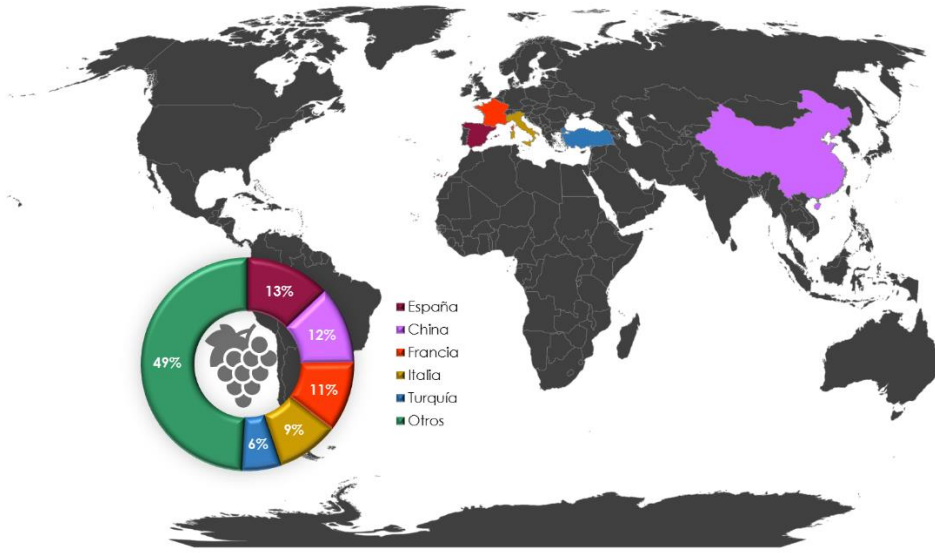
### **3.1. Situación del sector vitivinícola**

Los trabajos del presente estudio se han llevado a cabo en viñedos de Castilla-La Mancha, que es la región de mayor superficie dedicada al cultivo del viñedo en el mundo. A continuación, se hará un estudio de la situación del sector vitivinícola a nivel mundial, en España y en Castilla-La Mancha, con especial atención al estado sanitario del viñedo, ya que el agua ozonizada, es una de las principales sustancias que podrían sustituir a los actuales productos fitosanitarios.

#### **3.1.1. El viñedo y el vino en el mundo y en España**

El cultivo de la vid y comercialización del vino, constituyen una de las principales fuentes de ingreso por parte de la agricultura. La superficie vitícola mundial en 2018 ha aumentado en 24000 hectáreas respecto a 2017, situándose el total mundial en 7,45 millones de hectáreas, según datos de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV, 2019). España es el país con mayor extensión de viñedo del mundo, con aproximadamente el 13,01% del total, seguido de China (11,75%), Francia (10,65%), Italia (9,46%) y Turquía (6,01%). La superficie de estos cinco países supone más del 50% de la superficie de viñedo total del mundo (Fig. 1).



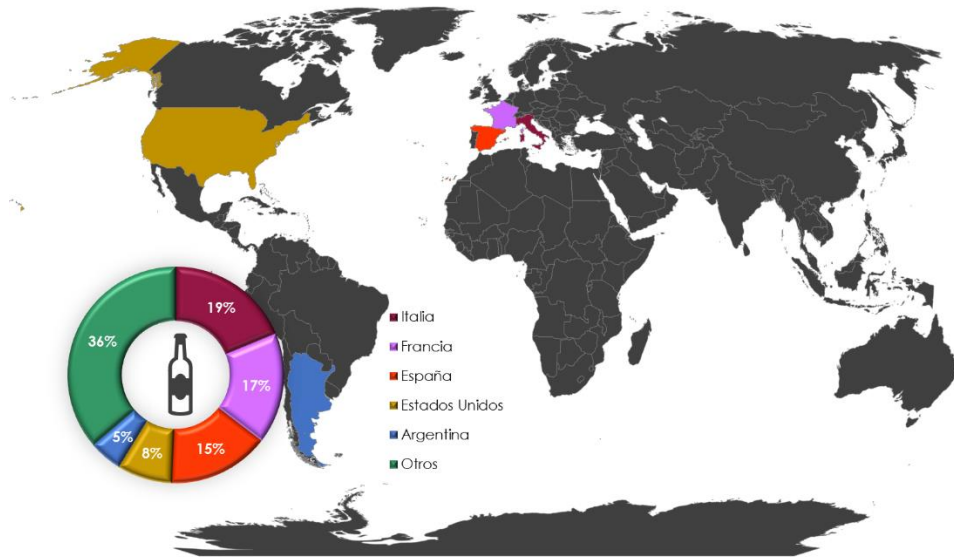


**Figura 1.** Principales superficies de viñedos en el mundo (OIV, 2019).

En lo que respecta a la producción mundial de uva, en 2018 se situó en torno a los 77,8 millones de toneladas y con respecto al año anterior, hubo un aumento de casi 5 millones de toneladas. El 57% fue destinado a uva para vinificación, el 36% a uva de mesa y el 7% a uvas pasas. A pesar de que España es el país con mayor superficie destinada al cultivo de la vid, es sin embargo el cuarto productor de uva. Otros países que ocupan un puesto más bajo en el ranking de superficie destinada a dicho cultivo obtienen una mayor producción. Un ejemplo de ello serían los casos de China, Italia y Estados Unidos ya que con una menor superficie destinada al viñedo, obtienen una producción mayor.

La producción mundial de vino en 2018 fue de 292 millones de hectolitros (Mhl), cifra que representa un aumento de 43 Mhl en relación a 2017. Italia fue el país con mayor producción de vino (54,8 Mhl), seguido de Francia (48,6 Mhl), España (44,4 Mhl), Estados Unidos (23,9 Mhl) y Argentina (14,5 Mhl) (Fig. 2).

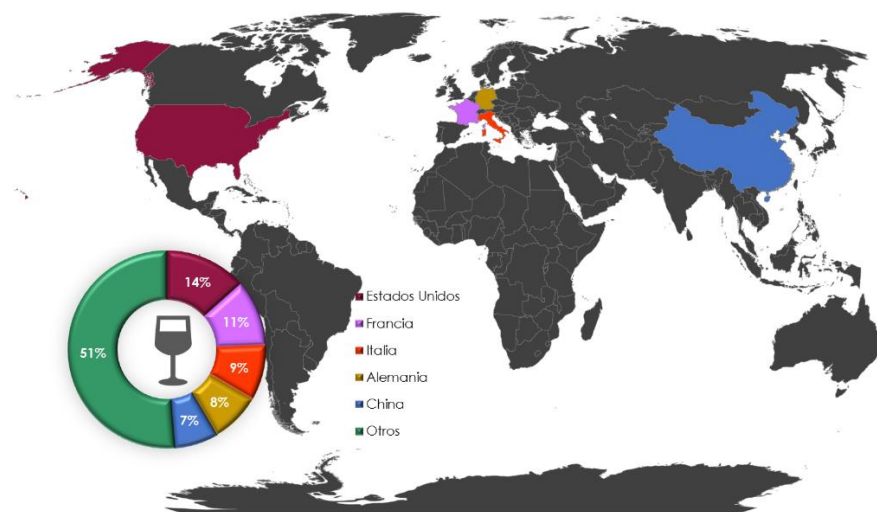




**Figura 2.** Principales productores de vino en el mundo (OIV, 2019).

En cuanto al consumo de vino, según las estadísticas, en el año 2018 se consumieron 246 Mhl, prácticamente lo mismo que el año anterior. Estados Unidos es el principal consumidor de vino mundial, con un consumo de 33 Mhl (14% mundial), seguido de Francia (26,8 Mhl), Italia (22,4 Mhl), Alemania (20,0 Mhl) y China (17,6 Mhl) que desciende su consumo en un 9% con respecto al año anterior (Fig. 3). España a pesar de ser el tercer mayor productor de vino en el mundo, se encuentra en el puesto octavo en cuanto a volumen total consumido (10,5 Mhl).





**Figura 3.** Principales consumidores de vino en el mundo (OIV, 2019).

En 2018 las exportaciones mundiales de vino representaron aproximadamente el 43,9% del consumo mundial, siendo España, Italia y Francia los principales países exportadores. Estos tres países exportan más de 54,9 Mhl, lo que supone más del 22,3% del consumo mundial. En cambio, entre los principales importadores de vino a nivel mundial, se encuentran Alemania, Reino Unido y Estados Unidos. En quinto lugar se encuentra China, con un fortísimo incremento de las importaciones en torno al 79%.

En resumen, España juega un papel importante a nivel mundial en materia de cultivo del viñedo y producción de vino, convirtiéndose en el primer país por superficie destinada al cultivo de la vid, en el tercero por volumen de vino producido y en el primero por volumen exportado.

### 3.1.2. El viñedo y el vino en Castilla-La Mancha

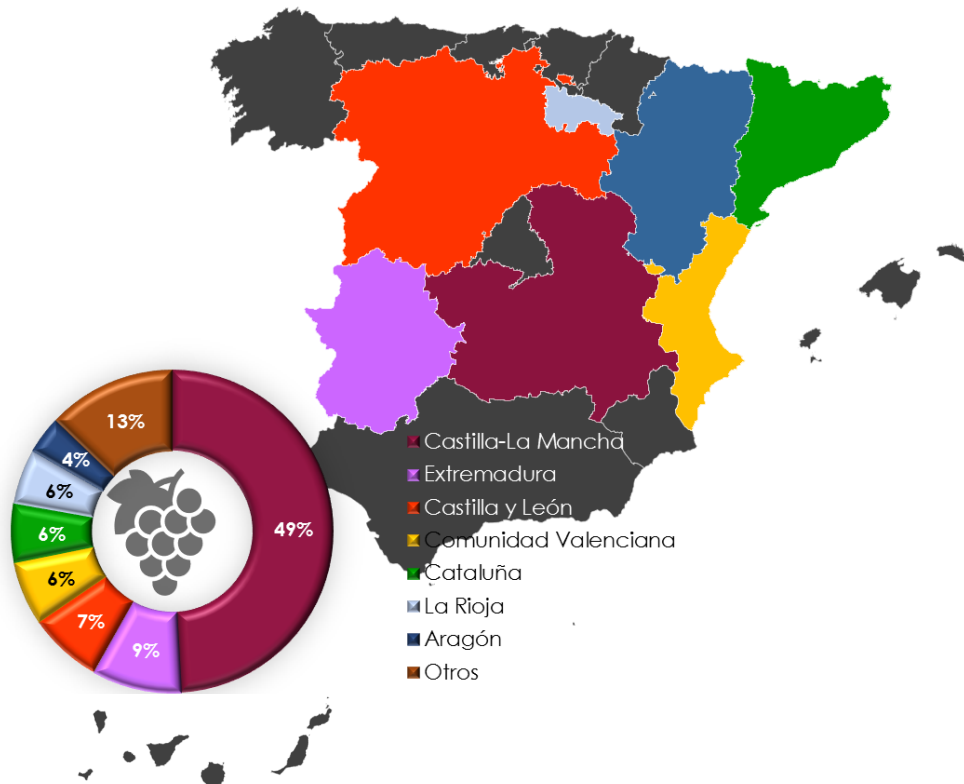
Los viñedos utilizados en este estudio están localizados en Castilla-La Mancha. Esta región está situada en el centro de la Península Ibérica. La gran llanura de la Mancha hace que esta





comarca sea la más homogénea y extensa del país. La altitud está en torno a 600-800 m en la mayor parte de su territorio y se encuentra asilada de las grandes masas de agua por sistemas montañosos (Cordillera Ibérica, Sistema Central, Sierras Béticas, etc.) que confieren a la zona un clima continental.

En 2019, según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), la superficie de viñedo para uva de vinificación en España fue de 952829 hectáreas (ha), 7929 ha menos que en 2018. Castilla-La Mancha es la comunidad con mayor superficie de viñedo de España con 468027 ha, lo que suponen el 49,1% de la superficie total. Con respecto al dato de 2018, registra una caída del 1,2%, o 5782 hectáreas menos. A continuación, le siguen Extremadura con 85785 ha y Castilla y León con 69970 ha (Fig. 4).

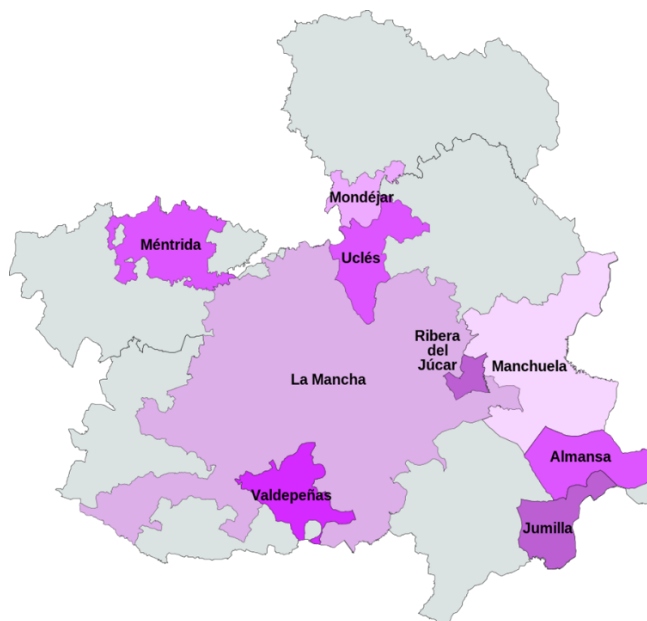


**Figura 4.** Principales comunidades autónomas con mayor extensión de viñedo en España (OeMv, 2019).



El mayor factor limitante de la viticultura de Castilla-La Mancha es el agua, con precipitaciones media anuales por debajo de los 600 mm incluso zonas muy secas donde no se superan los 320 mm. Debido a esto, para mejorar la producción e implantar nuevas variedades, ha habido un aumento del número de hectáreas de plantación con sistema de regadío, llegando a ser más del 50% del total.

Esta comunidad está constituida por 5 provincias: Albacete, Ciudad Real, Cuenca, Guadalajara y Toledo y posee nueve Denominaciones de Origen (D.O.): Almansa, Jumilla, La Mancha, Manchuela, Méntrida, Mondéjar, Ribera del Júcar, Uclés y Valdepeñas (Fig. 5). Este trabajo fue realizado con viñedos acogidos a la D.O. La Mancha en la zona de Cuenca.



**Figura 5.** Denominaciones de Origen de la comunidad de Castilla-La Mancha.



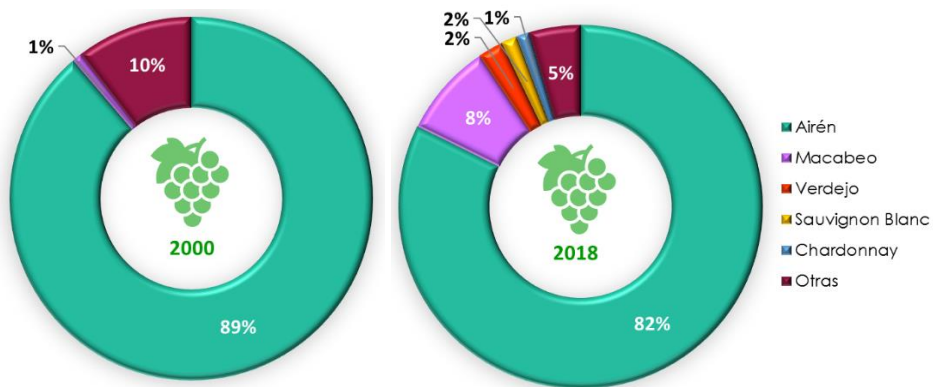




Por provincias, destaca Ciudad Real con la mayor superficie de viñedo (36,1%), seguido de Toledo (24,8%), Albacete (19,6%), Cuenca (19,1%) y por último Guadalajara (0,4%).

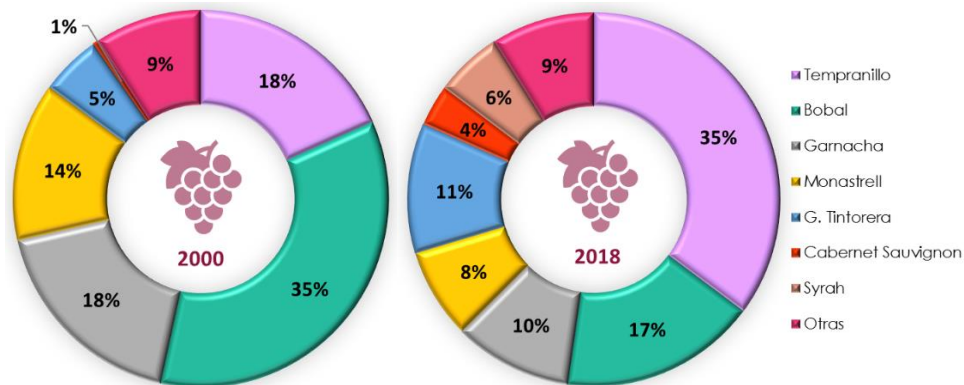
En Castilla-La Mancha, durante el período 2000-2018, se ha experimentado una gran transformación del viñedo, pasando en el año 2000 del 30,7% de variedades tintas al 44,1% en 2018. Por el contrario, las variedades blancas han pasado de representar en el 2000 el 68,7% de las variedades de uvas plantadas en la región, a ser en 2018 del 55,5%.

Respecto a las variedades tintas, destaca la Tempranillo que representa con 71089 ha el 15,5% de la superficie total de viñedo regional. En cuanto a las variedades blancas, la variedad Airén, con 209178 ha, representa el 45,6% de la superficie total del viñedo existente en la región, y supone el 82% de la superficie total de uva blanca plantada en Castilla-La Mancha. En las Figuras 6 y 7 se hace una comparación de superficie de cultivo de viñedo por variedades, entre el año 2000 y 2018.



**Figura 6.** Comparación de superficie de cultivo de viñedo por variedades blancas (2000-2018) (MAPA, 2018).





**Figura 7.** Comparación de superficie de cultivo de viñedo por variedades tintas (2000-2018) (MAPA, 2018).

De las Figuras 6 y 7 se obtienen varias conclusiones en cuanto al cultivo de variedades tintas y blancas. Con respecto a las tintas, algunas variedades tradicionales de Castilla-La Mancha han reducido su porcentaje, como es el caso de Bobal (-38%), Garnacha (-28%) y Monastrell (-27%). Otro hecho destacable en el periodo 2000-2018 es el aumento considerable de variedades foráneas como Syrah y Cabernet Sauvignon. La superficie destinada a Syrah ha aumentado un 3367% mientras que la de Cabernet Sauvignon ha aumentado un 872%.

En el caso de las blancas, la superficie de la variedad mayoritaria en Castilla-La Mancha que es Airén, ha sufrido un descenso del 36% entre el periodo 2000-2018. Esta disminución se ha debido al auge de otras variedades como la Macabeo, Chardonnay y Sauvignon Blanc que han aumentado un 572%, 3851% y 6102% respectivamente. Cabe destacar que la Macabeo es la única variedad tradicional de Castilla-La Mancha cuyo cultivo ha aumentado.

El Sistema de Información de Mercados del Sector Vitivinícola (INFOVI) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA)





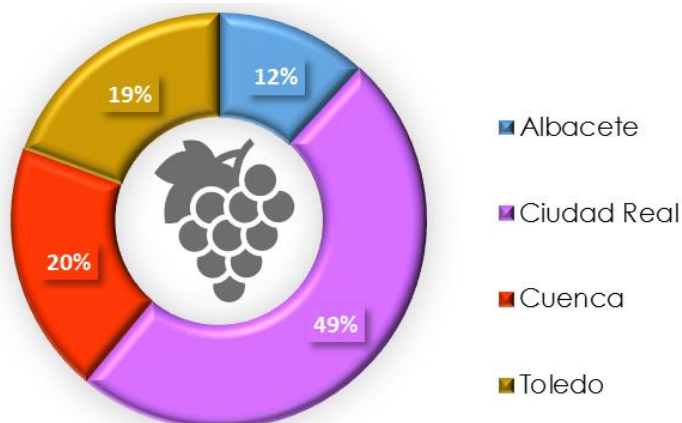
ha elevado hasta los 43,9 Mhl la producción de vino en la cosecha 2018/2019 en España, según los datos declarados entre el 1 de agosto y el 31 de diciembre de 2018. Dentro de ese contexto, la producción de vino en Castilla-La Mancha, que ascendió a 24,5 Mhl, representa el 55,8% del total nacional, de los cuales el 44,4% se corresponde a vino tinto y rosado, y el 55,6% a vino blanco.

Castilla-La Mancha ha sido considerada durante mucho tiempo un mero abastecedor de vinos a granel o de embotellados a bajo precio. Por ello, se está abordando una nueva estrategia para el sector vitivinícola intentando desvincular a la región de los graneles y procurando construir una nueva imagen de los vinos regionales mucho más ligados a atributos positivos como “natural”, “sostenible”, etc. Por ello, en el Plan Estratégico del Vino se propone cambiar esta estructura ligándose a pago por calidad, al embotellado, a producciones diferenciadas y a productos que tengan también un trasfondo sostenible, medioambiental y cultural. Por ello, es necesario limitar los rendimientos elevados en el viñedo y que el sector se comprometa en un contexto global con la calidad, estimulando una viticultura más profesional, que abandone objetivos exclusivamente productivistas.

### **3.1.3. La Denominación de Origen La Mancha**

Se encuentra enmarcada entre las provincias de Albacete, Ciudad Real, Cuenca y Toledo. En la Figura 8 se muestra la distribución por provincias de la superficie de viñedo acogido a la D.O. La Mancha.

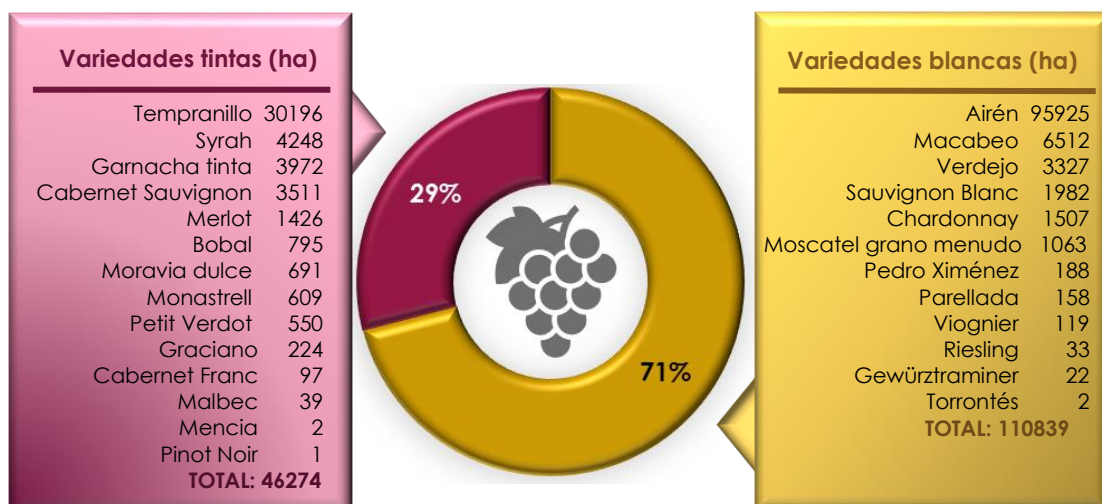




**Figura 8.** Viñedo acogido a D.O. La Mancha (Denominación de Origen La Mancha, 2019).

La superficie total de viñedo acogida a dicha denominación es de 157113 ha. Ciudad Real es la provincia con mayor superficie de viñedo con 77191 ha y Albacete es la menor (18679 ha).

En cuanto a la distribución de variedades por superficie, en la Figura 9 se muestran las hectáreas de cada una de las variedades en el año 2019.



**Figura 9.** Variedades por superficie en la D.O. La Mancha (Denominación de Origen La Mancha, 2019).





Como se puede observar, hay una mayor superficie destinada al cultivo de variedades blancas que de tintas. Dentro de las blancas, la mayoritaria es Airén seguida por la variedad Macabeo, al igual que pasaba a nivel de Castilla-La Mancha. En cuanto a las tintas, la mayoritaria es Tempranillo seguida de Syrah, Garnacha tinta y Cabernet Sauvignon.

### **3.1.4. Estado sanitario del viñedo en Castilla-La Mancha**

Las enfermedades más comunes que afectan a los viñedos son oídio, mildiu y botritis, pero existen otros problemas fitosanitarios como los causados por las enfermedades de la madera, que afectan tanto a planta joven como adulta, causando un importante impacto económico en Castilla-La Mancha. Además de los viñedos más antiguos que se ven afectados, los que se plantan como reemplazo, también pueden verse afectados (Florence *et al.*, 2016).

#### **3.1.4.1. Oídio, mildiu y botritis**

El oídio es una enfermedad producida por el hongo *Uncinula necátor*, que es originario de América del Norte, pero muy extendido en España debido a que nuestro país tiene unas condiciones excelentes para su crecimiento. Necrosa las partes verdes y de las bayas de los racimos, llegando a producir la pérdida total de la cosecha. También se le llama ceniza ya que las hojas y las bayas se cubren de un polvo con aspecto de ceniza.

El mildiu está provocado por un hongo llamado *Plasmopara vitícola* que se desarrolla en climas cálidos. Se desarrolla por esporas que hay en el suelo, por lo que solo se transmite cuando las hojas tocan el suelo o cuando una fuerte lluvia salpica las esporas con las



gotas de agua. Este hongo suele atacar las partes verdes como hojas, tallos y racimo, pudiendo llegar a secar el racimo y provocar una pérdida de producción en la viña.

En último lugar, y no menos importante, la botritis también conocida como podredumbre gris, es generada por el hongo *Botrytis cinerea*. Suele ser más letal en los racimos, a los cuales accede por grietas o heridas en las bayas. Se introduce dentro del grano y genera una capa gris alrededor, llegando a vaciar el contenido de este.

#### **3.1.4.2. Enfermedades de la madera de la vid**

Diversos factores como la intensificación del cultivo, el uso de material vegetal de propagación de baja calidad sanitaria, la prohibición en el uso del arsenito de sodio, la realización de podas cada vez menos esmeradas, y la escasa protección de las heridas de poda, entre otros, han contribuido a un aumento considerable de la incidencia de las enfermedades de la madera de la vid en todo el mundo en las últimas dos décadas.

Existe una gran diversidad de especies fúngicas entre los agentes causales de las enfermedades de madera de la vid, produciendo todos ellos un síntoma común que consiste en una alteración interna de la madera de la planta, la cual puede ser por podredumbre seca o necrosis.

En España, las enfermedades más importantes detectadas en la actualidad son yesca y enfermedad de Petri en planta adulta, mientras que en plantaciones jóvenes lo son la enfermedad de Petri, pie negro y decaimiento por *Botryosphaeria* (Gramaje and Armengol, 2011; Agustí-Brisach and Armengol, 2013). En viñedos de la región de Castilla-La Mancha existe una alta incidencia de





*Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella chlamydospora* (enfermedad de Petri y yesca), *Diplodia seriata* (muerte por *Botryosphaeria*) y *Cylindrocarpon* (enfermedad del pie negro) (Tolosa *et al.*, 2019).

La enfermedad de Petri es característica en vides jóvenes, apareciendo sus síntomas a los pocos años de la plantación. Los síntomas consisten en una escasa vitalidad y un retraso del desarrollo de las plantas mostrando brotación reducida o retrasada, hojas de menor tamaño y cloróticas, brotes con entrenudos cortos, y, finalmente, la muerte de las plantas (García-Jiménez *et al.*, 2010). Los agentes causales son *Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella chlamydospora* y *Cadophora luteo-olivacea* (Gramaje and Armengol, 2011). Además, estos hongos están asociados a la yesca en planta adulta, ya que actuarían previamente en la degradación de la madera, favoreciendo la colonización posterior de ésta por *Fomitiporia mediterranea* y *Stereum hirsutum* (García-Jiménez *et al.*, 2010).

Otra de las enfermedades con mayor impacto económico en Castilla-La Mancha es la yesca, que está causada por los hongos basidiomicetos *Fomitiporia mediterranea* y, con mucha menor frecuencia, *Stereum hirsutum*. Cualquier tipo de herida en la planta favorece la infección de estos hongos (García-Jiménez *et al.*, 2010; Mugnai *et al.*, 1999). El síntoma más común es una podredumbre seca de la madera, característicamente blanda, interna, y de color crema o amarillento. Las hojas de las plantas afectadas adquieren un color verde claro volviéndose cloróticas progresivamente, desarrollándose puntos irregulares entre las venas o en los márgenes de las hojas, que se extienden hacia el exterior de las partes distales de los brotes evolucionando posteriormente a necrosis. De la línea



negra y puntos y estrías necróticas se aíslan mayoritariamente ascomicetos asociados a la enfermedad de Petri, como son *Phaeoacremonium* spp., *Phaeomoniella chlamydospora* y *Cadophora luteo-olivacea*.

En cuanto al decaimiento por *Botryosphaeria*, el típico síntoma es la necrosis sectorial de la madera de los brazos o del tronco de las plantas, observándose el decaimiento progresivo de brazos o la muerte de plantas (Úrbez-Torres, 2011). Esta enfermedad está causada por un gran número de especies fúngicas de la familia *Botryosphaeriaceae*, siendo las más frecuentes en España *Diplodia seriata* y *Neofusicoccum parvum* (García-Jiménez et al., 2010). Estos hongos producen picnidios en la madera afectada cuando las condiciones de temperatura y humedad son adecuadas para su desarrollo.

La enfermedad del pie negro se caracteriza por afectar al sistema radical y a la base del patrón de plantas jóvenes, provocando lesiones necróticas que dan lugar a una reducción de la masa radicular. Como consecuencia, las plantas infectadas presentan una reducción del desarrollo y menor vigor, acortamiento de entrenudos, clorosis en hojas y/o marchitez, ausencia o retraso de la brotación, y un decaimiento general que puede acabar con la muerte de la planta. Los agentes causales de esta enfermedad pertenecen a los géneros *Campylocarpon*, *Dactylonectria*, *Cylindrocladiella*, *Cylindrocarpon* e *Ilyonectria*. Estos hongos infectan las plantas a través de heridas en las raíces o en la parte basal del patrón que está en contacto con el suelo (Agustí-Brisach and Armengol, 2013).







### 3.1.4.3. Estrategias de manejo para su control

Desde la prohibición del arsenito de sodio en 2003, por su elevada peligrosidad tanto para el ser humano como para el medio ambiente, no existen métodos para luchar contra estas enfermedades. Debido a la poca eficacia de los tratamientos fungicidas, la mayoría de los estudios realizados en los últimos años para el control de estas enfermedades han sido enfocados desde el punto de vista de la prevención y del uso de adecuadas prácticas culturales.

La prevención de las enfermedades de la vid se tiene que llevar a cabo desde el momento en el que se adquiere el material vegetal para establecer una nueva plantación.

Existen estudios que indican que las plantas procedentes de vivero pueden estar infectadas con una frecuencia elevada por los patógenos asociados a las enfermedades de la madera (Agustí-Brisach *et al.*, 2013). Una vez establecida la plantación, se recomienda realizar un manejo adecuado del cultivo, particularmente en lo relativo a la poda, y el uso de las buenas prácticas culturales. Evitar las situaciones de estrés hídrico sin dar riegos excesivos y realizar una fertilización adecuada sin forzar la producción son prácticas esenciales que se deberán llevar a cabo durante los primeros años de la plantación.

La protección de las heridas de poda mediante el pintado con soluciones fungicidas evitará en gran medida la infección de las plantas por parte de los hongos de dispersión aérea. Los restos de poda son una importante fuente de inóculo de estos patógenos, por lo que se recomienda la retirada de todo el material vegetal podado (Agustí-Brisach *et al.*, 2013).



El desarrollo de un sistema eficaz de tratamiento contra los agentes causantes de estas enfermedades se ha convertido en una necesidad importante en un escenario en el que se están haciendo esfuerzos para promover un uso sostenible de plaguicidas y buscar alternativas respetuosas con el medio ambiente.

En definitiva, se está intentando buscar una nueva estrategia, a ser posible ecológica, que mejore el estado sanitario de las viñas, con especial atención en las enfermedades de madera. El ozono en disolución acuosa es un buen candidato, como se verá más adelante, y por ello surgió el proyecto INNTER ECOSANVID 2015, en el que se enmarca esta Tesis.

## **3.2. Descripción de las variedades**

Cada vez se están introduciendo nuevas variedades que, aunque no han sido tradicionales en la zona, han demostrado una adecuada adaptación y han proporcionado la posibilidad de satisfacer las necesidades del mercado. Este es el caso de la variedad Cabernet Sauvignon, ya que como se ha visto anteriormente, desde el periodo de 2000-2018 ha aumentado su superficie en un 872%. Por otro lado, en cuanto a las variedades blancas, la Macabeo es la única variedad tradicional de Castilla-La Mancha cuyo cultivo ha aumentado en un 572% en estos últimos años. A continuación, se verá detalladamente las características de ambas variedades.

### **3.2.1. Cabernet Sauvignon**

Es de origen francés, concretamente de la región vitivinícola de Burdeos. La cepa apareció en el siglo XVII como resultado del cruce





entre la Cabernet Franc y la Sauvignon Blanc (Bowers and Meredith, 1997).

Esta variedad también es conocida con otros nombres como Vindure, Vidure, Petit Vidure, Bidure o Vidure Sauvignonne. Otros sinónimos antiguos que van cayendo en desuso son: Petit Bouschet, Bouschet Sauvignon (Libournais), Bouchet (Saint Emilion), Carbouet (Bazadais), Marchoupet (Castillon) y Burdeos Tinto (España).

Actualmente, se ha impuesto el nombre de Cabernet Sauvignon en todos los viñedos del mundo, que corresponde realmente al conocido vidueño Bordelés (Enciclopedia del vino, 1987).

Es una cepa vigorosa, de porte erguido y de brotación medio-tardía. Brote muy veloso, blanco y con rebordes de color acarminado oscuro. Las hojas jóvenes son abultadas, algodonosas y conservan el color rojizo en los bordes del limbo que les da un aspecto granate oscuro.

Las hojas adultas son de tamaño medio, orbiculares, brillantes, abultadas, compuestas por 3-5 lóbulos y de color verde oscuro. El fondo de los senos presenta un perfil cóncavo o rectilíneo: los inferiores generalmente abiertos y los superiores de bordes superpuestos. Muchas hojas tienen la base desguarnecida, de forma que el seno peciolar marca el límite justo de partida de los nervios. Los dientes son anchos, ojivales y poco numerosos. La cara inferior de las hojas es ligeramente pubescente, con pelos cortos e incoloros, y vellosa. El peciolo es de color violado y el follaje se enrojece ligeramente en otoño.

En cuanto a los brazos, son acostillados y de color verde claro pero algo pardos en la base. Los zarcillos son finos y pequeños. Los



sarmientos son de color beige amarillento claro, con nudos de color más oscuro y recubiertos de una ligera pruina malva.

Los racimos son pequeños (alrededor de 10 cm de largo), de un peso medio de 100 a 125 gramos, alados y cilindrocónicos. Las bayas son pequeñas (7 a 10 mm de diámetro), esféricas, de piel espesa y dura y de color negro. La pulpa es crujiente y firme, con un sabor especial que recuerda a la violeta y las frutas silvestres y de gusto astringente (Chirivella *et al.*, 1995) (Fig. 10). Su desborre es tardío y su ciclo favorable que la protege de las heladas precoces.

Es muy sensible al oídio, la excoriosis y al ataque de erinosis, e incluso a veces presenta agallas filoxéricas. También es sensible a enfermedades de la madera como la yesca. Por otro lado, es menos sensible al mildiu y bastante resistente a la podredumbre gris, debido al espesor del hollejo de las bayas (Chirivella *et al.*, 1995).



**Figura 10.** Racimo de uva de la variedad Cabernet Sauvignon.





Para obtener vinos de gran calidad, se utilizan portainjertos débiles y podas cortas que mantengan los rendimientos por debajo de 50 hL/ha. A veces, en viñedos nuevos, se recurren a podas largas, con portainjertos más vigorosos que permiten obtener rendimientos más elevados. En este último caso, el vino obtenido es de menor calidad, pero aceptable si se utiliza como variedad para mejorar un "coupage".

Los vinos elaborados con esta variedad poseen un alto nivel de complejidad de aroma y sabor debido a las grandes influencias compositivas del origen de la uva (Gonzaga *et al.*, 2019). Los aromas primarios de la Cabernet Sauvignon se caracterizan por notas afrutadas (Vilanova *et al.*, 2013) como por ejemplo la grosella, la cereza, la ciruela y los frutos rojos. Si pasan por barrica, aparecen los aromas a tabaco y chocolate. Los vinos jóvenes presentan un aroma intenso que recuerda a la grosella, pimienta verde y en ocasiones, a la menta y aceitunas recién recolectadas. Los vinos son de color rojo oscuro, con cuerpo y un gran aroma persistente. Los vinos jóvenes son astringentes y tánicos (Souza, 2000).

### **3.2.2. Macabeo**

Esta variedad también es conocida con otros nombres como Viura, Alcañol, Blanca de Daroca, Forcalla, Gredelín o Perpiñán.

La primera cita que se hace de ella es de 1859, en "El tratado de las cepas" del Conde Odart, en donde se usa el nombre de Macabeo. Pero la primera referencia española la encontramos en "El libro del viticultor" de Eduardo Abela, publicado en 1885.

El ampelógrafo Luis Hidalgo en su "Tratado de Viticultura" (1993), señala que esta variedad parece ser originaria de España, desde donde se habría propagado al Midi francés. Concretamente tiene



su origen en la cuenca del Ebro, motivo por el cual dicha uva es altamente cultivada en el norte de la península, además de ser una de las variedades más extendidas del país.

Es una cepa de porte erguido, de brotación muy algodonosa, de color verde pálido y con ligera pigmentación rojiza en el extremo del brote.

Las hojas son de tamaño grande, con forma pentagonal y orbicular, con senos laterales marcados, haz arañoso de color verde pálido y envés muy algodonoso. Las hojas adultas a veces poseen un diente en la base de los senos laterales.

El racimo es de tamaño medio, muy compacto y de forma cónica larga. Las bayas son de tamaño mediano, con forma esférica y color amarillo y, en zonas soleadas, de color pardo (Fig. 11).



**Figura 11.** Racimo de uva de la variedad Macabeo.





Es una variedad de un vigor medio-elevado, con fertilidad y productividad elevadas. Se adapta perfectamente a diferentes tipos de terreno y es muy versátil en cuanto a la climatología, aunque debe evitarse su implantación en lugares demasiado húmedos y frescos así como en terrenos demasiado secos.

Es muy sensible a la podredumbre gris y algo sensible a los ácaros, oídio y necrosis bacteriana. También es sensible a *Phaeoacremonium aleophilum*, que es un hongo asociado con la yesca. En cambio, es poco sensible al mildiu.

En cuanto a las características enológicas, la Macabeo es una variedad polivalente, ya que según las condiciones de cultivo, se pueden obtener vinos blancos secos, espumosos e incluso vinos dulces naturales. Los vinos secos y espumosos son ligeros, agradables, equilibrados en azúcar y acidez y de color pálido.

Los vinos espumosos de Macabeo, en general, tienen un color amarillo pálido pajizo con tonos verdes y una intensidad aromática media con notas de fruta blanca y toques florales anisados. La variedad Macabeo es de maduración temprana respecto a otras variedades muy empleadas en la elaboración de cava como Xarel o Parellada. Para este tipo de vinos, se suele vendimiar temprano para mantener un equilibrio en acidez-alcohol, ya que niveles bajos de acidez provocarían falta de brillantez y aromas. Además, la acidez guarda relación directa con la estabilidad microbiológica del vino y, por tanto, con la capacidad de envejecimiento de los vinos espumosos (Buesa *et al.*, 2018). Su sabor es ligeramente astringente y se puede emplear para mejorar el aroma de vinos jóvenes elaborados a partir de Airén, con la que mezcla de forma excelente.



### 3.3. El ozono en disolución acuosa

En los últimos años se está dando una gran importancia a la búsqueda de alternativas y nuevas estrategias ecológicas que puedan reemplazar a los plaguicidas utilizados en viticultura, en especial a aquellas que limiten la infección de la vid por hongos de la madera, y además que sean eficaces, de fácil utilización y económicos. Estudios recientes han revelado que el ozono en disolución acuosa es un candidato prometedor.

A continuación, se verán las características generales del ozono, su acción germicida y las aplicaciones más habituales.

#### 3.3.1. Características generales

Desde el punto de vista químico, el ozono ( $O_3$ ), forma triatómica de oxígeno, es un alótropo de este elemento. Sus principales propiedades físicas se muestran en la Tabla 1 (Guzel-Seydim *et al.*, 2004).

**Tabla 1.** Principales propiedades físicas del ozono.

Propiedades	Valores
Punto de ebullición	$-111,9 \pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$
Punto de fusión	$-192,5 \pm 0,4 \text{ }^\circ\text{C}$
Temperatura crítica	$-12,1 \text{ }^\circ\text{C}$
Presión crítica	54,6 atm

El ozono es altamente inestable y resulta de la reorganización de los átomos cuando las moléculas de oxígeno ( $O_2$ ) están sometidas a un aporte de alta energía. La fuente de esta energía suele ser







electroquímica, radiación ultravioleta o descarga eléctrica (corona), de las cuales la más utilizada para obtener ozono acuoso es la última.

En la descarga en corona, el gas de alimentación, comúnmente aire seco, se pasa entre dos electrodos separados por un material dieléctrico y el ozono producido puede introducirse directamente en forma gaseosa a la atmósfera, o bien en el agua para producir agua ozonizada.

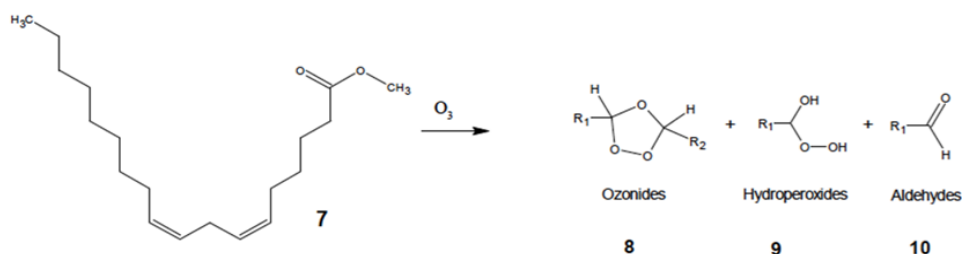
El ozono es un gas azulado a temperatura ambiente, de olor peculiar y con una gran acción oxidante debido a su alto potencial de oxidación-reducción (Tabla 2) (Guzel-Seydim *et al.*, 2004), que le proporciona propiedades germicidas (Kim *et al.*, 1999; Kim and Yousef, 2000). El ozono ejerce su acción atacando las glucoproteínas y/o glucolípidos que forman las membranas celulares del microorganismo, destruyéndolos (Langlais *et al.*, 1991).

**Tabla 2.** Agentes oxidantes y su potencial de oxidación-reducción.

Agentes oxidantes	Potencial de oxidación-reducción (mV)
Flúor	3,06
<b>Ozono</b>	<b>2,07</b>
Permanganato	1,67
Dióxido de cloro	1,50
Ácido hipocloroso	1,49
Gas de cloro	1,36



De hecho, en presencia de compuestos orgánicos insaturados (tal como los lípidos de membrana), el ozono puede dar lugar a reacciones de cicloadición (mecanismo de Criegee) que conducen a la formación de los denominados compuestos ozónidos (Fig. 12).



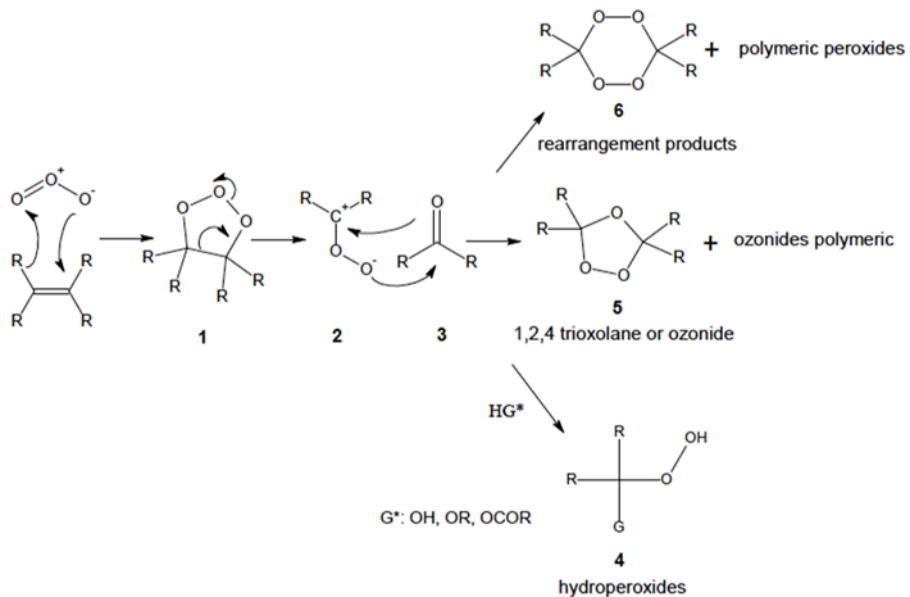
**Figura 12.** Reacción entre un ácido graso insaturado (7) y el ozono (Almeida *et al.*, 2013).

El mecanismo de la ozonólisis (Fig. 13) fue descrito por Criegee en 1975. El primer paso es una cicloadición 1,3 dipolar de ozono a la olefina que conduce a malozónido (1) (intermedio de Criegee), que es muy inestable y se descompone para dar un zwitterion (2) y un compuesto de carbonilo (3). En presencia de un disolvente reactivo, como agua o alcohol, el zwitterion interactúa con el disolvente para dar hidropéroxidos (4) con alto rendimiento, ya que la concentración del disolvente supera con creces la de cualquier otra sustancia con la que el zwitterion pueda reaccionar. Los ozónidos (5), dímeros (6) o peróxidos polímeros pueden ser subproductos. Cuando el disolvente es inerte, el zwitterion debe reaccionar consigo mismo o con un compuesto de carbonilo. La reacción con el compuesto de carbonilo (3) para formar un ozónido monomérico (5) como producto principal, y los ozónidos poliméricos como productos menores, generalmente predominan si (3) es un aldehído (Almeida *et al.*, 2013). El zwitterion (2) se suele dimerizar





para formar (6) o se polimeriza cuando (3) es una cetona, menos susceptible al ataque nucleofílico (Bailey, 1978).



**Figura 13.** Mecanismo de ozonólisis propuesto por Criegee (1975).

El ozono es parcialmente soluble en agua y, como la mayoría de los gases, aumenta su solubilidad conforme disminuye la temperatura. La razón de sus particularidades radica en que las fuerzas de atracción entre átomos (enlace covalente) son muy pequeñas, lo cual hace a la molécula de ozono muy inestable. Sus reacciones cinéticas son muy rápidas, necesitando un tiempo muy reducido de contacto químico para completar las reacciones de oxidación-reducción deseadas. Tiene una propiedad única de autodescomposición, se consume inmediatamente en el proceso, y no deja residuos tóxicos (Langlais *et al.*, 1991).

Su corta vida media (tanto en fase gaseosa como en disolución acuosa) no permite su almacenamiento y distribución como cualquier otro gas industrial, sino que debe generarse in situ, en el ambiente a partir de aire o de oxígeno puro mediante una



descarga eléctrica de alto voltaje (Palou *et al.*, 2004) por lo que no es posible una liberación descontrolada y repentina del mismo. Cuando el ozono se añade al agua para formar una disolución acuosa de ozono, se descompone en una primera etapa de forma instantánea y en una etapa posterior de forma más lenta.

El ozono es más inestable en su forma acuosa que en forma gaseosa, ya que a 20 °C su vida media como ozono gaseoso es de 3 días, pero como ozono acuoso es de 20 minutos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Vida media del ozono en fase gaseosa y acuosa.

Ozono en fase gas		Ozono residual en el agua (pH7)	
Temperatura (°C)	Tiempo de vida media	Temperatura (°C)	Tiempo de vida media
<b>-50</b>	3 meses	<b>15</b>	30 minutos
<b>-35</b>	18 días	<b>20</b>	20 minutos
<b>-25</b>	8 días	<b>25</b>	15 minutos
<b>20</b>	3 días	<b>30</b>	12 minutos
<b>120</b>	1,5 horas	<b>35</b>	8 minutos
<b>250</b>	1,5 segundos	-	-

El ozono no se acumula en el tejido graso ni causa efectos crónicos a largo plazo, por lo que no se considera cancerígeno ni mutagénico (Liangji, 2008). Disuelto en agua resulta también completamente inocuo, dado que su acción sobre la materia orgánica provoca su rápida descomposición. Únicamente en el caso de tratamientos a altas presiones podría producirse la liberación de ozono al aire, apareciendo entonces en la superficie de intercambio agua-aire concentraciones que podrían





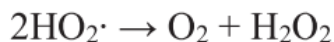
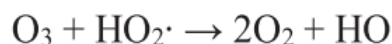
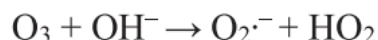
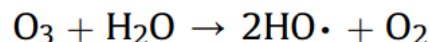
considerarse peligrosas. Ante una sobreexposición, que sería realmente complicado (> 2-3 ppm durante varias horas), se pueden presentar síntomas transitorios como dolor torácico, irritación de garganta, picor de ojos, dolor de cabeza y/o sensibilidad a la luz. Estos síntomas disminuyen en cuestión de minutos después de la exposición y la recuperación completa se obtiene en unas horas. El tratamiento recomendado ante una exposición excesiva es reposo y suministrar oxígeno.

El ozono se produce artificialmente desde finales del siglo XIX mediante los generadores de ozono, proceso que se lleva a cabo en el lugar en donde se realizará la aplicación. El funcionamiento de los generadores es sencillo: pasa un flujo de oxígeno a través de los electrodos, que provoca una corriente de electrones en el espacio delimitado por los mismos. Estos electrones producen la disociación de las moléculas de oxígeno que posteriormente formarán el ozono.

Cuando este gas es inyectado en el agua, puede ejercer su poder oxidante mediante dos mecanismos de acción: oxidación directa de los compuestos mediante el ozono molecular, y oxidación por radicales libres hidroxilo. Estos radicales libres, generados en el agua por combinación con las moléculas de ozono, constituyen unos de los más potentes oxidantes, con un potencial de 2,80 V. No obstante, presentan el inconveniente de que su vida media es del orden de microsegundos, aunque la oxidación que llevan a cabo es mucho más rápida que la oxidación directa por moléculas de ozono (Rodríguez Vidal, 2003).

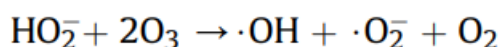
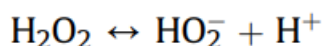
En la Figura 14 se muestran las reacciones del ozono en disolución acuosa para producir radicales altamente reactivos.





**Figura 14.** Reacciones del ozono en disoluciones acuosas (Yang *et al.*, 2020).

Durante el proceso de descomposición, el ozono produce peróxido de hidrógeno, el cual se cree que puede acelerar la descomposición del ozono (Yang *et al.*, 2020). El mecanismo por el cual el peróxido de hidrógeno promueve la generación de radicales hidroxilo, puede deberse a que se disocia en iones  $\text{HO}_2^-$ , que catalizan la formación de radicales hidroxilo, como se muestra en la Figura 15.



**Figura 15.** Mecanismo por el cual el peróxido de hidrógeno puede promover la generación de radicales hidroxilo (Staehelin and Hoigne, 1982).

Dependiendo de las condiciones del medio, puede predominar una u otra vía de oxidación: en condiciones de bajo pH, predomina la oxidación molecular. Bajo condiciones que favorecen la producción de radicales hidroxilos, como es el caso de un elevado pH, exposición a radiación ultravioleta, o por adición de peróxido de hidrógeno, empieza a dominar la oxidación mediante radicales hidroxilo. A pH alto los compuestos orgánicos tienden a disociarse, y la reacción del ozono con los compuestos disociados es más





rápida que la de los originales (por ejemplo, los fenoles y los compuestos de aminas aromáticas), por lo que se descompone más fácilmente generando más radicales hidroxilo (Yang *et al.*, 2020).

Se ha sugerido que el ozono atmosférico se introduce en las plantas a través de los estomas, y en las células mesofílicas se convierte en las llamadas especies reactivas de oxígeno (ROS), tales como el anión superóxido, los radicales hidroxilo y el peróxido de hidrógeno (Mehlhorn *et al.*, 1990). Por lo tanto, ROS podría alterar el metabolismo de las plantas (Pell and Dann, 1991), especialmente a través de la activación del metabolismo secundario como mecanismo de defensa, lo que resulta en una mayor síntesis de fitoquímicos, como polifenoles y compuestos aromáticos. Por ello en contacto con ozono, cultivos tales como la vid, podrían activar su metabolismo secundario, que es el responsable de la síntesis de compuestos relacionados con el color y el aroma de las uvas, lo cual repercutiría en el vino, ya que son los principales factores de calidad del mismo.

### **3.3.2. Acción germicida del ozono**

Es conocida la acción germicida directa del ozono sobre todo tipo de microorganismos desde hace mucho tiempo, tanto en hongos, bacterias, virus e incluso esporas difíciles de erradicar por otros productos (Orta de Velásquez *et al.*, 2008). En el caso particular de los hongos y bacterias causantes de la degradación de los tejidos vegetales, el ozono es también efectivo contra las esporas de aquellos que se propagan y reproducen por esta vía. Las esporas son muy resistentes cuando las condiciones les resultan adversas y pueden permanecer largo tiempo en estado latente,



trasladándose de lugar a través del aire u otros medios, hasta encontrar nuevamente condiciones de temperatura y humedad propicias, en cuyo caso darán lugar a una nueva infección. Es por ello que las infecciones por microorganismos esporulados son extremadamente difíciles de erradicar por otros agentes y, en tales casos, el ozono brinda una protección muy eficaz.

Su efecto bactericida se debe a la destrucción de la estructura de la membrana por medio de la peroxidación de los fosfolípidos y de las lipoproteínas (Langlais *et al.*, 1991). Esta oxidación provoca la rotura de dicha pared, propiciando así que los constituyentes celulares salgan de la célula. Los daños producidos sobre los microorganismos no se limitan a la oxidación de su pared, el ozono también causa daños a los constituyentes de los ácidos nucleicos (ADN y ARN), provocando la ruptura de enlaces carbono-nitrógeno, lo que da lugar a una despolimerización. Los microorganismos, por tanto, no son capaces de desarrollar inmunidad al ozono como hacen frente a otros compuestos.

Las enfermedades de la vid, como el oídio, mildiu y botritis afectan gravemente a la sanidad del viñedo, pero existen productos químicos que han demostrado ser eficaces contra las mismas. A diferencia de ello, las enfermedades de la madera, consideradas de las más destructivas, son una preocupación en todos los países productores de vino, como se ha comentado anteriormente. En la actualidad se está intentando reducir el uso de productos químicos de síntesis, ya que dejan residuos, y se están buscando alternativas ecológicas que sean respetuosas con el medio ambiente, como podría ser el ozono en disolución acuosa.

Los métodos de lucha propuestos actualmente no son curativos (fungicidas, productos químicos, estimuladores biológicos, etc.), por







lo que los que se aplican frecuentemente en el viñedo son meramente preventivos (Florence *et al.*, 2016).

Estudios recientes han revelado que el ozono, en disolución acuosa, es un candidato prometedor para limitar la infección de la vid por *Phaeoacremonium aleophilum*, que es un hongo asociado con la yesca (Pierron *et al.*, 2015). Por otro lado, Raio *et al.* (2016) y Modesti *et al.* (2019) demostraron que su aplicación en hojas y racimos de vid redujo las poblaciones de bacterias y hongos de manera similar a los tratamientos químicos, pero sin dejar residuos, por lo que además podía considerarse un producto ecológico.

Además, el ozono en disolución acuosa mostró un efecto positivo sobre las enfermedades de la madera en vides de diferentes cultivares, pero en mayor medida en Cabernet Sauvignon, permitiendo reducir el uso de plaguicidas tradicionales (Serrano de la Hoz *et al.*, 2018; Tolosa *et al.*, 2018).

### 3.3.3. Aplicaciones más habituales del ozono

Como ya se ha indicado, el ozono es un agente oxidante fuerte y natural, con una larga historia de uso en la desinfección de aguas municipales, agua embotellada, piscinas, etc. De los oxidantes más utilizados en el tratamiento de aguas, los radicales libres de hidroxilo y el ozono tienen el potencial más alto (son los más oxidantes). Ello explica la gran eficacia del ozono como desinfectante, así como su capacidad para oxidar materia orgánica del agua, eliminar olores y sabores desagradables, y degradar compuestos químicos de diversa naturaleza (Cosemar Ozono, 2020). Es un potente agente germicida capaz de eliminar bacterias, virus, hongos y también quistes parásitos, todo ello sin provocar la formación de compuestos tóxicos ni dejar residuos, puesto que se descompone



espontáneamente en oxígeno, siendo este aspecto una gran ventaja frente a otros desinfectantes comúnmente empleados para estos fines.

Por otro lado, el ozono también puede destruir, sin dejar residuos tóxicos, subproductos del cloro, plaguicidas, agrotóxicos y compuestos orgánicos tóxicos del agua (Langlais *et al.*, 1991). Es decir, destruye de forma eficaz las emanaciones de gases amoniacales, etileno y otros producidos por productos fitosanitarios y fertilizantes utilizados en agricultura. Dependiendo de la fuente del agua, aplicaciones de ozono acuoso entre 0,5 y 5 ppm en menos de 5 minutos de tiempo de contacto son suficientes.

Debido a su efecto desodorizante y bactericida, el ozono se utiliza, también, para renovar el aire en ambientes confinados. Además, se emplea en el tratamiento del aire y/o del agua de baños, vestuarios, aseos, gimnasios, salas de musculación, piscinas públicas y particulares, hoteles, comedores de hostelería, consultas y salas médicas, guarderías, colegios, geriátricos y piscifactorías industriales, entre otras. También se utiliza en medicina, tratamientos odontológicos, estéticos, etc.

#### **3.3.4. Aplicaciones del ozono en el sector agroalimentario**

En estas últimas décadas la aplicación del ozono se está extendiendo en distintos campos, incluyendo el agroalimentario. Existen varios estudios que respaldan el empleo de ozono en la industria agroalimentaria y en la agricultura.

Así, en la industria panadera y de repostería aplican al agua de amasado ozono, obteniendo agua ozonizada que al mezclarla con la harina actúa sobre ésta destruyendo los mohos y esporas existentes en ellas.





Por otro lado, la tecnología tradicional utilizaba agua con cloro, normalmente, como agente desinfectante para lavar frutas y vegetales frescos, pero tenía un efecto limitado en eliminar bacterias en la superficie de las frutas y vegetales. Además, las comunidades ambientales y de salud expresaron su preocupación por los subproductos residuales del cloro. Actualmente se emplea el ozono, ya que éste elimina bacterias como *Escherichia coli*, *Listeria* y otros patógenos de alimentos mucho más rápido que los desinfectantes tradicionalmente usados, como el cloro y no produce residuos químicos. El crecimiento del consumo de frutas y vegetales frescos obligó a la industria a buscar métodos más eficaces para evitar el deterioro por microorganismos, y el ozono es una alternativa eficiente (Liangji, 2008).

La adición de ozono a la atmósfera de frigoconservación está mereciendo una gran atención en la literatura científica, proponiéndose para reducir la incidencia de podredumbre de muy distintos frutos durante su conservación. Su poder antimicrobiano es capaz de reducir el deterioro postcosecha de productos frescos al inhibir directamente el patógeno o al inducir resistencia a la descomposición (Bellincontro *et al.*, 2017; Coelho *et al.*, 2015).

El uso del ozono como un desinfectante efectivo a nivel mundial empezó en Francia en 1902, lo cual fue documentado en un informe del Panel de Expertos titulado "Evaluación de la historia y la seguridad del ozono en el procesamiento de alimentos para consumo humano" (Graham, 1997). Desde 1997, el ozono es clasificado como producto GRAS (generalmente reconocido como seguro) y además, desde 2001, la aplicación directa de ozono como aditivo alimentario para el tratamiento, almacenamiento y procesamiento de alimentos en fase gaseosa y acuosa ha sido



aprobada por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA, 2001).

En las bodegas, el ozono se ha empleado para reducir el deterioro de la microbiota en las uvas y para desinfectar tanques, barriles y botellas. Los usos más recientes del ozono gaseoso están relacionados con las uvas después de haber sido recolectadas. Así, Río Segade *et al.* (2019) evaluaron el efecto de la aplicación de ozono durante la deshidratación de las uvas (10 y 20% de pérdida de peso) sobre el contenido de compuestos fenólicos y su extractabilidad durante la maceración en la elaboración de vinos dulces. Los resultados no fueron concluyentes ya que el efecto del ozono fue diferente según el perfil y el contenido de antocianinas y flavanoles de la uva.

Bellincontro *et al.* (2017) aplicaron ozono postcosecha en uvas de la variedad Petit Verdot, para producir vinos sin adición de sulfitos, y dicho tratamiento aumentó el sabor afrutado. El ozono se ha considerado negativo para el aroma de los alimentos, lo cual es cierto en el caso de los alimentos procesados. Sin embargo, tal como muestra dicho estudio, si consideramos que las células vivas de las plantas pueden responder a los factores estresantes, el ozono, manejado adecuadamente, puede tener un efecto positivo en el aroma.

Paissoni *et al.* (2017) estudiaron los posibles efectos del tratamiento con ozono postcosecha, sobre la composición fenólica y extractabilidad de uvas de las variedades Nebbiolo y Barbera. Se observó un aumento de la extractabilidad en ambas variedades por efecto del ozono, por lo que concluyeron que puede usarse como desinfectante en el proceso de elaboración de vino, ya que no afecta negativamente a las uvas.





Como se ha visto anteriormente, el efecto de los tratamientos de ozono en uvas postcosecha ha sido ampliamente estudiado. Sin embargo, es escasa la información sobre el efecto de los tratamientos de agua ozonizada en la vid y en la uva antes de ser vendimiada, por lo que poco se conoce sobre cómo afectan a la calidad de la uva y de los vinos resultantes.

Los primeros estudios al respecto fueron los de Campayo *et al.* (2019-2020), en los que se pulverizaron cepas de la variedad Bobal con una disolución acuosa de ozono, y se estudió el efecto producido en la calidad de la uva y el vino. Los autores concluyeron que la dosis de ozono recibida por las plantas es el factor más influyente.

### **3.4. Técnicas para la aplicación de disoluciones acuosas de ozono en viña**

Las principales aplicaciones de agua ozonizada en agricultura son las pulverizaciones foliares y los tratamientos conjuntos con el agua de riego (riego por goteo). A continuación, se verán en detalle estas técnicas así como la más novedosa de ellas, que consiste en la inyección de la disolución en el tronco, también denominada endoterapia.

#### **3.4.1. Pulverización foliar o a la parte aérea**

La forma habitual de aplicar productos fitosanitarios es por pulverización sobre las hojas de la planta. Sin embargo, es conocido que la eficacia de dicho tratamiento no es la que cabría esperar, ya que una gran parte de este se pierde y no llega a los cultivos, repercutiendo en una mayor contaminación ambiental y una importante pérdida económica para el agricultor. Así, Bonicelli *et al.*



(2010) mostraron que las aplicaciones foliares condujeron a una pérdida de producto, de manera que entre el 10 y el 40% del producto se depositó en la tierra y entre un 30 y 40% en el aire. Por tanto, se entiende que últimamente, en donde la concienciación por la agricultura sostenible ha aumentado, haya una gran preocupación por una aplicación mejor y más eficaz de los productos fitosanitarios.

La pulverización tiene como objetivo depositar las gotas del producto de forma que cubran estratégicamente los puntos de infección, ya sean potenciales o establecidos, de manera que puedan ejercer su actividad protectora o curativa. Debido a su eficacia y utilidad, existe una gran variedad de equipos pulverizadores.

No todos los sistemas se adaptan de la misma forma a los condicionantes del cultivo. Existe una clara diferencia (medida en términos de homogeneidad de deposición, recubrimiento y pérdidas de producto) entre los pulverizadores hidroneumáticos convencionales (con o sin deflectores), pulverizadores hidroneumáticos con salidas individuales orientables, o pulverizadores neumáticos (Gil *et al.*, 1998).

En los pulverizadores hidráulicos, el producto es impulsado por una bomba hidráulica a una presión determinada. El paso del líquido a presión a través de la boquilla produce gotas de diferentes tamaños que varía en función de la presión de trabajo y del tipo de boquilla utilizada.

Los pulverizadores hidroneumáticos o atomizadores son los más utilizados en aplicaciones sobre cultivos arbóreos, ya que se consigue la máxima penetración del producto. Estos generan una nube de gotas finas, previa dilución de la materia activa en agua,





mediante pulverización hidráulica utilizando boquillas que colocan las gotas sobre una corriente de aire generada por un ventilador. Modificando el tamaño de las boquillas (caudal) y la presión de trabajo, se ajusta el volumen de aplicación y el tamaño medio de las gotas pulverizadas. Así, mientras que los pulverizadores hidroneumáticos convencionales presentan deficiencias a la hora de conducir el líquido al objetivo, no permiten importantes reducciones del volumen de aplicación y no presentan gran adaptabilidad a los tratamientos localizados. Los pulverizadores hidroneumáticos con salidas individuales orientables han mostrado una mejor adaptación a los condicionantes de la viña, posibilitando la reducción de volúmenes y mostrándose como una de las mejores opciones, tanto para la localización del producto como para la reducción de pérdidas en el suelo.

Los pulverizadores neumáticos o nebulizadores son máquinas que aprovechan el efecto Venturi, producido por el aire que un potente ventilador de tipo centrífugo envía con velocidad próxima a 400 Km/h, por una o varias tuberías, en las que en un estrechamiento se coloca un tubo surtidor, conectado al depósito de líquido fitosanitario, por el cual sale, y al chocar con la corriente de aire, es finamente pulverizado. El tamaño de las gotas producidas permite que el volumen necesario por hectárea, para realizar una buena cobertura de las plantas, sea muy reducido. Sus principales ventajas radican en su gran capacidad para que las gotas alcancen su objetivo, en las reducidas pérdidas de producto y en el bajo volumen de líquido fitosanitario por hectárea, además de la penetración que se consigue en determinadas zonas del cultivo como puede ser el racimo.



Entre los últimos equipos propuestos para aplicaciones aéreas destacan aquellos que disponen de un rociador de túnel con circulación de aire interior, que permiten la recuperación de los fitosanitarios no depositados sobre la vegetación y que estos vuelvan a ser usados. Además, esta recuperación evita la dispersión de los tratamientos y mejora la distribución del producto, haciendo que sea homogénea y con un mojado uniforme y bien dirigido, mejorando la penetración del producto en las zonas profundas de la vegetación.

### **3.4.2. Riego por goteo**

Es el sistema de riego más extendido en viñedos, ya que es el que proporciona una mayor eficiencia en el uso del agua. Este sistema, además, no moja la parte aérea de la planta y permite la aplicación de agroquímicos de forma localizada en las raíces.

La selección del tipo de gotero, la separación entre goteros y las necesidades de filtración, deben ser evaluadas detenidamente durante el diseño de la instalación. La separación de los goteros en función del tipo de suelo es un factor muy importante. En suelos arenosos es recomendable distancias de 50 cm entre goteros, mientras que en terrenos arcillosos las distancias pueden ser de hasta 1 metro.

Existen varios tipos de goteros para riego por goteo: gotero turbulento, autocompensante, antidrenante y antisucción. El gotero turbulento no es autocompensante, por lo que el caudal de emisión va a depender de la presión de trabajo. El gotero autocompensante incorpora una membrana de goma que contrarresta el efecto de los cambios de presión lo que permite obtener un caudal constante dentro de un rango de presiones de







trabajo. El gotero antidrenante cierra la salida de agua cuando la presión de la red baja de un determinado valor, para impedir el vaciado de la red de riego. Por último, el gotero antisucción se utiliza en el riego subterráneo. Cuando el gotero está enterrado, se produce un efecto de succión que puede hacer que entre tierra en el gotero y, por tanto, obstruirlo y este tipo de gotero impide esta situación.

La tubería de goteo puede ser instalada en viña de tres formas diferentes. El sistema más habitual es la instalación superficial del lateral portagoteros a pie de las cepas. Este sistema puede utilizarse tanto en cultivo en vaso como en espaldera. La segunda disposición de la tubería portagoteros sería sujeta a los alambres inferiores de la espaldera, y el tercer tipo de instalación es lo que se denomina riego por goteo subterráneo.

La cantidad de agua que necesita un viñedo depende de una serie de factores como la variedad de uva, tipo de suelo, ya que un suelo arcilloso almacena más agua que uno arenoso, evaporación y transpiración, densidad de plantación, fertilización y sistema de conducción del viñedo.

La aplicación de agua ozonizada a través del sistema de riego presenta una serie de ventajas, como puede ser su alta eficiencia de aplicación ya que no se pierde agua de riego por escorrentías. Al administrarse el agua gota a gota, esta no puede acumularse en la superficie y por lo tanto, a la planta le da tiempo a absorberla. Por otro lado, el viento no afecta a la distribución y las pérdidas por evaporación son mínimas.

El uso de agua ozonizada en el riego consigue, además de proporcionar un agua completamente libre de microorganismos potencialmente peligrosos para las plantas, descontaminar el suelo,



mejorando notablemente sus propiedades físico-químicas, con lo que los transforma en suelos más ricos en nutrientes, de los que la planta obtiene con mayor facilidad los elementos que necesita para un crecimiento vigoroso y sano, que redundan en una mayor resistencia a los ataques fúngicos (Cosemar Ozono, 2020). También puede lograr una mayor productividad aportando a la planta una mayor resistencia a plagas y enfermedades, y por tanto una menor necesidad de emplear plaguicidas.

El ozono disuelto en agua, además, actúa como bioestimulante para las plantas, debido a que corrige el contenido mineral, transforma la materia orgánica presente en el agua y aporta oxígeno a la raíz de las plantas. El riego con agua ozonizada elimina también los posibles plaguicidas que pudiesen existir en el agua de riego agrícola, así como detergentes y otros compuestos orgánicos.

### **3.4.3. Endoterapia**

La inyección de productos químicos en los troncos de los árboles tiene una larga historia con resultados dispares. En el siglo XV, Leonardo da Vinci fue el primero en intentarlo. Para ello, introdujo arsénico en el tronco de manzanos, a través de agujeros, para envenenar la fruta (Roach, 1939; Stoddart and Dimond, 1949).

La endoterapia vegetal es un método terapéutico de tratamientos fitosanitarios que consiste en la inyección del producto fitosanitario y/o abono directamente en el sistema vascular de la planta. Destaca, respecto a los tradicionales tratamientos aéreos, por la ausencia de nebulización o atomización de productos químicos en el ambiente, suelos y aguas, así como por ser totalmente inocua para la salud de las personas y animales, pudiéndose utilizar a cualquier hora del día.





La endoterapia se basa en la capacidad de flujo de savia que hay en el interior de los tejidos vasculares. En plantas leñosas, la savia del xilema se mueve en flujo ascendente a través de los vasos, debido al gradiente decreciente del potencial hídrico desde el agua subterránea hasta las hojas. Los movimientos de la savia en los vasos cumplen el principio de Bernoulli de la dinámica de fluidos, por lo que la introducción de un objeto como un taladro en el tronco, causa una reducción de la sección transversal de los vasos que conduce a un efecto Venturi en el que se produce un aumento de la velocidad de la savia, mientras que su presión disminuye (Montecchio, 2013).

El flujo de savia viene determinado en función de dos parámetros: la transpiración y la capacidad de intercambio osmótico en las raíces; por lo tanto, cuando se tienen en cuenta estas dos variables en el funcionamiento, el tratamiento puede ser más eficaz.

La endoterapia de productos fitosanitarios presenta una serie de ventajas frente a otros tipos de aplicación, como una eficacia prolongada de varios meses (evitando así posibles resistencias al producto), un consumo escaso de agua, no tiene impacto ambiental, su actuación es respetuosa con los insectos fitoseidos, y su uso puede ser extendido a cualquier tipo de árbol, con unos tiempos de aplicación que oscilan entre los 30 segundos hasta los 10 minutos, ya sea contra plagas o enfermedades criptogámicas (Tecnoendoterapia, 2020).

Existen dos procesos de inyección en función de la forma en la que se realiza el agujero. Por un lado, los métodos que implican perforar el tronco antes de usar el dispositivo de inyección, y por otro lado las técnicas basadas en agujas sin perforación previa



(Berger and Laurent, 2019). La mayoría de las técnicas se basan en la perforación del tronco, aunque esta puede causar daños en los tejidos debido a la velocidad de perforación y por lo tanto, se puede reducir la absorción (Montecchio, 2013).

Para prevenir la posible lesión del árbol, se han desarrollado varios sistemas basados en agujas como BITE (Blade for Infusion in Trees), Wedgle Direct-Inject, Endokit, etc. Una vez hecho el orificio, el producto fitosanitario puede ser introducido en el tronco de diferentes maneras. Lo más habitual consiste en una cápsula con una cánula o una jeringa que se introduce en el orificio para inyectar la solución. Otros dispositivos son tubos con una bomba o un taladro acoplado a un inyector. Los métodos de inyección también difieren en el diámetro del orificio, que oscila entre 2 mm y 9,5 mm. La profundidad de la inyección varía entre los métodos ya que se utilizan diferentes tamaños de aguja que se adaptan a la morfología de los diferentes árboles. La solución inyectada se desplaza dentro del tronco por absorción natural o es forzada bajo presión. Los más utilizados son los dispositivos de alta presión que suelen oscilar entre 207 kPa y 450 kPa (Berger and Laurent, 2019).

Son varios los factores que afectan a la eficacia de la inyección, como pueden ser las propiedades del producto fitosanitario, la fisiología y anatomía del árbol, el tipo de plaga, el método utilizado o las condiciones ambientales. Tanto los dispositivos como las técnicas de aplicación influyen en la absorción debido a la perforación, profundidad, presión de inyección, diámetro del agujero o la forma de la aguja o jeringa (Hu and Wang, 2016). En la actualidad, se están intentando desarrollar técnicas que hagan un corte limpio, con un menor diámetro y un agujero menos profundo,





ya que cuanto menor sea el diámetro del agujero, la herida se cura más rápidamente (Perry *et al.*, 1991).

El tiempo de inyección va a estar influenciado por la presión y por el volumen del compuesto inyectado. Pequeños volúmenes y alta presión reducen el tiempo de suministro del producto mediante inyección en el tronco. Una mayor presión permite inyectar un mayor volumen de producto, pero esto puede causar lesiones en la corteza ya que esta puede partirse (Montecchio, 2013). Además, puede producirse cavitación si el aire entra en el orificio de inyección y por lo tanto, la columna de agua se interrumpiría y la absorción se detendría (Perry *et al.*, 1991).

Recientemente, ha aumentado el interés por la endoterapia como alternativa a la pulverización en los huertos y en los paisajes donde otros métodos no pueden aplicarse o son ineficaces, y para limitar la exposición no deseada (Acimovic *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha estudiado la inyección en el tronco para controlar el fuego bacteriano (*Erwinia amylovora* Burrill) en manzanos y el mildiu (*Plasmopora viticola* Berk. and Curt.) en las vides (Acimovic *et al.*, 2014; Düker and Kubiak, 2009).

La inyección en el tronco de antibióticos parece ser el único método eficaz disponible para controlar el huanglongbing o enverdecimiento de los cítricos, causado por el patógeno sistémico *Candidatus liberibacter* Garnier (Hu and Wang, 2016; Hu *et al.*, 2017; Puttamuk *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2016).

Del Frari *et al.* (2018) hicieron un ensayo en viña en el que aplicaron mediante endoterapia, cuatro productos químicos para combatir los patógenos *Phaemoniella chlamydospora* y *Phaeoacremonium mínimum* asociados a la yesca. En dicho estudio concluyeron que el uso de endoterapia, en las primeras etapas de



infección de cepas jóvenes, puede ser una estrategia de control eficaz especialmente contra *Phaemoniella chlamydospora*.

### **3.5. Calidad de la uva y de vino**

Cualquier tratamiento que se realice en el viñedo puede afectar a la composición de la uva y, por lo tanto, a la calidad final del vino. La calidad de un vino se aprecia a nivel sensorial, pero su composición y el equilibrio entre todos sus constituyentes son los que verdaderamente van a condicionar dicha calidad.

Son varios los parámetros que deciden la aptitud enológica de la uva. En el caso del vino, su calidad dependerá de los componentes de la uva, de cómo se hayan extraído en la vinificación y de la generación e integración de nuevos compuestos con los procedentes de la uva, en el proceso de fermentación.

A continuación, se tratan de forma conjunta los principales parámetros que van a decidir la calidad de la uva y del vino.

#### **3.5.1. Parámetros enológicos convencionales y cromáticos**

##### **3.5.1.1. °Baumé**

Los azúcares más abundantes a lo largo de la maduración de la uva son la glucosa y la fructosa, los cuales se localizan en la pulpa. Los °Baumé (Bé) proporcionan una estimación del contenido en sólidos solubles del jugo de la uva en base al índice de refracción, entre los cuales abundan la glucosa y la fructosa. A lo largo de la maduración, se considera que el contenido en azúcares aumenta, hasta llegar a un límite asintótico. Glucosa y fructosa, son transformados en alcohol durante la fermentación alcohólica del mosto por medio de las levaduras. Por ello, cuanto mayor sean los °Bé del mosto, mayor graduación alcohólica tendrá el vino.





Las altas temperaturas generalmente conducen a una aceleración de la acumulación de azúcares en las bayas, excepto en regiones extremadamente cálidas, donde las temperaturas exceden el óptimo fotosintético durante una parte considerable del período de crecimiento. Además, con el aumento de las temperaturas es más fácil obtener vinos con un alto contenido de alcohol (Martínez de Toda, 2019). Este elevado contenido ha sido uno de los objetivos tradicionales de la viticultura, pero, hoy en día, existe una nueva tendencia de los consumidores ya que prefieren vinos con un contenido alcohólico moderado (Mira de Orduña, 2010).

En la actualidad, muchas cooperativas pagan la uva al viticultor según los °Bé de un kilo de uva (kilogrado), que permiten estimar el grado alcohólico probable del vino. Por ello, se paga más al viticultor cuanto mayor es la producción y el contenido en azúcar de la uva. Sin embargo, producción y calidad de uva son dos parámetros opuestos (Olmeda and Bernabéu, 2002). Además, en tal valoración, no se tienen en cuenta otros parámetros de la uva que están relacionados con la calidad del vino, tales como el color y el aroma.

### **3.5.1.2. Acidez y pH**

La acidez de la uva se debe a la presencia de los ácidos tartárico, málico, cítrico, siendo el primero el más abundante y característico de la uva, y todos ellos se localizan en la pulpa. El seguimiento de la acidez durante la maduración proporciona información sobre la fecha de vendimia más adecuada, e informa de la adaptación de una variedad a unas condiciones edafoclimáticas determinadas. Así, en los climas cálidos las uvas



poseen una baja acidez en comparación con las uvas cultivadas en climas fríos. La ratio entre °Bé y acidez total es un criterio clásico utilizado para elegir la fecha de cosecha cuando las uvas están en la madurez tecnológica óptima. Se estima que las ratios alrededor de 4 son las más adecuadas (Hidalgo, 2011) porque las uvas muestran el mejor equilibrio entre azúcar y acidez.

En el vino, la acidez se debe fundamentalmente a los tres ácidos provenientes de la uva y a los ácidos succínico, láctico y acético, generados durante el proceso de la fermentación. La adecuada acidez total del vino garantiza la preservación, conservación y estabilidad de su color, aroma y sabor.

Para la medida de la acidez se tiene en cuenta el pH, que nos informa sobre la acidez real de la muestra expresada como la concentración de iones hidrógeno libres en la disolución. Por su parte, la acidez total es la suma de los ácidos valorables del mosto o del vino cuando se lleva a pH 7 añadiendo una disolución alcalina valorada (OIV, 2014). Esta acidez total se expresa como gramos de ácido tartárico por litro de mosto, por ser éste el ácido mayoritario tanto del mosto como del vino.

### **3.5.1.3. Color**

En la elaboración del vino tinto, las uvas son estrujadas y el mosto es macerado durante el periodo de fermentación y en muchos casos, durante un periodo de maceración previo a la fermentación, junto con los hollejos. La mayor parte de la materia colorante se encuentra en los hollejos de las uvas y la maceración y fermentación alcohólica favorecen su extracción. Esta liberación es mayor si se utilizan técnicas de remontado o bazuqueo, durante estos periodos.







Entre los factores que influyen en la composición de la uva, se encuentran fundamentalmente las condiciones medioambientales, las prácticas culturales llevadas a cabo en el viñedo o la variedad de uva (Carbonell and Martínez, 2013).

El color del vino tinto es uno de los aspectos sensoriales más importantes, no sólo por ser la primera imagen de un vino, sino porque es un indicador de otros aspectos relacionados con su calidad. El aspecto, tonalidad e intensidad de un vino ofrecen información sobre su concentración tánica, su edad, su estado de conservación e incluso de algunos defectos que después se notarán al beberlo (Zamora, 2003).

El color de los vinos tintos jóvenes está determinado principalmente por los pigmentos provenientes de las uvas, entre los cuales los antocianos son los principales. Estos compuestos son muy reactivos y desde las primeras etapas de vinificación, interaccionan con otros compuestos.

Entre los factores que influyen en el color de los vinos, se encuentran los que influyen sobre la composición de la uva y los que lo hacen en los procesos de vinificación y conservación de los vinos.

La mayoría de los métodos de medida del color están basados en la determinación espectrofotométrica de la absorbancia en el ultravioleta visible (Glories, 1984; Ribéreau-Gayon, 1964; Sudraud, 1958). En 1976 la "Comision Internationale de L'Eclairage" (CIE) recomendó la utilización de otro sistema para la expresión del color, el espacio CIELAB. Los parámetros CIELAB también indican cómo éste es percibido sensorialmente por parte del consumidor, es decir, complementan los índices cromáticos y se ha demostrado



que están correlacionados con el análisis sensorial (Monagas *et al.*, 2005).

### **3.5.2. Composición fenólica**

#### **3.5.2.1. Madurez fenólica de la uva**

El concepto de madurez fenólica es importante sobre todo cuando hablamos de uvas y vinos tintos, pudiéndose interpretar no sólo como una forma de medir la calidad de las uvas, sino también como forma de evaluación de la adaptación de una variedad a unas condiciones edafoclimáticas. La madurez fenólica es un concepto que abarca no sólo la concentración de compuestos fenólicos presentes en la uva tinta, en particular de antocianos y taninos, sino también su estructura y capacidad de ser extraídos durante la vinificación. Diversos autores la definen como la madurez óptima de las uvas para la elaboración de vinos tintos de alta calidad (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1999; Zamora, 2003), es decir, como aquella que presenta la más adecuada y equilibrada concentración de antocianos y taninos. La determinación de la madurez fenólica es cada vez más útil para elegir la fecha de vendimia adecuada, en la que no sólo se tengan presentes parámetros tradicionales ligados al °Bé y/o a la acidez.

La principal dificultad para la determinación de este parámetro radica en que los compuestos que se pretenden determinar se encuentran en la piel y deben ser extraídos al medio, intentando reproducir de la forma más representativa posible lo que ocurriría durante la etapa de maceración-fermentación de una vinificación. Existen varios métodos para medir la madurez fenólica, siendo el método propuesto por Glories (Saint-Cricq *et al.*, 1998) el que parece dar resultados más completos, ya que realiza la extracción diferenciada de los compuestos fenólicos fácilmente extraíbles (con





solución tampón pH 3,2) y los compuestos fenólicos difícilmente extraíbles (con solución tampón pH 1), permitiendo así calcular el contenido polifenólico total, el contenido en antocianos y su aptitud a la extracción. Kontoudakis *et al.* (2010) han demostrado el interés de este método para predecir el color del vino.

A lo largo de la maduración de la uva, el contenido de antocianos va aumentando hasta alcanzar un máximo después del cual se observa una disminución de dichos compuestos (Zamora, 2003). En cuanto a los taninos, la evolución con la maduración es diferente según procedan de la semilla o del hollejo. La concentración de los primeros sigue una tendencia descendente, mientras que en los segundos es ascendente (Zamora, 2003). No sólo la evolución de la concentración es diferente a la hora de hablar de los taninos, sino que la astringencia también es diferente. A medida que va avanzando la maduración, la astringencia de los taninos del hollejo disminuyen mientras que los que proceden de la semilla sigue siendo alta (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006).

La cara interna del hollejo de las uvas está recubierta de una capa de células de la pulpa de grosor variable que impide que se produzca la solubilización de los antocianos cuando es muy gruesa. Al madurar la uva, esta capa va disminuyendo y se favorece la solubilización (Zamora, 2003). Por lo tanto, el concepto de madurez fenólica es importante sobre todo cuando hablamos de uvas y vinos tintos, pudiéndose interpretar no sólo como una forma de medir la calidad de las uvas, sino también como forma de evaluación de la adaptación de una variedad a unas condiciones edafoclimáticas.

Las características estructurales de los compuestos fenólicos de la uva y del vino se describen en el apartado siguiente.



### 3.5.2.2. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos, o polifenoles, tienen una gran importancia en enología. Es relevante el papel que desempeñan en las características y la calidad de los vinos al ser los principales responsables del color, la astringencia, el cuerpo y de parte del sabor y aroma de los vinos. Como ya hemos visto, estos compuestos proceden de las partes sólidas de la uva y sus propiedades antioxidantes ejercen un efecto positivo sobre el vino alargando su estabilidad. Su presencia en el vino depende tanto de las variedades viníferas empleadas en su elaboración, de las condiciones edafoclimáticas y culturales en que estas hayan sido cultivadas, y del proceso de vinificación. De un modo muy general, el contenido global de compuestos fenólicos se estima que puede oscilar entre 50 y 350 mg/L en vinos blancos y diez veces más en tintos (Sarni-Manchado and Cheynier, 2006).

En la Tabla 4 se muestra una clasificación de los compuestos fenólicos de todas las *Vitis viníferas* fundamentada en su estructura química.

**Tabla 4.** Clasificación de los compuestos fenólicos.

Compuestos no flavonoides	Compuestos flavonoides
Ácidos benzoicos	Antocianos
Ácidos cinámicos	Flavanoles y taninos
Estilbenos	Flavonoles

Las diferencias entre ambos grupos principalmente consisten en la estructura química básica, ya que los flavonoides están formados por dos anillos fenólicos unidos por una cadena de tres átomos de





carbono, mientras que los no flavonoides tienen un único anillo. A continuación, se detallan los diferentes grupos.

### **3.5.2.2.1. Compuestos no flavonoides**

#### **3.5.2.2.1.1. Ácidos fenólicos**

El grupo de los ácidos fenólicos está formado principalmente, por ácidos benzoicos (gálico, siríngico, vainílico, etc.) y ácidos cinámicos (cumárico, caféico, ferúlico, etc.). Influyen en las características organolépticas de los vinos (astringencia y amargor) y en los procesos oxidativos posteriores a la fermentación, además pueden actuar como copigmentos.

Los ácidos benzoicos, principalmente se encuentran en los hollejos, en cambio los ácidos cinámicos se encuentran tanto en los hollejos como en las partes sólidas de las uvas de variedades blancas y tintas. Antes de la fermentación, la proporción de ácidos esterificados es muy superior a la de ácidos libres, aunque la liberación de ácidos fenólicos por efecto de las levaduras no debe atribuirse solamente a la rotura de uniones éster, sino que los microorganismos llevan a cabo una degradación metabólica de flavonoides a ácidos fenólicos y de éstos a ácidos benzoicos, aldehídos y alcoholes.

Los ácidos hidroxicinámicos son los compuestos fenólicos más característicos de los vinos blancos y los principales compuestos no flavonoides de vinos tintos (Garrido and Borges, 2013). A pesar de que los vinos blancos contienen una baja concentración de compuestos fenólicos comparados con los vinos tintos, estos contienen comparativamente una concentración alta de ácidos hidroxicinámicos. Los ácidos hidroxicinámicos son por tanto la clase



predominante de fenoles en los vinos blancos y la clase principal de fenoles no flavonoides en vinos tintos (Vanzo *et al.*, 2007).

### 3.5.2.2.1.2. Estilbenos

Están formados por dos anillos aromáticos (bencenos) separados entre sí. Los estilbenos pueden estar libres o formando heterósidos a veces poliméricos (Bruneton, 1993).

El Resveratrol es el estilbeno más representativo. Recientemente, el resveratrol ha recibido mucha atención por sus propiedades biológicas específicas y sus efectos terapéuticos potenciales. El vino es la fuente dietética principal de resveratrol. Este compuesto se produce en las hojas y en la piel de las uvas en respuesta a una infección o a un estrés inducido por herbicidas, fungicidas o luz ultravioleta. El resveratrol se encuentra como aglicón (*trans* y *cis*-resveratrol), o como glucósido (*trans* y *cis*-piceído) y en formas dimericas (Baur and Sinclair, 2006).

Se sabe que el contenido de resveratrol en la uva disminuye considerablemente durante la maduración. En el vino, el resveratrol está presente sólo a nivel de trazas, su concentración exacta dependerá altamente de la técnica enológica utilizada en su vinificación (Garrido and Borges, 2013).

Durante el proceso de vinificación la molécula de resveratrol se isomeriza a *trans*-resveratrol y por ello este isómero se encuentra en menor concentración en la uva. De acuerdo con el tipo de vino, la forma *trans* del resveratrol (aglicona o glucósido) es más abundante que la forma *cis* (Neveu *et al.*, 2010).



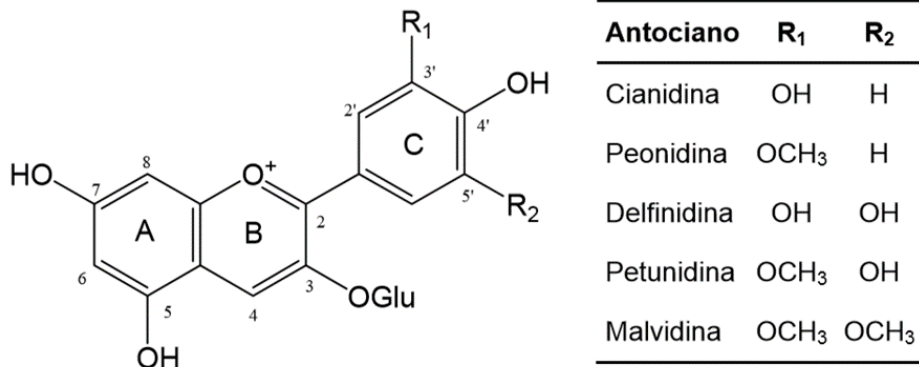


### 3.5.2.2.2. Compuestos flavonoides

#### 3.5.2.2.2.1. Antocianos

Son los pigmentos responsables del color púrpura de la piel de las uvas tintas y del color del vino tinto, por lo que se localizan en la piel de la baya (Barceló *et al.*, 1994), aunque excepcionalmente también pueden encontrarse en la pulpa de las variedades tintoreras (Castillo-Muñoz *et al.*, 2009), siendo éstas muy ricas en color. Su estructura se caracteriza por tener un esqueleto básico de quince átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) de tipo 2-fenil benzopirona. Podrían definirse como sales de flavilio (de núcleo favilio polihidroxilado y/o metoxilado) unidos por un enlace glucosídico a una molécula de azúcar. Los antocianos se llaman también antocianinas y sus derivados privados del azúcar se denominan antocianidinas.

En *Vitis vinífera* se distinguen cinco tipos de moléculas de antocianinas, dependiendo del número de hidroxilos (OH) y grupos metoxilo (OCH<sub>3</sub>) en el anillo B (Fig. 16). Existe una mayor diversidad de estos compuestos debido a la acilación de los azúcares con los ácidos acético, *p*-cumárico y caféico.



**Figura 16.** Estructura de los principales antocianos encontrados en la uva.



Hay factores que pueden incidir en el nivel de antocianos en uvas como son la temperatura, las condiciones de insolación y del terreno (Arozarena *et al.*, 2002; Esteban *et al.*, 2001; Larice *et al.*, 1989) y las prácticas vitícolas: el sistema de conducción, la fertilización o el riego (Castia *et al.*, 1992; De la Hera *et al.*, 2005; Keller and Hrazdina, 1998; Sipiara and Gutiérrez Granda, 1998).

Una vez que los antocianos son extraídos en el proceso de maceración, aportan su color al mosto e interaccionan con otros compuestos generados durante la fermentación alcohólica, participando en reacciones de copigmentación y polimerización, que otorgan al vino su color definitivo. Además, es posible apreciar la aparición de nuevos pigmentos originados por la unión de las antocianinas a los taninos y a otros compuestos resultantes de la fermentación alcohólica (piruvato, vinil guayacol, vinil fenol). Estos nuevos pigmentos, más estables que las originales antocianinas, pueden presentar una coloración púrpura o anaranjada, que poco a poco contribuye a la modificación del color del vino a lo largo del tiempo.

#### **3.5.2.2.2. Flavanoles y taninos**

Los flavanoles (ó flavan-3-oles, ó 3-flavanoles) se localizan en las partes sólidas, tanto en las variedades tintas como en las blancas, y principalmente en las pepitas, en las que su concentración es mayor que en los hollejos, especialmente los monómeros (Kennedy *et al.*, 2002). Los principales monómeros de la uva son la (+) catequina y su isómero la (-) epicatequina. No se encuentran nunca esterificados con azúcares ni con alcoholes, circunstancia que les confiere una elevada reactividad, que se manifiesta de manera particular por la tendencia a polimerizarse para formar taninos. Los monómeros de flavanoles y los taninos son particularmente

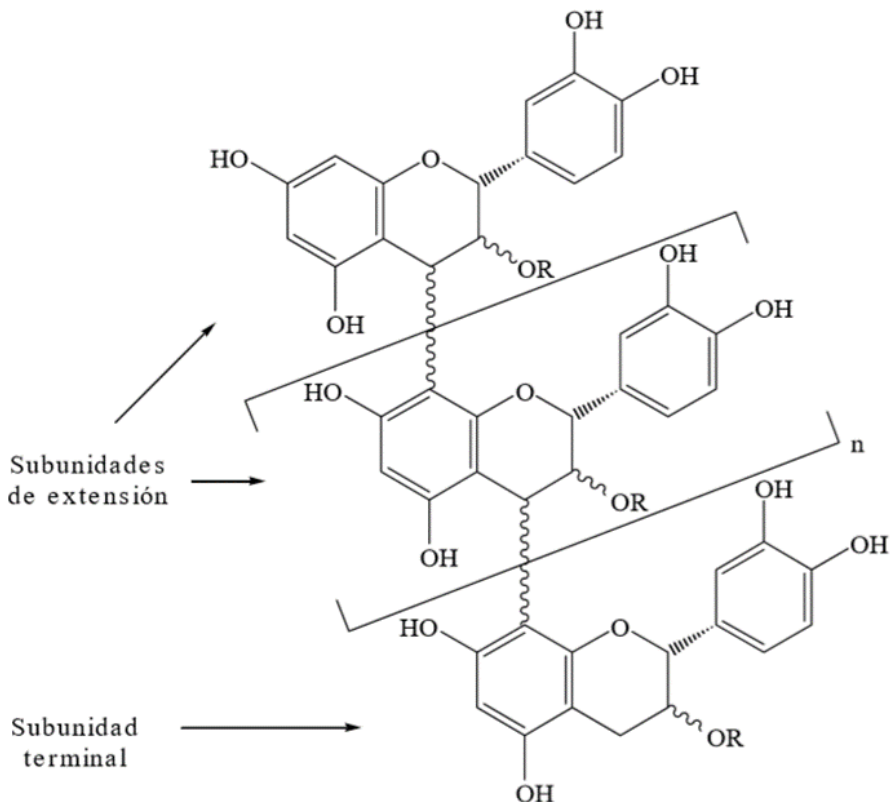






abundantes en el vino tinto, y están presentes en menor cantidad en el vino rosado y vino blanco (Neveu *et al.*, 2010).

La estructura de los taninos se basa en polímeros más o menos complejos formados por unidades de flavan-3-oles. Los oligómeros y polímeros de estos flavan-3-oles se conocen también con el término de proantocianidinas, porque en presencia de ácidos minerales liberan antocianidinas por ruptura de las uniones intermonoméricas. Las procianidinas oligoméricas corresponden a polímeros formados por un número amplio de unidades flavanoles (de tres a una decena). Las formas poliméricas (Fig. 17) representan la mayor parte de los flavan-3-oles. Los taninos de los hollejos difieren de los de las semillas por la presencia de prodelfinidinas y mayor grado de polimerización (Di Stefano, 1995).



**Figura 17.** Estructura general de los taninos de la uva.



Los taninos juegan un papel preponderante en la calidad de los vinos, al conferirles propiedades de astringencia, de color y de estructura. También contribuyen a la estabilización del color durante el envejecimiento (Pérez-Magariño and González-San José, 2001). Presentan cambios por precipitación, por ruptura de aquellos de mayor tamaño y formación de otros de tamaño medio, lo que modificará las propiedades sensoriales de astringencia y amargor. Estas reacciones, asociadas frecuentemente a un medio oxidativo, se ven favorecidas en el caso de la formación de nuevos pigmentos y polimerización de taninos, por la presencia de acetaldehído, el cual sirve de puente entre las moléculas (uniones tanino-antociano y tanino-tanino), y que se forma por la oxidación del etanol durante el envejecimiento en barricas, o también, cuando el vino se somete a tratamientos como la micro-oxigenación.

### **3.5.2.2.2.3. Flavonoles**

Los flavonoles son los responsables del color amarillo de las pieles de las variedades blancas, por lo que se encuentran fundamentalmente en el hollejo (Cheynier and Rigaud, 1986), aunque también se han detectado en la pulpa en pequeñas proporciones (Pereira *et al.*, 2006).

El grupo más importante de flavonoles de la uva lo constituyen la quercetina, miricetina y kaempferol así como sus correspondientes glicósidos.

Los flavonoles y los ácidos hidroxicinámicos se consideran tradicionalmente los principales copigmentos del vino tinto, por lo que contribuyen a la estabilización del color proporcionado por los antocianos (Gómez-Míguez *et al.*, 2006).





### 3.5.3. Composición aromática

#### 3.5.3.1. Madurez aromática de la uva

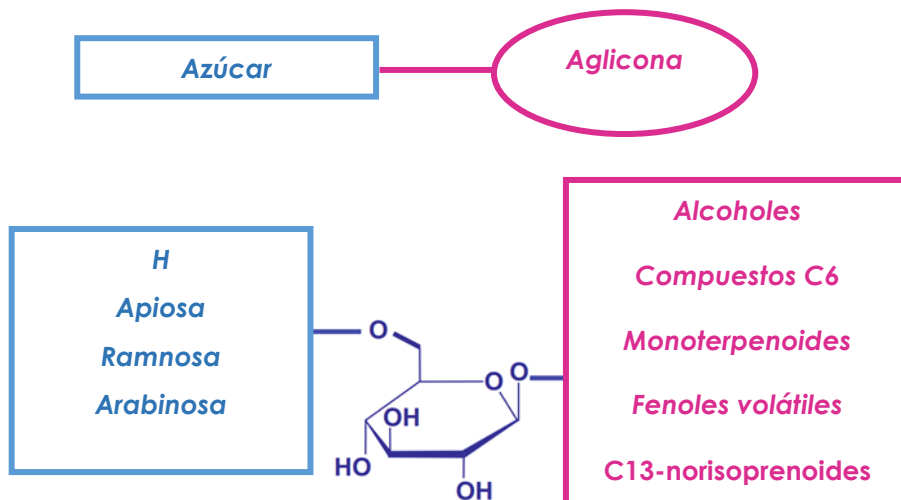
La madurez aromática se refiere al conjunto de compuestos aromáticos de la uva que pueden participar en el aroma del vino. Está formado por un grupo muy complejo de sustancias que pueden presentarse en forma libre, es decir, como moléculas volátiles y por tanto olorosas, o en forma ligada que no son volátiles y por tanto no huelen, a las que se denomina precursores del aroma. Las uvas poseen diferentes grupos de precursores del aroma, pero los denominados como precursores aromáticos glicosídicos son los más importantes.

Es un hecho conocido que la mayoría de las uvas para vinificación no huelen, lo cual indica que los compuestos aromáticos del vino que proceden directamente de la uva se encuentran formando parte de estructuras más complejas que les impiden poner de manifiesto su volatilidad, es decir, de precursores. No obstante, la mayor parte del aroma del vino procede del proceso de fermentación alcohólica, aunque este aroma no es el responsable de su tipicidad, sino que ésta va a depender del potencial aromático de las uvas de las que procede. Algunas veces es suficiente con que una de las sustancias esté presente en la uva, aunque sea en cantidades bajas, para que caracterice el aroma de esa variedad y le aporte ese toque de distinción.

Los precursores glicosídicos constituyen el grupo más importante responsable de los atributos varietales de los vinos, especialmente en variedades neutras, ya que estas formas son más comunes que los aromas libres (Noguerol-Pato *et al.*, 2012; Salinas *et al.*, 2012b). Estos precursores son grandes moléculas que constan de una aglicona volátil unida por un enlace O-glucosídico a una molécula



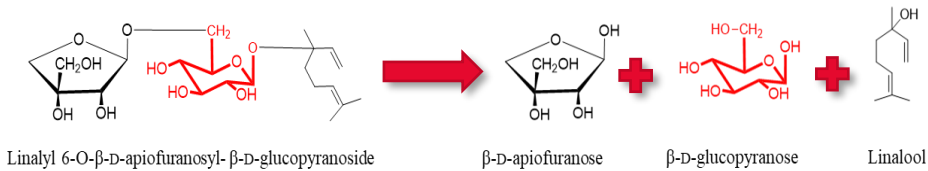
de glucosa. Además, esta glucosa puede o no estar unida a otra molécula de azúcar constituyendo un disacárido. La aglicona puede pertenecer a diferentes familias químicas, como terpenos, C13-norisoprenoides, compuestos C6, bencenoides, etc. (Fig. 18), todas ellas de naturaleza volátil si pueden soltarse de la glucosa.



**Figura 18.** Estructura general de los precursores glicosídicos del aroma (Baumes, 2009).

La liberación de la aglicona ocurre durante el proceso de vinificación y a lo largo de la conservación y envejecimiento de los vinos. La liberación de los compuestos volátiles, procedentes de los precursores glicosídicos, puede ser realizada por la acción de enzimas exógenas o endógenas con actividad  $\beta$ -glucosídica (Sánchez-Palomo *et al.*, 2005), por la actividad de las levaduras y de las bacterias (Michimayr *et al.*, 2012) o por hidrólisis ácida (Salinas and De La Hoz, 2012a) (Fig. 19).





**Figura 19.** Ruptura hidrolítica de los enlaces glicosídicos del precursor glicosilado del linalol y liberación de azúcares y de la aglicona volátil. La glucosa y el resto de la glicosil glucosa se muestra en rojo (Rubio-Bretón *et al.*, 2019).

La medida de los precursores glicosilados de las uvas puede realizarse de forma indirecta a través de la determinación de las agliconas volátiles mediante cromatografía de gases. Sin embargo, hay métodos más sencillos, que dan una información global del conjunto de precursores, permitiendo una transferencia de información útil para tomar decisiones a corto plazo. Debido a esto, son los métodos que más interesan al sector productivo, en especial a las bodegas.

En esta tesis se ha evaluado de forma global la maduración aromática de las uvas a través del índice de potencial aromático varietal (IPAv). Este índice estima el total de precursores aromáticos glicosilados a partir de la medida de la glucosa a la que se unen las agliconas volátiles. A esta glucosa se le denomina glicosil glucosa o glucosa G-G, e independientemente de que proceda de un disacárido o no, por cada molécula de glucosa G-G determinada hay una molécula volátil. Por tanto, cuantificando esa glucosa G-G se puede tener una estimación del contenido total de los compuestos volátiles procedentes de los precursores.

A día de hoy, esta es la herramienta más eficaz para estimar el potencial aromático de las uvas. Es un índice de fácil interpretación, gran utilidad y puede ser aplicado en todo el proceso productivo



(uvas, mostos y vinos, blancos y tintos) ofreciendo una enorme versatilidad.

### **3.5.3.2. Compuestos aromáticos**

El aroma es una de las características más importantes ligadas a la calidad y a las preferencias de los consumidores por un determinado alimento. Se debe a moléculas orgánicas volátiles que impactan en el órgano olfativo en el curso de una degustación.

En función de su origen, el aroma del vino se puede clasificar en: varietal, fermentativo y post-fermentativo. El aroma varietal es el que aporta la variedad de la uva, el fermentativo es el producido durante la fermentación alcohólica y maloláctica, y el post-fermentativo es el formado durante el almacenamiento y envejecimiento de los vinos, destacando especialmente el aportado por la madera en el caso de los vinos sometidos a un proceso de crianza.

A continuación, se detallan las principales características de los compuestos responsables de los distintos tipos de aroma de los vinos.

#### **3.5.3.2.1. Aroma varietal**

El aroma varietal es el que resulta del metabolismo de la uva y dependen de la variedad (López-Tamames *et al.*, 1997), de las prácticas agronómicas (Fragasso *et al.*, 2012), de la aplicación de tratamientos fitosanitarios (González-Rodríguez *et al.*, 2011), de las condiciones edafoclimáticas (Sabon *et al.*, 2002) y en general de las características de la zona donde se cultivan las viñas.

Como se ha indicado en el apartado anterior, lo constituyen un numeroso grupo de compuestos que pueden encontrarse en forma





libre, es decir, como moléculas volátiles y por lo tanto olorosas, o en forma ligada que no son volátiles y que por lo tanto no huelen, a las que se denomina precursores del aroma. Son muy importantes éstas últimas ya que, pese a ser inodoras, a lo largo del proceso de vinificación y especialmente durante la fermentación, pueden liberar la parte volátil y como consecuencia, le comunican al vino su aroma característico o aroma varietal.

Los precursores aromáticos pueden clasificarse en dos grupos según la forma en que contienen en su estructura la parte volátil. Si el precursor puede originar volátiles olorosos mediante una o dos fragmentaciones de la molécula, quedando aún reconocible la estructura del precursor, se les denomina precursores específicos del aroma. Por el contrario, si el precursor es una estructura en la que no se reconoce al volátil, ya que se requieren numerosas reacciones para que estos sean formados, se les denomina precursores no específicos del aroma. A este segundo grupo pertenecen los ácidos grasos, carotenoides y aminoácidos. El perfil de ambos tipos de precursores es característico de la variedad (Salinas, 2013).

Por lo tanto, los compuestos del aroma de la uva que contribuyen al aroma varietal de vinos se pueden clasificar en tres grandes grupos, tal y como se muestra en la Tabla 5.



**Tabla 5.** Clasificación de los compuestos del aroma que contribuyen al aroma varietal.

Aromas libres	Precusores específicos del aroma	Precusores no específicos del aroma
Terpenos	Glicosídicos	Ácidos grasos
C13-norisoprenoides	Glutatiónicos	Aminoácidos
Compuestos C6	Cisteínicos	Carotenoides
Bencenoides		
Pirazinas		

Los aromas libres no se encuentran en todas las viníferas y requieren de actividades específicas enzimáticas por parte de las levaduras para poder liberarse, siendo los compuestos que se liberan muy inestables. Por el contrario, los precursores específicos del aroma se encuentran en todas las viníferas y son los más abundantes, constituyendo una reserva potencial de aromas que se pueden ir liberando no sólo durante la fermentación sino también a lo largo del envejecimiento de los vinos ya que además de ser estables, se liberan tanto por hidrólisis ácida como por acción enzimática (Salinas, 2013).

#### 3.5.3.2.1.1. Aroma libre

En el grupo de los terpenos, los compuestos odorantes se pueden clasificar en monoterpenos y sesquiterpenos (de 10 y 15 átomos de carbono, respectivamente). Los monoterpenos aparecen en forma de hidrocarburos simples (limoneno), de ácidos (ácido linálico), de

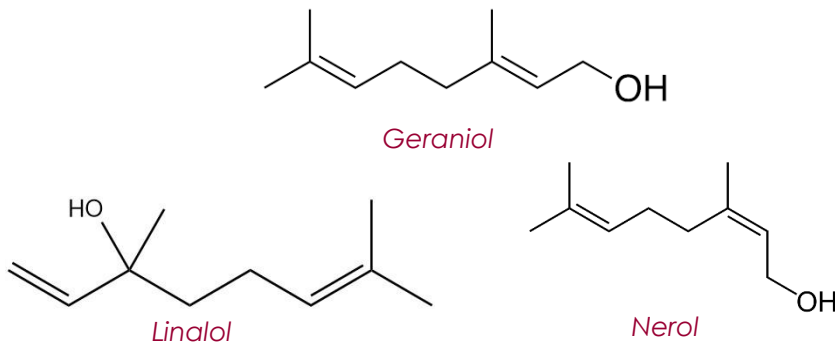






alcoholes (linalol, geraniol, citronelol), de aldehídos (linalal, geranial) e incluso de ésteres (acetato de linalilo).

Los compuestos terpénicos libres se suelen concentrar en mayor proporción en el hollejo que en la pulpa. Así el geraniol y el nerol, que tienen aromas florales, se encuentran en un 90% en el hollejo, mientras que el linalol (aroma a rosa) se encuentra en un 50% en el zumo (Fig. 20).



**Figura 20.** Monoterpenoides acíclicos.

Los niveles de terpenos libres aumentan con el desarrollo de la baya hasta la maduración, y más allá del estado maduro pueden llegar a disminuir. Los compuestos terpénicos se encuentran intactos o poco transformados en el vino, pudiéndose utilizar para la caracterización varietal ya que no se ven significativamente afectados por la etapa de fermentación (Mateo and Jiménez, 2000).

Los norisoprenoides proceden de los carotenoides y están formados por 13 átomos de carbono. Los carotenoides se sintetizan fundamentalmente desde la primera etapa de formación del fruto hasta el envero, y a partir de entonces se degradan, entre el envero



y maduración, para dar lugar a C13-norisoprenoides y otros compuestos glicosilados (Baumes *et al.*, 2002).

Los derivados norisoprenoides se dividen en dos principales grupos: megastigmanos y no megastigmanos. Entre los primeros destacan la  $\beta$ -ionona, con olor a violetas y la  $\beta$ -damascenona, con olor que varía desde floral (flores blancas) hasta mermelada de ciruelas pasas. Entre los no megastigmanos, el más importante es el 1, 1, 6-trimetil-1, 2-dihidronaftaleno (TDN), que presenta un olor a keroseno.

Los compuestos C6 poseen olores herbáceos y sabores amargos. Son abundantes en los hollejos poco maduros y su concentración disminuye con la maduración. Proceden de los ácidos grasos poliinsaturados, como se verá más adelante. Pueden aumentar su concentración por contacto de la uva con el oxígeno en las etapas pre-fermentativas, principalmente durante la vendimia mecánica y despalillado. Tienen bajos umbrales de percepción olfativa. Los compuestos C6 insaturados son más agresivos que los saturados y los aldehídos lo son más que los alcoholes (Salinas, 2006).

Los bencenoides en su forma libre proceden de los ácidos fenólicos, pero en su mayor parte están en forma de precursores glicosilados. La vía de formación de estos compuestos corresponde a la vía biosintética del ácido shiquímico, la cual es común en la mayoría de los vegetales y conduce a la formación de fenoles volátiles a partir de la fenilalanina.

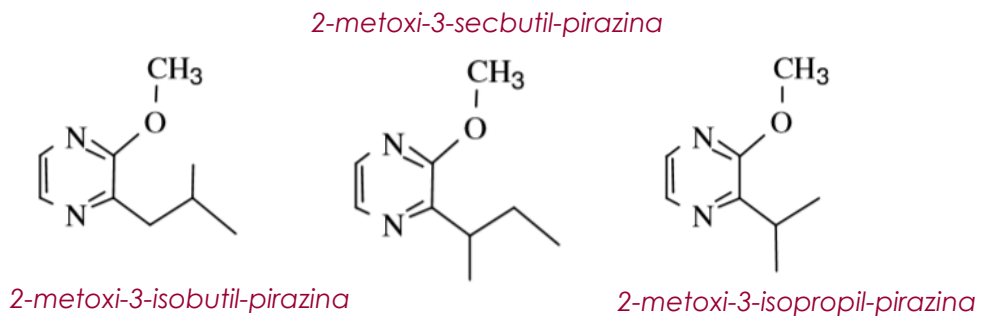
Los fenoles volátiles provenientes de la uva poseen bajos umbrales de percepción olfativa y aromas agradables como la vainillina que huele a vainilla, el eugenol que huele a clavo, el 2-feniletanol que huele a rosas, los cinamatos que huelen a





mermelada de frutas rojas, el guayacol a tostado, etc. (Etiévant *et al.*, 1989).

Las pirazinas de las uvas son del tipo metoxipirazina (MP) y juegan un papel importante en el aroma de algunas variedades como es el caso de Cabernet Sauvignon. Las más importantes son: 2-metoxi-3-isobutil-pirazina (MIBP), 2-metoxi-3-secbutil-pirazina y 2-metoxi-3-isopropil-pirazina, pero la MIBP es la MP más relevante en uvas, mostos y vinos (Sala *et al.*, 2004), y su presencia se relaciona con notas a pimienta verde, espárragos o notas terrosas. En la Figura 21 se muestran las principales pirazinas encontradas en uvas y vinos.



**Figura 21.** Principales pirazinas encontradas en uvas y vinos.

Los niveles de MP disminuyen progresiva y rápidamente con la madurez de la uva y los niveles de MIBP en los vinos tintos dependen solo de los niveles de MIBP en sus uvas correspondientes. El umbral de la pirazina más relevante es de 10-16 ng/L. Sin embargo, estos compuestos no se suelen encontrar en las uvas y vinos de zonas cálidas, como es el caso del área de estudio de la presente tesis doctoral (Culleré *et al.*, 2009; García-Esparza *et al.*, 2018; Sala *et al.*, 2004). Además, está demostrado que en zonas de altas temperaturas y con mucha luz, hay una disminución en la concentración de MP (Koch *et al.*, 2012).



### **3.5.3.2.1.2. Precursores específicos del aroma**

Dentro de los precursores específicos del aroma, los precursores glicosídicos son los más importantes ya que se encuentran en todas las viníferas y son los principales responsables de los atributos varietales de los vinos, tal como se ha comentado anteriormente. Las agliconas procedentes de los precursores glicosilados son compuestos que poseen olores agradables, y, por lo tanto, una mayor concentración de estos precursores indica un mayor potencial aromático de la uva con una repercusión positiva en el aroma del vino.

Otro tipo de precursores específicos del aroma son los glutatiónicos y cisteínicos, que se encuentran sólo en algunas variedades de uva. Durante el proceso de la fermentación alcohólica, las uvas que poseen actividades enzimáticas, liberan tioles volátiles a partir de este tipo de precursores. Los cisteínicos están presentes en las uvas y mostos a niveles superiores que los glutatiónicos, pero ambos necesitan levaduras con similar actividad enzimática.

Los tioles se liberan al inicio de la fermentación alcohólica y son fácilmente oxidables e inestables. Además, se pueden transformar en aromas indeseables en ambientes de reducción.

### **3.5.3.2.1.3. Precursores no específicos del aroma**

Los ácidos grasos insaturados de los vegetales constituyen una de las fuentes principales de sustancias odorantes al transformarse por oxidación enzimática a aldehídos y alcoholes de 6 átomos de carbono. Los ácidos linolénico y linoléico constituyen aproximadamente el 50% de los ácidos grasos insaturados de la





uva, y por tanto pueden producir importantes concentraciones de compuestos C6.

En la baya los ácidos grasos prácticamente no existen en forma libre, sino que se encuentran esterificados en forma de fosfolípidos, glicolípidos y lípidos neutros. El hollejo es entre 1,5 y 3 veces más rico en ácidos grasos que la pulpa, y entre los dos contienen el 100% de los mismos (Bayonove, 2003).

La maduración de la uva conlleva un empobrecimiento en ácido linolénico, mientras que el ácido linoléico permanece constante. Por el contrario, el ácido oleico aumenta (Bayonove, 2003). Estas variaciones pueden estar relacionadas con la variación de la concentración de compuestos C6 durante los diferentes estados de maduración.

Los aminoácidos constituyen un importante grupo de precursores no específicos del aroma ya que, junto con el amonio, constituyen la fuente nitrogenada necesaria para que las levaduras aseguren el correcto desarrollo de la fermentación alcohólica. Además, durante esta etapa de la vinificación, el metabolismo de los aminoácidos puede dar lugar a la formación de alcoholes superiores y ésteres, compuestos que contribuyen de forma decisiva al aroma del vino, especialmente para las variedades neutras (Lambrechts and Pretorius, 2000).

Por último, los carotenoides más abundantes en las uvas son el  $\beta$ -caroteno y la luteína. El primero junto con la neoxantina son los que se consideran los precursores de los C13-norisoprenoides más importantes de la uva.



### 3.5.3.2.2. Aroma fermentativo

La parte principal del aroma del vino se genera por la acción de las levaduras durante la fermentación alcohólica, o la acción de las bacterias lácticas durante la fermentación maloláctica.

Los compuestos que constituyen el aroma fermentativo pertenecen a diferentes familias químicas: alcoholes, ácidos, ésteres, compuestos carbonílicos, compuestos azufrados, lactonas y fenoles volátiles (Flanzy, 2000). Por su contribución al aroma del vino, los alcoholes superiores y sus acetatos, y los ácidos grasos y sus ésteres etílicos, son los compuestos más importantes (Molina *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2018). La proporción en que se encuentran en los vinos depende de la variedad de uva, del tipo de microorganismos, de las condiciones en las que se desarrollen y de las técnicas y materiales utilizados en la vinificación (Lorenzo *et al.*, 2008; Losada *et al.*, 2012).

La mezcla de todos los componentes mayoritarios de la fermentación alcohólica, dan lugar al olor típico de bebida alcohólica y constituye la base aromática común a todos los vinos. Es un olor ligeramente dulce, alcohólico, picante y frutal. Esta mezcla constituye lo que se denomina un sistema buffer o tampón aromático. El aroma de los vinos es muy rico en notas aromáticas que son capaces de romper el tampón aromático y transmitir la aparición de una nota sensorial diferente (Ferreira, 2007). Por el contrario, la fermentación maloláctica modifica sutilmente el aroma del vino (Flanzy, 2000).

El contenido medio total en el vino de los alcoholes superiores es del orden de 300-400 mg/L, por encima de estos valores pueden contribuir de forma negativa al aroma del vino. La formación de estos compuestos está ligada al metabolismo de los azúcares y





aminoácidos y, por tanto, está fuertemente influenciada por la composición de nitrógeno de la uva. De esta forma, la formación de estos compuestos depende de la demanda de nitrógeno de la levadura (Flanzy, 2000).

El isobutanol y el alcohol isoamílico suprimen las notas afrutadas y amaderadas, pero no las notas a cuero, y pueden impartir al vino una calidad negativa. La presencia de 2-feniletanol, que proporciona notas de miel y rosas, puede contribuir al aroma del vino (Wang *et al.*, 2018). Los acetatos más significativos son el acetato de isoamilo, que contribuye al aroma a plátano, y el acetato de 2-feniletilo, que contribuye al aroma floral.

Los ácidos grasos volátiles y sus ésteres etílicos son, junto con los alcoholes superiores y sus acetatos, los principales marcadores del aroma fermentativo. Estos ácidos grasos y sus ésteres etílicos se producen en altas cantidades en los vinos, presentando un agradable aroma, siendo los ésteres los principales responsables de los aromas afrutados. Por el contrario, aunque los ácidos grasos se han relacionado como olores no deseables, se consideran necesarios para un buen equilibrio del aroma del vino (Flanzy, 2000; Wang *et al.*, 2018). Los ácidos hexanoico, octanoico y decanoico son ácidos grasos volátiles comunes en el vino, siendo el ácido octanoico el más abundante.

Los ésteres etílicos contribuyen al aroma agradable, y se forman durante las fermentaciones alcohólica y maloláctica, siendo los provenientes de la acción de las levaduras en la fermentación alcohólica los más importantes para el aroma del vino (Belda *et al.*, 2017).

Existen diferentes factores que pueden afectar al contenido de compuestos volátiles en los vinos. Estos factores incluyen: prácticas



agronómicas, como la aplicación foliar de agroquímicos; técnicas prefermentativas, como la adición enológica de taninos y diferentes tipos de maceración; técnicas fermentativas, donde se utilizan diferentes cepas de levaduras y bacterias lácticas, así como las condiciones de fermentación.

Por ejemplo, los vinos inoculados con *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* muestran matices de fruta madura mejorados y un mayor contenido de propanoato de etilo, 2-metilpropanoato de etilo y dihidrocinamato de etilo. Por su parte, los vinos de fermentación espontánea presentan matices mejorados de “fruta de hueso” (melocotón, nectarina, albaricoque, etc.) relacionados con los mayores contenidos de acetato de 2-feniletilo y etanoato de 2-metilpropilo (Puertas *et al.*, 2018). También se ha demostrado que los vinos producidos por una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, así como los vinos producidos por fermentación espontánea, producen altas concentraciones de ésteres, principalmente 2-hidroxiopropanoato de etilo, y ácidos grasos (Blanco *et al.*, 2013).

Después de la fermentación alcohólica, algunos vinos pueden someterse a la fermentación maloláctica. Los agentes de estas transformaciones malolácticas son las bacterias lácticas, principalmente de las especies *Oenococcus oeni* y en menor medida de las especies *Pediococcus damnosus* y *Lactobacillus*. Se ha encontrado que las bacterias pueden influir en el aroma, produciendo metabolitos volátiles y modificando los compuestos aromáticos derivados de la uva y el metabolismo de la levadura (Styger *et al.*, 2011). En general, se ha encontrado que la fermentación maloláctica puede suavizar el aroma afrutado y reducir el aroma verde del vino (Styger *et al.*, 2011). Finalmente, la







cantidad de compuestos nitrogenados en el mosto puede afectar la composición volátil del vino, ya que los aminoácidos (principal fuente de nitrógeno para las levaduras), son precursores de compuestos fermentativos volátiles (Sánchez-Gómez *et al.*, 2016). La disponibilidad y utilización de nitrógeno por *Saccharomyces cerevisiae* influye significativamente en la cinética de fermentación (Arias-Gil *et al.*, 2007) y la producción de compuestos volátiles importantes para el aroma del vino (Garde-Cerdán and Ancín-Azpilicueta, 2008). Se ha demostrado que la concentración de compuestos volátiles en el vino está directamente relacionada con la cantidad de aminoácidos presentes en el mosto, y que el nitrógeno tiene un doble papel, favoreciendo el crecimiento de las levaduras para realizar la fermentación alcohólica y produciendo compuestos volátiles (Fairbairn *et al.*, 2017).

### 3.5.3.2.3. Aroma post-fermentativo

En este grupo están incluidos todos los compuestos volátiles que se forman durante el envejecimiento del vino, dando lugar al "bouquet". Durante la conservación del vino, su composición en constituyentes volátiles sufre transformaciones debido a las reacciones físico-químicas y biológicas que sufren componentes aromáticos varietales y fermentativos.

En esta etapa el aroma afrutado de los vinos jóvenes va desapareciendo progresivamente y evoluciona hacia un aroma más complejo. El cambio en la composición aromática no es debido sólo a la cesión de aromas por parte de la madera y a la generación de especies volátiles producto de la micro-oxigenación, en el caso de vinos de crianza, sino a otra serie de fenómenos que de forma concurrente actúan sobre el vino.





Entre los compuestos aromáticos implicados en el envejecimiento destacan los compuestos cedidos por la madera, en el caso de los vinos de crianza, como las whiskylactonas que poseen un aroma a madera, y otros compuestos entre los que estarían algunos fenoles volátiles como el guayacol o la vainillina (Fernández de Simón *et al.*, 2008).

Durante el envejecimiento los precursores aromáticos liberan sus agliconas, por lo que puede aumentar el contenido de terpenos, norisoprenoides, bencenoides, etc. (Sefton *et al.*, 1990).



## 4. OBJETIVOS


---





El presente trabajo de Tesis Doctoral tiene como objetivo general:

*“Evaluar el efecto que diferentes tratamientos con agua ozonizada tienen sobre la aptitud enológica de uvas de Cabernet Sauvignon y Macabeo cultivadas en Castilla-La Mancha y su repercusión en el vino”.*

Para alcanzar dicho objetivo principal, se plantean los siguientes objetivos específicos:

 **Objetivo 1.** Evaluar la influencia de la pulverización de agua ozonizada a la parte aérea de la cepa en la composición de uvas y vinos.

 **Objetivo 2.** Evaluar la influencia de la aplicación de agua ozonizada mediante riego por goteo en la cepa, y combinando riego y pulverización aérea, en la composición de uvas y vinos.

 **Objetivo 3.** Evaluar la influencia de la aplicación de agua ozonizada mediante inyección a la cepa, o endoterapia, y combinando endoterapia y pulverización aérea, en la composición de uvas y vinos.





## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

---





## 5.1. Planteamiento inicial

Los trabajos de mi Tesis Doctoral se engloban dentro del Proyecto INNTER ECOSANVID 2015, financiado por el Programa FEDER INNTERCONECTA (CDTI, EXP: 00093497/ITC-20151026), cuyo título es "Intervención ecológica para mejorar el estado sanitario de las viñas y su efecto en la calidad de las uvas y sus vinos".

Dicho proyecto fue financiado por el consorcio interregional de empresas formado por DCOOP-BACO, FINCA ANTIGUA, VIALCON y NUTRICONTRON, y contó con el apoyo científico-técnico de los grupos de investigación de la Cátedra de Química Agrícola de la E.T.S.I. Agrónomos y Montes de Albacete (Universidad de Castilla-La Mancha, UCLM), del Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria del Instituto Técnico Agronómico Provincial de la Diputación de Albacete (ITAP), y con la empresa BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), spin-off de la UCLM.

El objetivo que tenía era impulsar una nueva estrategia ecológica que mejorase el estado sanitario de las viñas, con especial atención en las enfermedades de madera. Dicha estrategia se basó en la construcción de diferentes prototipos de aplicación de disoluciones acuosas de ozono, evaluando su repercusión en la calidad de las uvas y sus vinos de 5 viníferas, cultivadas en Castilla-La Mancha, a lo largo de las cosechas de 2015, 2016 y 2017.

Mi Tesis Doctoral trata sobre el estudio del efecto en la calidad de la uva y del vino de la aplicación de agua ozonizada en viñedos Cabernet Sauvignon y Macabeo, con el fin de mejorar el estado sanitario.



## 5.2. Selección de parcelas y marcaje de cepas

Se seleccionaron dos parcelas de riego por goteo, una para la variedad Cabernet Sauvignon y otra para la variedad Macabeo, para los tres años de estudio. Ambas parcelas están ubicadas en Finca Antigua S.L., perteneciente al grupo empresarial Familia Martínez Bujanda, en el Municipio de Los Hinojosos (Cuenca, España).

La parcela seleccionada para la variedad Cabernet Sauvignon, se encuentra situada en el Polígono 33, Parcela 8, Recinto 15 (Fig. 1 del Anexo). La viña fue plantada en espaldera en el año 1989 con un marco de plantación de 3 x 2 m (1667 plantas/ha) y podada en Cordón Royat. La parcela escogida para la variedad Macabeo se encuentra en el Polígono 33, Parcela 7, Recinto 22 del Término Municipal de Los Hinojosos (Fig. 2 del Anexo). La viña fue plantada en espaldera en el año 1992 con un marco de plantación de 3 x 2 m (1667 plantas/ha) y podada en Cordón Royat.

En la Tabla 6, se muestran las características edafológicas de las parcelas de las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.



**Tabla 6.** Características edafológicas y composición química de las parcelas de las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.

	Cabernet Sauvignon	Macabeo
Textura ( <i>Densímetro Bouyocos</i> )	Franco-arcilloso (34,56% arena, 27,04% limo y 38,36% arcilla)	Franco-arcilloso (32,26% arena, 29,84% limo y 37,36% arcilla)
pH	7,66 (alcalino)	7,83 (alcalino)
Conductividad	465 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (ligeramente salino)	485 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (ligeramente salino)
Caliza activa ( <i>Galet</i> )	15,74% (muy calizo)	9,15% (calizo)
Relación Carbono/Nitrógeno	7,70	7,80
Materia orgánica ( <i>Walkley and Black</i> )	1,72% (bajo)	1,79% (bajo)
Contenido en Carbono ( <i>Kjeldahl</i> )	0,77% (bajo)	0,80% (bajo)
Contenido en Nitrógeno ( <i>Kjeldahl</i> )	0,10% (bajo)	0,10% (bajo)
Contenido en Fósforo ( <i>Olsen modificado</i> )	0,018 mg/L (medio-bajo)	0,021 mg/L (medio)
Contenido en Potasio ( <i>Absorción atómica</i> )	0,23 mg/L (medio)	0,39 mg/L (medio)
Contenido en Calcio ( <i>Absorción atómica</i> )	5,74 mg/L (muy alto)	6,81 mg/L (muy alto)
Contenido en Magnesio ( <i>Absorción atómica</i> )	0,158 mg/L (bajo)	0,251 mg/L (medio)
Contenido en Carbonatos ( <i>Calcímetro de Bernard</i> )	62,72% (muy alto)	45,32% (muy alto)



La Tabla 7 muestra los datos meteorológicos de las tres cosechas de estudio. En 2015, la precipitación anual fue de 202,2 mm, la temperatura media de mínimas anual 6,8 °C y la temperatura media de máximas anual 22,6 °C. En 2016, la precipitación anual fue de 413,7 mm, la temperatura media de mínimas anual 7,2 °C y la temperatura media de máximas anual 21,7 °C. En 2017, la precipitación anual fue de 203 mm, la temperatura media de mínimas anual 6,5 °C y la temperatura media de máximas anual 23,2 °C.

**Tabla 7.** Parámetros meteorológicos de la zona de estudio.

	2015			2016			2017		
	P	tmm	TMM	P	tmm	TMM	P	tmm	TMM
Enero	18,9	-3,7	11,6	15,8	2,0	11,0	12,3	-3,0	10,8
Febrero	20,4	-0,7	10,7	36,9	1,4	12,5	22,0	2,0	14,0
Marzo	62,5	1,6	17,2	33,5	0,3	15,1	18,8	1,8	18,7
Abril	18,0	6,7	20,3	102,3	5,0	17,5	24,3	4,9	22,3
Mayo	2,0	9,6	28,0	50,3	7,9	22,0	24,5	10,3	26,6
Junio	20,8	14,1	30,6	3,3	12,2	30,9	7,8	15,8	33,7
Julio	0,2	17,3	37,3	0,6	17,4	35,3	5,8	15,1	35,1
Agosto	2,2	15,6	32,9	13,1	17,1	34,4	9,6	16,3	34,7
Septiembre	2,8	10,3	26,8	7,2	11,3	30,0	0,0	9,8	29,1
Octubre	29,3	7,9	21,2	46,1	8,3	23,6	15,1	6,9	25,5
Noviembre	25,1	2,0	17,6	64,5	2,6	14,4	24,7	-0,2	16,5
Diciembre	0,0	0,4	15,7	40,1	0,7	12,7	38,1	-1,8	10,9

P: precipitación (mm); tmm: temperatura media de mínimas (°C); TMM: temperatura media de máximas (°C).



### **5.2.1. Delimitación de parcelas y marcaje de cepas**

Se realizó un diseño Split-Plot o parcelas subdivididas para el desarrollo experimental. Se seleccionaron 15 cepas al azar, para cada uno de los 5 tratamientos, dispuestas en 5 réplicas de 3 plantas cada una. Una de las réplicas se dejó como reserva ( $n=4$ ). Se usaron otras 15 cepas como control (sin tratamiento) durante las cosechas de 2015, 2016 y 2017, agrupadas de la misma forma que para los tratamientos. Las plantas seleccionadas estaban sanas visualmente para minimizar la interferencia de plagas o enfermedades en la calidad de las uvas y los vinos. Se ubicaron en una zona homogénea de las parcelas y se evitaron escoger cepas de las hileras externas. Durante el estudio no se utilizaron herbicidas ni pesticidas.

Para el marcaje, se colocó un tubo protector en el pie de la planta y a continuación, se utilizó una cinta de color blanco (Fig. 3 del Anexo). Además, a las plantas marcadas como control se les puso una doble cinta rayada amarilla y negra (Fig. 4 del Anexo). También se colocaron dos llaveros con el código identificativo de la planta (Figs. 5 y 6 del Anexo) y se realizaron cuatro fotografías, dos por cada lado y en diferentes ángulos colocando una escala en el pie de la cepa.

### **5.3. Tratamientos con la disolución acuosa de ozono**

Para los tratamientos con agua ozonizada se utilizó un prototipo específico diseñado, para su aplicación en la agricultura, por la empresa Nutricontrol, S.L. (Cartagena, España) (Fig. 7 del Anexo). El equipo consta de un generador de ozono a partir de oxígeno atmosférico y un tanque de agua de 500 L, con aislamiento térmico, donde el ozono se disuelve inmediatamente después de su



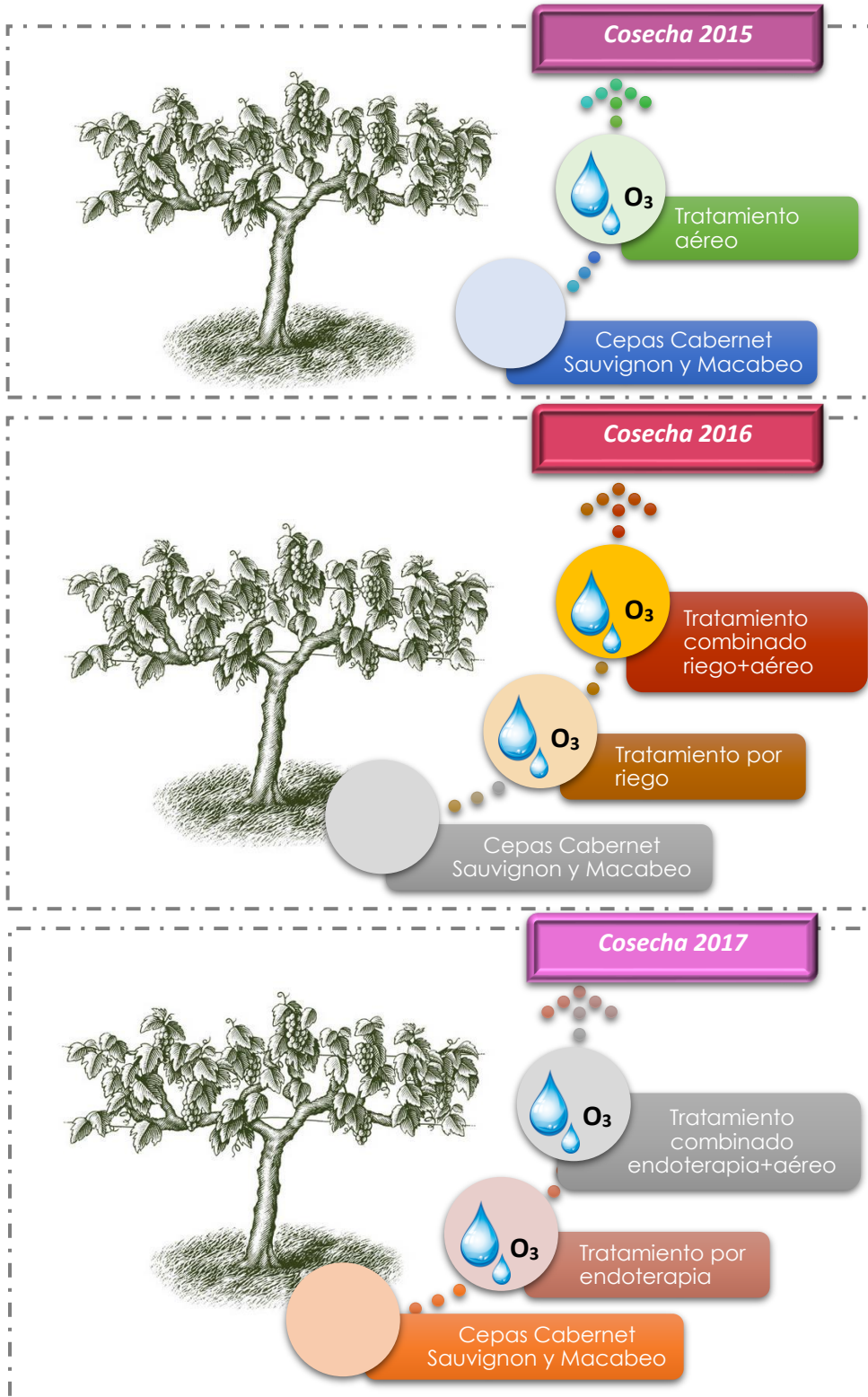
generación. El equipo contiene un electrodo que mide en milivoltios (mV) el potencial de oxidación-reducción (POR) del agua y un controlador para mantener automáticamente el POR deseado. El POR del agua ozonizada fue de  $875 \pm 25$  mV, y fue supervisado continuamente durante todas las aplicaciones.

El agua utilizada para preparar la solución de ozono provino de un pozo subterráneo ubicado en el mismo viñedo y su temperatura de salida fue de 15 °C. La generación de agua ozonizada se llevó a cabo en el viñedo en el momento de las aplicaciones, que tuvo lugar a primera hora de la mañana, cuando la temperatura ambiente estaba por debajo de 20 °C.

Las cepas control no recibieron agua ozonizada, pero cuando se realizaron los tratamientos por riego y aéreo, las cepas control recibieron la misma cantidad de agua no ozonizada.

En la Figura 22, se muestra un esquema de los tratamientos realizados en cepas Cabernet Sauvignon y Macabeo durante las tres cosechas.





**Figura 22.** Esquema de los tratamientos realizados, con la disolución acuosa de ozono, durante las tres cosechas.



### 5.3.1. Tratamiento aéreo

La disolución acuosa de ozono fue preparada, como se ha comentado anteriormente, a pie de viña, y una vez lista, fue trasvasada inmediatamente al depósito del equipo de pulverización mecánica de Finca Antigua.

Se pulverizó la parte superficial de la planta con la disolución acuosa de ozono, para lo cual se usaron aproximadamente 300 mL/cepa en cada aplicación. Durante la cosecha 2015 se realizaron dos aplicaciones, la primera en la mitad de la etapa de maduración de la uva y la segunda inmediatamente después de la poda (Figs. 8, 9 y 10 del Anexo). En la Tabla 8 se muestran las fechas de las aplicaciones llevadas a cabo en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.

**Tabla 8.** Aplicaciones realizadas en las parcelas de tratamiento aéreo en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.

	Cabernet Sauvignon	Macabeo
1º Tratamiento aéreo	14/08/2015	17/08/2015
2º Tratamiento aéreo	17/02/2016	17/02/2016

### 5.3.2. Tratamiento por riego

Para poder aplicar el agua ozonizada a través del sistema de riego, hubo que hacer un estudio previo de las parcelas para que el prototipo de riego fuese capaz de adaptarse a las características del sistema de riego, pudiéndose generar in-situ el ozono e inyectarlo simultáneamente en el agua de riego justo antes de su aplicación, trabajando en régimen continuo.





Se conectó una tubería que iba desde el prototipo de riego hasta el punto de salida de agua de la instalación de irrigación de la parcela (Fig. 11 del Anexo). Se trabajó en régimen continuo tomando el agua directamente de la boca de riego de la parcela y generándose continuamente la disolución acuosa de ozono. En la salida del agua ozonizada se conectó una tubería principal en la que se colocaron diversos ramales para regar las parcelas de este tratamiento (Fig. 12 del Anexo).

Se controló la temperatura dentro del depósito, con el termómetro interno del prototipo, ya que con altas temperaturas la descomposición del ozono en disolución acuosa se acelera. El volumen de agua ozonizada que se había aplicado se controló con un caudalímetro colocado a la salida de la bomba (Fig. 13 del Anexo), y la presión de trabajo con un manómetro (Fig. 14 del Anexo).

Se utilizó un volumen promedio de agua ozonizada de 20 L/cepa en cada aplicación (Fig. 15 del Anexo). Se realizaron tres aplicaciones durante la cosecha de 2016, que tuvieron lugar después de la etapa de cuajado, al comienzo del envero y a mitad de la etapa de maduración de la uva. En la Tabla 9 se muestran las fechas de las aplicaciones llevadas a cabo en las parcelas de tratamiento por riego en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.



**Tabla 9.** Aplicaciones realizadas en las parcelas de tratamiento por riego en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.

	Cabernet Sauvignon	Macabeo
1º Tratamiento por riego	06/07/2016	23/06/2016
2º Tratamiento por riego	26/07/2016	25/07/2016
3º Tratamiento por riego	09/09/2016	08/09/2016

### 5.3.3. Tratamiento combinado riego+aéreo

En la cosecha de 2016 además del tratamiento por riego, se combinó el tratamiento de riego con la pulverización a la parte aérea de la planta.

Las parcelas de tratamiento combinado riego+aéreo fueron tratadas mediante aplicación foliar y por riego, de la misma forma que se ha explicado anteriormente en los apartados 5.3.1 y 5.3.2.

Para ello, se llevaron a cabo tres tratamientos por riego y tres tratamientos aéreos (tras la poda en febrero de 2016, dos semanas antes de la floración y dos semanas antes de la vendimia). En la Tabla 10 se muestran las fechas de las aplicaciones llevadas a cabo en las parcelas de tratamiento combinado en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.



**Tabla 10.** Aplicaciones realizadas en las parcelas de tratamiento combinado riego+aéreo en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.

	Cabernet Sauvignon	Macabeo
1º Tratamiento por riego	06/07/2016	23/06/2016
2º Tratamiento por riego	26/07/2016	25/07/2016
3º Tratamiento por riego	09/09/2016	08/09/2016
1º Tratamiento aéreo	17/02/2016	17/02/2016
2º Tratamiento aéreo	09/06/2016	09/06/2016
3º Tratamiento aéreo	24/08/2016	24/08/2016

#### 5.3.4. Tratamiento por endoterapia

Para el desarrollo del prototipo de endoterapia, se realizaron una serie de pruebas previas para estudiar el sistema vascular de la *Vitis vinifera* y así seleccionar el sistema de inyección y los parámetros de aplicación adecuados para poder tratar las cepas por endoterapia.

Se estudiaron diferentes sistemas de inyección comerciales compatibles con la morfología y fisiología de las cepas. El objetivo era llegar al xilema para poder inyectar el agua ozonizada en las tráqueas, las cuales tienen poca conexión horizontal y son mayoritariamente de flujo vertical. Se debía de tener en cuenta que los anillos xilemáticos más activos son los más jóvenes (los más



próximos al cambium). Por lo tanto, había que realizar una perforación perpendicular dirigida al centro de la planta para facilitar la compartimentación y minimizar daños. Se debían evitar cicatrices así como la sobrepresión para no perjudicar al sistema vascular. Se concluyó que el punto óptimo de inyección estaba localizado en la inserción de la raíz principal, y que se debía aplicar una presión inferior a 1 bar.

Antes de comenzar con los tratamientos, se hizo una microperforación en la planta de 1 cm con un taladro de 3 mm, se introdujo la cánula y se colocó el adaptador de endoterapia, que gracias a su cierre hermético, permitió mantener las mismas cánulas en todas las aplicaciones (Figs. 16, 17 y 18 del Anexo).

El tratamiento por endoterapia se llevó a cabo durante la cosecha de 2017. El volumen de aplicación fue de aproximadamente 12,5 mL para cada vid en cada aplicación. Se decidió intensificar los tratamientos, aumentando el número de aplicaciones. Tanto en la variedad Cabernet Sauvignon como en Macabeo, se realizaron tres aplicaciones distribuidas entre los meses de junio y julio, que es cuando la planta se encuentra en plena actividad vegetativa (Figs. 19 y 20 del Anexo).

En la Tabla 11 se muestran las fechas de los tratamientos por endoterapia llevados a cabo en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.



**Tabla 11.** Aplicaciones realizadas en las parcelas de tratamiento por endoterapia en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.

	Cabernet Sauvignon	Macabeo
1º Tratamiento por endoterapia	16/06/2017	16/06/2017
2º Tratamiento por endoterapia	05/07/2017	05/07/2017
3º Tratamiento por endoterapia	19/07/2017	19/07/2017

### 5.3.5. Tratamiento combinado endoterapia+aéreo

En la cosecha de 2017 además del tratamiento por endoterapia, se combinó el tratamiento por endoterapia con la pulverización a la parte aérea de la planta.

Se decidió realizar la aplicación combinada de endoterapia y aérea los mismos días que se habían contemplado para las parcelas del tratamiento sólo por endoterapia. Respecto a la aplicación aérea, se realizaron siete tratamientos, uno tras la poda en enero de 2017 y el resto un par de días antes y después de cada aplicación por endoterapia.

En la Tabla 12 se muestran las fechas de las aplicaciones llevadas a cabo en las parcelas de tratamiento combinado en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo. Como se puede ver, son las mismas para ambas variedades.



**Tabla 12.** Aplicaciones realizadas en las parcelas de tratamiento combinado endoterapia+aéreo en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.

	Tratamiento por endoterapia	Tratamiento aéreo
Aplicación 1	-	31/01/2017
Aplicación 2	16/06/2017	14/06/2017 19/06/2017
Aplicación 3	05/07/2017	03/07/2017 07/07/2017
Aplicación 4	19/07/2017	17/07/2017 21/07/2017

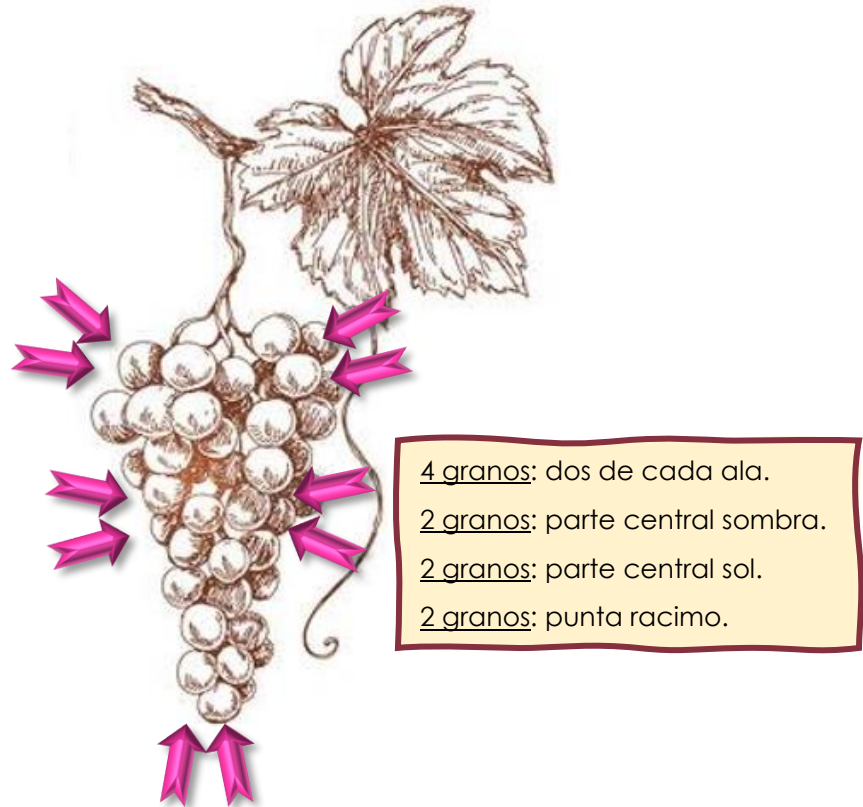
#### 5.4. Seguimiento de la maduración

Aunque el estudio abarcó tres cosechas, 2015, 2016 y 2017, el seguimiento de la maduración se realizó sólo durante las cosechas de 2016 y 2017. Concretamente se realizaron 4 muestreos representativos, en diferentes estados de madurez.

De las 15 cepas marcadas como control y tratamiento, se muestrearon 12 cepas de forma independiente (4 réplicas) dejando la quinta réplica de 3 cepas como reserva. De cada una de las cepas se escogieron al azar varios racimos, de ambos brazos, y de cada racimo se cogieron 10 granos de uva con el pedúnculo. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

En la Figura 23, se muestra un esquema de los granos escogidos dentro de cada uno de los racimos.





**Figura 23.** Muestreo de los granos de uva dentro del racimo.

En el cuarto muestreo, que fue el de vendimia, se cogieron racimos enteros. De la variedad Cabernet Sauvignon se cogieron alrededor de 11 kg y 8 kg en Macabeo, de cada una de las variantes (control y tratamiento), para hacer las vinificaciones por duplicado y los análisis pertinentes.

Las uvas muestreadas, en los diferentes puntos de maduración, se identificaron y almacenaron (congeladas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) para su posterior procesamiento y análisis.

En la Tabla 13 se muestran las fechas de los muestreos llevados a cabo en las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.



**Tabla 13.** Fechas de los muestreos de uvas a lo largo de su maduración, en cepas control y tratadas, de las variedades Cabernet Sauvignon y Macabeo.

		Cabernet Sauvignon	Macabeo
Cosecha 2015	Vendimia	29/09/2015	09/09/2015
Cosecha 2016	1º Muestreo	23/09/2016	09/09/2016
	2º Muestreo	26/09/2016	13/09/2016
	3º Muestreo	30/09/2016	16/09/2016
	4º Muestreo (Vendimia)	06/10/2016	20/09/2016
Cosecha 2017	1º Muestreo	30/08/2017	24/08/2017
	2º Muestreo	04/09/2017	28/08/2017
	3º Muestreo	07/09/2017	30/08/2017
	4º Muestreo (Vendimia)	11/09/2017	31/08/2017

En cada uno de los muestreos se llevaron a cabo los siguientes análisis: peso de 100 bayas, °Baumé, pH, acidez total, índice de polifenoles totales (IPT), intensidad colorante y tonalidad. En el muestreo de vendimia se analizó, además, la madurez fenólica e índice de potencial aromático varietal (IPAv). El IPT y la madurez fenólica sólo se analizaron en las uvas de la variedad Cabernet Sauvignon.

La vendimia (último muestreo) se realizó cuando se alcanzó la óptima madurez tecnológica de las uvas control (relación °Baumé/acidez total más adecuada).





## 5.5. Vinificaciones y seguimiento de las fermentaciones

Las uvas se vendimiaron a mano y se echaron en cajas pequeñas para posteriormente ser transportadas a las instalaciones en donde serían vinificadas.

Se hizo un ANOVA con los resultados del análisis de las uvas de cada tratamiento y control, y se observó que eran homogéneas ya que no había diferencias significativas entre réplicas. Por lo tanto, se vinificaron las uvas de las réplicas 1 y 2 por un lado y las uvas de las réplicas 3 y 4 por otro, obteniendo así los vinos de cada tratamiento y control por duplicado.

Se siguieron los sistemas de vinificación clásicos de elaboración en tinto y en blanco tal como se detalla a continuación. No obstante, los volúmenes de elaboración fueron a menor escala en 2015 (250 mL) que en los demás años (2 L-7 L).

### 5.5.1. Vinificación de la variedad Cabernet Sauvignon

De las muestras recogidas en cada una de las parcelas (control y tratamiento), en el momento de vendimia, se tomaron 8 kg de uva para después vinificarlas de forma independiente. Es decir, de las uvas de las réplicas 1 y 2 se tomaron 4 kg y lo mismo para las réplicas 3 y 4.

Las uvas fueron despalilladas y estrujadas manualmente, obteniendo así una pasta uniforme de hollejo, pepita y jugo. A continuación, se añadieron 20 mg/kg de metabisulfito de potasio y se llenaron los tubos vinificadores de metacrilato de una capacidad de 7 L cada uno.

La vinificación se llevó a cabo en un fermentador multitubo (Martínez Solé and Cía, S.A., Villarrobledo, España), el cual



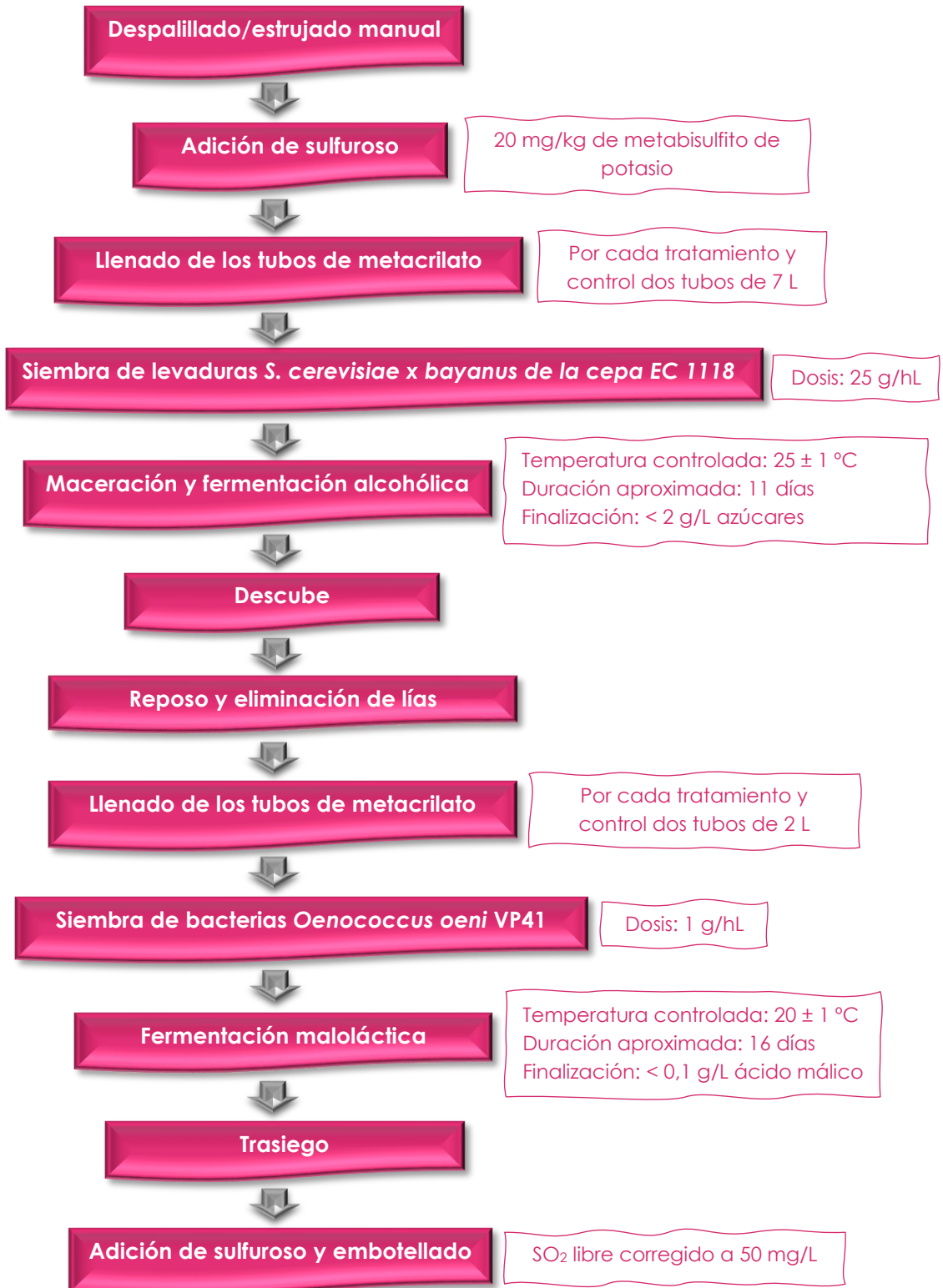
reproduce las condiciones de elaboración en bodega y permite el control de la temperatura. Al mosto se adicionó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* x *bayanus* de la cepa EC 1118, previamente acondicionada según las recomendaciones de la casa comercial (Lallemand, St Simon, Francia), en una dosis de 25 g/hL.

La temperatura durante la fermentación alcohólica se mantuvo en torno a los 25 °C y se controló diariamente junto al °Baumé y la densidad. La fermentación alcohólica se dio por finalizada cuando la concentración de azúcares reductores fue menor de 2 g/L y una vez acabada, se descubó y la parte sólida se prensó manualmente y se mezcló con el vino flor. El vino se dejó en reposo durante unos días, se eliminaron las lías y se echó en tubos de 2 L de capacidad, a una temperatura controlada de 20 °C, en donde tuvo lugar la fermentación maloláctica, que se indujo por la siembra de bacterias comerciales *Oenococcus oeni* VP41 (Lallemand, St Simon, Francia), en la dosis recomendada por el proveedor, 1 g/hL.

Durante la fermentación maloláctica, se realizó un seguimiento del pH, y del ácido málico por HPLC-RID de acuerdo con Martínez-Gil *et al.* (2013). Esta se consideró terminada cuando la concentración de ácido málico estuvo por debajo de 0,1 g/L. Entonces se corrigió la concentración de sulfuroso libre a 50 mg/L, y los vinos se embotellaron y congelaron a -18 °C para su posterior análisis.

En la Figura 24 se muestran las diferentes etapas del proceso de vinificación en tinto empleado para las uvas Cabernet Sauvignon.





**Figura 24.** Etapas del proceso de vinificación en tinto para la variedad Cabernet Sauvignon.



### **5.5.2. Vinificación de la variedad Macabeo**

De las uvas muestreadas el día de vendimia, se tomaron 5 kg de cada una de las parcelas (control y tratamiento) para después vinificarlas de forma independiente. Es decir, de las uvas de las réplicas 1 y 2 se tomaron 2,5 kg y lo mismo para las réplicas 3 y 4.

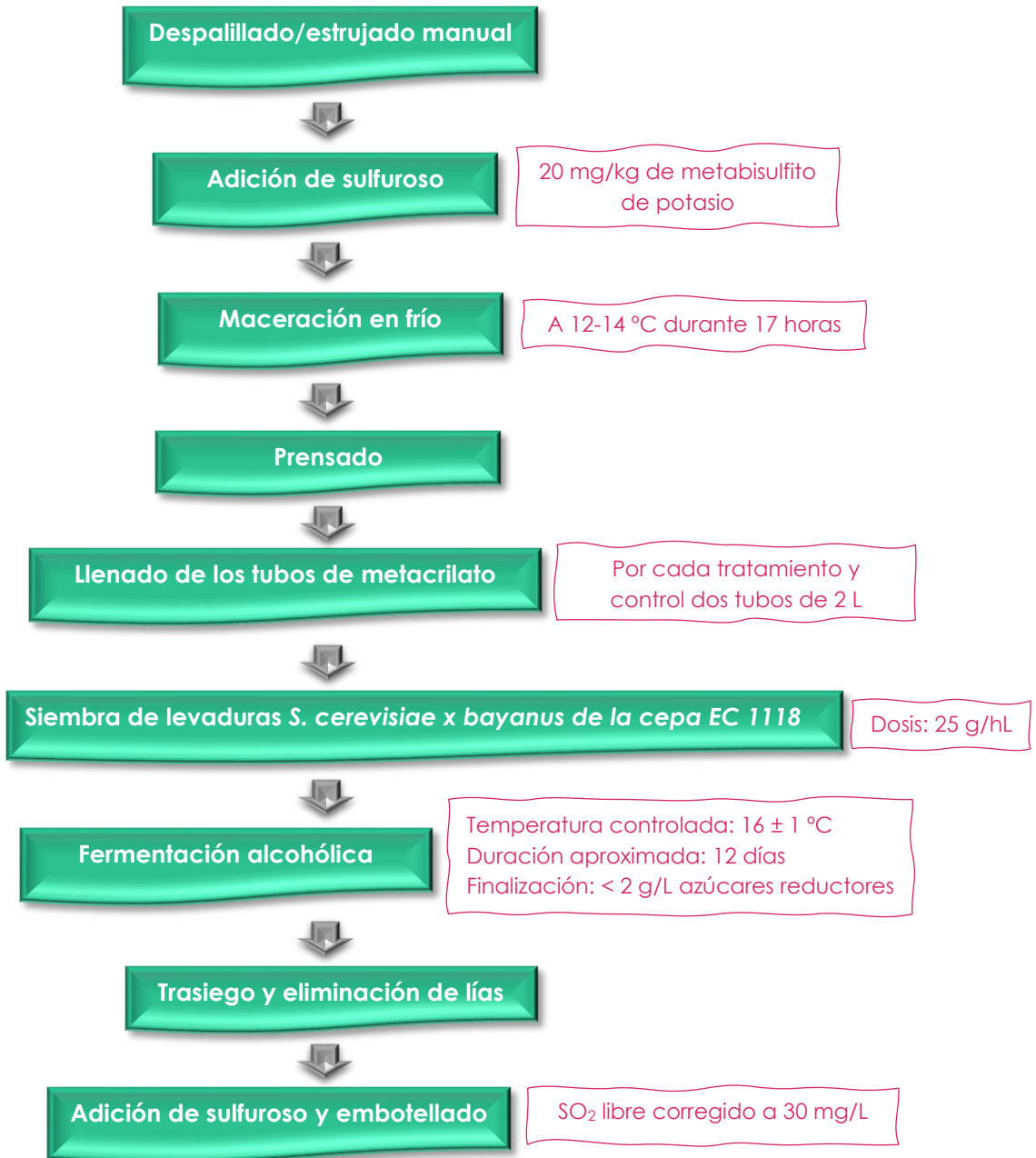
Las uvas fueron despallilladas y estrujadas manualmente, obteniendo así una pasta uniforme de hollejo, pepita y jugo. A continuación, se añadieron 20 mg/kg de metabisulfito de potasio y cada pasta de hollejo, pepita y jugo correspondiente a cada tratamiento y control, se echó en un recipiente de acero inoxidable de 10 L donde se dejó macerar durante 17 h a una temperatura de 12-14 °C. Después de esto, las pieles y semillas se eliminaron mediante prensado manual.

Se llenaron 2 tubos vinificadores de metacrilato de una capacidad de 2 L cada uno. La vinificación se realizó en un fermentador multitubo (Martínez Solé and Cía, S.A., Villarrobledo, España).

Se adicionó al mosto la levadura *Saccharomyces cerevisiae* x *bayanus* de la cepa EC 1118, en una dosis de 25 g/hL. Durante la fermentación alcohólica, la temperatura se mantuvo alrededor de los 16 °C y se controló diariamente junto al °Baumé y la densidad. Cuando la concentración de azúcares reductores fue menor de 2 g/L, la fermentación alcohólica se dio por finalizada. Entonces se realizó un trasiego con el que se eliminaron las lías y se corrigió la concentración de sulfuroso libre a 30 mg/L. Los vinos se embotellaron y congelaron a -18 °C para su posterior análisis.

En la Figura 25 se muestran las diferentes etapas del proceso de vinificación en blanco empleado para las uvas Macabeo, en las cosechas de 2016 y 2017.





**Figura 25.** Etapas del proceso de vinificación en blanco para la variedad Macabeo.



## 5.6. Métodos de análisis en uvas

A continuación, se describen los parámetros analizados en las uvas. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### 5.6.1. Parámetros enológicos convencionales

Los parámetros enológicos medidos en uvas fueron:

#### °Baumé

Se basa en la medida del índice de refracción y con ella se determina la proporción de sólidos solubles en un líquido, entre ellos los azúcares. La determinación se realizó con un refractómetro portátil digital Atago modelo PAL-3 (Minato-ku, Tokyo, Japón) siguiendo el compendio de métodos internacionales de análisis de vinos y mostos de la OIV (OIV, 2014).

#### pH

Es la medida del grado de acidez o alcalinidad de una disolución acuosa y se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno. Este parámetro se determinó potenciométricamente con un pHmetro Basic 20 (CRISON, Barcelona, España) siguiendo el compendio de métodos internacionales de análisis de vinos y mostos de la OIV (OIV, 2014).

#### Acidez total

Es la suma de los ácidos valorables del mosto o del vino cuando se lleva a pH 7 añadiendo una disolución alcalina valorada. Se determinó mediante valoración potenciométrica de 20 mL de muestra, a los que se les adicionó lentamente y con agitación constante una disolución de hidróxido de sodio 0,1 N hasta pH 7. Los resultados se expresan en g/L de ácido tartárico (OIV, 2014).



### 5.6.2. Madurez fenólica

Se siguió el método de Saint-Cricq *et al.* (1998) que se basa en la diferencia de extracción de los compuestos fenólicos de las uvas tintas a dos pH diferentes después de la rotura de las bayas. Este análisis, por tanto, se hizo sólo en las uvas de la variedad Cabernet Sauvignon.

Se utilizaron 200 granos de uva que fueron triturados con una batidora durante unos 30 segundos a velocidad lenta para evitar la rotura de las pepitas. Se tomaron dos muestras de 50 g del triturado. A una de ellas se le añadieron 50 mL de una disolución de ácido fosfórico a pH 3,4, de esta forma se extraen los compuestos fenólicos fácilmente extraíbles. A los otros 50 g de triturado se le adicionó 50 mL de una disolución de ácido oxálico a pH 1, que provoca la degradación de las células de la piel favoreciendo la extracción de los compuestos fenólicos. Se utilizó pH 3,4 en lugar de pH 3,2 porque es más adecuado para los mostos de Castilla-La Mancha. Las muestras se maceraron a temperatura ambiente durante 4 horas, agitando durante 10 segundos cada 30 minutos. Posteriormente, se procedió a su centrifugado para separar las partes sólidas. La medida del contenido fenólico de los extractos obtenidos se realizó mediante el análisis del índice de polifenoles totales (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982) y de los antocianos totales (Puissant and León, 1967).

El potencial fenólico se obtuvo a partir del método de Glories (1984) y Saint-Cricq *et al.* (1998) que permite la determinación del parámetro %EA o "extractabilidad antociánica" y el parámetro %MP o "contribución de taninos de las pepitas". Este método consiste en la medida espectrofotométrica de antocianos y polifenoles de las uvas en los extractos de pH 1 y 3,4, de manera que



los antocianos a pH 1 (ApH1) se asimilan a los totales de la uva y los antocianos a pH 3,4 (ApH3,4) se asimilan a los que serían extraídos durante la vinificación.

Los polifenoles totales a pH 3,4 (IPTpH3,4) se utilizan para conocer el aporte de los taninos de las semillas (o índice de madurez de las pepitas) mediante la expresión:

$$\%MP = \left[ \frac{IPTpH3,4 - ApH3,4 \times 40/1000}{IPTpH3,4} \right] \times 100$$

La extractabilidad antociánica (o índice de madurez celular) se calcula mediante la ecuación:

$$\%EA = \left[ \frac{ApH1 - ApH3,4}{ApH1} \right] \times 100$$

EA informa sobre la extractabilidad celular de los antocianos, de manera que cuanto menor sea su valor, más fácilmente extraíbles serán estos. MP informa sobre la presencia de los taninos de las pepitas, de modo que cuanto mayor sea su valor, mayor será esta contribución y mayor el riesgo de obtener vinos astringentes. Los análisis se efectuaron en un espectrofotómetro UV-Vis, Lambda 25 (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, EE. UU.).

### **5.6.3. Parámetros cromáticos**

Los parámetros cromáticos se midieron en un extracto obtenido tras triturar las uvas en una batidora y filtrar con un colador antes de centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. A continuación, se midieron las absorbancias a 420 nm, 520 nm y 620 nm (Glories, 1984). En el caso de la variedad Macabeo, al ser una variedad de uva blanca, sólo se midió la absorbancia a 420 nm. Las determinaciones espectrofotométricas se hicieron en un espectrofotómetro UV-Vis,





Lambda 25 (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut, EE. UU.) en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso de luz, después de que las muestras se pasaran por un filtro PVDF Durapore de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE. UU.).

A partir de estas medidas se calcularon los siguientes parámetros:

- Intensidad colorante = Abs 420 nm + Abs 520 nm + Abs 620 nm
- Tonalidad = Abs 420 nm / Abs 520 nm

#### **5.6.4. Índice de polifenoles totales (IPT)**

Se siguió el método descrito por Ribéreau-Gayon *et al.* (1982). Se basa en la medida de la absorbancia de la muestra a una longitud de onda de 280 nm, la cual corresponde al máximo de absorción para los compuestos que en sus cadenas presentan anillos bencénicos y, por tanto, incluye a los compuestos fenólicos. Se trituraron las uvas en una batidora y se filtró con un colador antes de centrifugar a 4000 rpm durante 5 minutos. Se tomó 1 mL de muestra en un matraz de 100 mL y se enrasó con agua. Una vez transcurridos 20 minutos se leyó la absorbancia de la muestra en una cubeta de cuarzo de 1 cm de espesor a 280 nm. El índice de polifenoles totales (IPT) se obtuvo multiplicando por 100 el valor de la absorbancia.

#### **5.6.5. Índice de potencial aromático varietal (IPAv)**

Para analizar la madurez aromática de las uvas, se determinó el índice de potencial aromático varietal (IPAv) utilizando el Kit comercial disponible (Kit IPAv, Teknokroma, Barcelona, España). Para ello, se trituraron 50 g de uva en 50 g de una solución al 50% de etanol/agua (v/v). El extracto obtenido se maceró en un microondas NEOS durante 1 min a 75 °C según Serrano de la Hoz *et*



al. (2014). Este método se basa en Salinas *et al.* (2012b), pero con determinación espectrofotométrica de la glucosa liberada por hidrólisis ácida de los precursores aromáticos glicosilados. Este parámetro es una medida global de precursores aromáticos glicosilados que abarcan principalmente agliconas volátiles como alcoholes, terpenos, fenoles y C13-norisoprenoides.

#### **5.6.6. Determinación de compuestos volátiles**

Se utilizó la técnica denominada Stir Bar Sorptive Extraction en la modalidad de espacio de cabeza (HS-SBSE) de acuerdo con el método propuesto para volátiles en uvas de Martínez-Gil *et al.* (2011).

Se usó un vial específico denominado “twister-headspace” que tiene un soporte (inserto) para colocar el twister en el espacio de cabeza de la muestra. Se colocaron 22 mL de muestra en un vial de 50 mL y se le añadió 0,1 g de NaCl por mL de muestra y 10  $\mu$ L por cada mL de muestra del patrón 3-metil-1-pentanol. En el inserto del espacio de cabeza se colocó un twister de 10 mm de longitud y 0,5 mm de espesor (Gerstel, Mülheim and der Ruhr, Alemania) y se cerró el vial herméticamente con ayuda de una selladora. A continuación, el vial se introdujo en una estufa a 60 °C y se agitó durante 1 hora a 500 rpm. Posteriormente el twister se sacó, se lavó con agua Milli-Q, se secó con un papel de celulosa y se introdujo en el tubo de desorción térmica para su posterior análisis por GC-MS.

La desorción de los compuestos volátiles extraídos por el twister se llevó a cabo en un equipo de desorción térmica (TDU, Gerstel, Mülheim and der Ruhr, Alemania) acoplado a un cromatógrafo de gases (GC) Agilent 7890A provisto de un detector de espectrometría de masas de ionización electrónica Agilent 5975C



(MS, Agilent Technologies, Palo Alto, California, EE. UU.) y provisto de una columna capilar de sílice fundida BP21 (SGE, Ringwood, Australia) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor.

El gas portador fue helio con una presión de columna constante de 20,75 psi. La desorción de los compuestos volátiles absorbidos en el twister se llevó a cabo a 295 °C durante 5 minutos con un flujo de helio de 75 mL/min. La temperatura inicial fue de 40 °C y se aplicó una rampa de 60 °C/min hasta alcanzar los 295 °C. Los analitos se introdujeron en un inyector de vaporización a temperatura programada (CIS-4, Gerstel, Mülheim and der Ruhr, Alemania) de -40 °C a 260 °C con una rampa de 12 °C/min. Los volátiles se transfirieron a la columna analítica que trabajó con las siguientes condiciones cromatográficas: temperatura inicial de 40 °C, que se mantuvo durante 2 minutos, posteriormente se elevó hasta 80 °C a 5 °C/min y se mantuvo durante 2 minutos, a continuación se elevó hasta 130 °C a 10 °C/min durante 5 minutos, se siguió elevando hasta 150 °C a 5 °C/min durante 5 minutos y finalmente se aplicó una rampa de 10 °C/min hasta alcanzar 230 °C, que se mantuvo durante 5 minutos. La detección se hizo a 70 eV y la identificación se realizó utilizando la librería NIST del cromatógrafo, y por comparación con los espectros de masas de los patrones comerciales de todos los volátiles analizados (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) y con sus tiempos de retención.

La cuantificación se realizó usando rectas de calibrado que se obtuvieron a partir de disoluciones patrón a cinco concentraciones diferentes que variaron de forma genérica entre 0,03  $\mu\text{g/L}$  y 80 mg/L, aunque para cada compuesto se tuvieron en cuenta las concentraciones indicadas en la bibliografía, obteniéndose valores



de  $R^2=0,95-0,97$ . Las disoluciones de los patrones se prepararon en un mosto sintético preparado con 150 g/L de glucosa+fructosa y 6 g/L de ácido tartárico a pH 3,6 ajustado con NaOH 10 M.

En la Tabla 14 se muestran los tiempos de retención, iones mayoritarios y las rectas de calibrado de los compuestos volátiles buscados en las uvas.



**Tabla 14.** Tiempos de retención, iones mayoritarios y rectas de calibrado de los compuestos volátiles de las uvas.

Compuesto	TR	m/z	Recta (µg/L)	R <sup>2</sup>
D-Limoneno	6,60	69	$y = 5,334 x - 0,008$	0,9816
<i>Trans</i> -2-Hexenal	7,18	41	$y = 0,913 x - 0,012$	0,9994
1-Hexanol	10,71	56	$y = 0,9154 x + 0,0963$	0,9945
<i>Cis</i> -3-Hexen-1-ol	11,65	67	$y = 0,4533 x - 0,0042$	0,9989
Nonanal	11,94	57	$y = 10,480 x - 0,003$	0,9989
<i>Trans</i> -2-Hexen-1-ol	12,46	57	$y = 0,6403 x - 0,0880$	0,9995
Óxido de linalol	13,30	59	$y = 1,505 x - 0,004$	0,9937
1-Octen-3-ol	13,72	57	$y = 23,8600 x - 0,0008$	0,9999
Citronelal	14,34	69	$y = 0,3906 x - 0,0152$	0,9710
Benzaldehído	15,26	106	$y = 2,7300 x - 0,0006$	0,9986
Linalol	15,83	71	$y = 9,886 x - 0,004$	0,9997
Acetato de linalol	15,96	93	$y = 30,540 x - 0,024$	0,9947
$\alpha$ -Terpineol	18,39	59	$y = 1,228 x - 0,008$	0,9959
$\beta$ -Damascona	19,29	177	$y = 1,058 x - 0,001$	0,9979
Citronelol	19,97	69	$y = 2,8530 x - 0,0008$	0,9964
Nerol	20,88	69	$y = 1,535 x - 0,002$	0,9979
$\beta$ -Damascenona	21,13	121	$y = 35,330 x + 0,003$	0,9990
$\alpha$ -Ionona	22,18	121	$y = 36,880 x - 0,001$	0,9987
Geraniol	22,33	69	$y = 1,8800 x - 0,0004$	0,9985
Geranil acetona	22,49	43	$y = 21,540 x - 0,007$	0,9992
Guayacol	22,72	109	$y = 0,4564 x - 0,0003$	0,9975
Dihidrocinnamato de etilo	23,37	104	$y = 11,350 x - 0,014$	0,9993
$\beta$ -Ionol	24,26	205	$y = 0,3212 x + 0,0002$	0,9959
$\beta$ -Ionona	24,76	177	$y = 28,1100 x - 0,0003$	0,9989
Nerolidol	26,75	69	$y = 4,9020 x + 0,0005$	0,9999
4-Etilguayacol	27,54	137	$y = 1,638 x - 0,011$	0,9938
Cinamato de etilo	31,01	131	$y = 16,9100 x - 0,0007$	0,9975
Eugenol	32,43	164	$y = 0,5964 x - 0,0007$	0,9944
4-Etilfenol	32,77	107	$y = 0,8428 x - 0,0003$	0,9983
4-Vinilguayacol	33,26	150	$y = 0,573 x - 0,005$	0,9925
Farnesol	36,27	69	$y = 1,024 x + 0,015$	0,9945
Vainillina	38,87	151	$y = 0,03907 x + 0,01592$	0,9962
Vainillato de metilo	39,30	151	$y = 0,078 x - 0,004$	0,9922
Vainillato de etilo	39,61	151	$y = 0,08555 x - 0,00312$	0,9949
Acetovainillona	39,69	151	$y = 0,07577 x - 0,00154$	0,9971

TR: tiempo de retención (min); m/z: ión mayoritario; y: concentración en µg/L; x: relación entre el área del compuesto analizado y el área del patrón interno.



### **5.6.7. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular**

La composición fenólica pormenorizada se analizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de acuerdo al método de Pardo-García *et al.* (2014), utilizando un cromatógrafo Agilent 1200 (HPLC, Palo Alto, California, EE. UU.) equipado con un detector de diodos alineados (DAD, Agilent G1315D). Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de mosto directamente en el cromatógrafo tras haber sido filtrado con un filtro PVDF Durapore de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE. UU.).

Se utilizó una columna Zorbax-Eclipse XDB-C18 de fase inversa (4,6 mm x 150 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ) y una precolumna del mismo material a 30 °C. Los disolventes utilizados fueron agua/ácido fórmico/acetonitrilo (97,5; 1,5; 1; v/v/v) como disolvente A y acetonitrilo/ácido fórmico/disolvente A (78,5; 1,5; 20; v/v/v) como disolvente B. El gradiente de elución para el disolvente B fue el siguiente: 0 min, 5%; 2 min, 10%; 7 min, 14,5%; 10 min, 18,5%; 12 min, 20%; 17 min, 20%; 28 min, 30%; 30 min, 30%; 32 min, 50,5%; 38 min, 80%; 40 min, 100%. El sistema se equilibró con las condiciones de inicio durante 10 minutos antes de la inyección de la siguiente muestra. El caudal fue de 0,5 mL/min.

Los compuestos se identificaron mediante comparación con los espectros UV-Vis correspondientes y el tiempo de retención de los patrones comerciales disponibles (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania). Los flavonoles y antocianinas, cuyos patrones comerciales no estaban disponibles, se identificaron en función de su ion molecular, los espectros UV-Vis y el orden de elución según Pardo-García *et al.* (2014).



Se utilizaron diferentes longitudes de onda para los diferentes compuestos, así: los ácidos siríngico, gálico, y los flavanoles (+) catequina y (-) epicatequina se determinaron a 280 nm, los ácidos *t*-cafeico y ferúlico a 324 nm, el ácido *t*-*p*-cutárico a 308 nm, los flavonoles a 365 nm y las antocianinas a 520 nm. Todos los ácidos y flavanoles se cuantificaron con sus patrones correspondientes pero los flavonoles glucosilados y la miricetina se cuantificaron como equivalentes de quercetina, el ácido *t*-*p*-cutárico como ácido *t*-*p*-cumárico y las antocianinas como equivalentes de malvidina-3-O-glucósido.

Para la cuantificación se utilizaron rectas de calibrado que se obtuvieron a partir de disoluciones patrón a cinco concentraciones diferentes que variaron de forma genérica desde 0,03 mg/L a 250,5 mg/L, aunque para cada compuesto se tuvieron en cuenta las concentraciones indicadas en la bibliografía, obteniéndose valores de  $R^2=0,92-0,99$ . Las disoluciones de los patrones se prepararon en un vino sintético que consistió en una disolución hidroalcohólica al 12,5% (v/v) preparada con 5 g/L de ácido tartárico a pH 3,6 ajustado con NaOH 10 M.

En la Tabla 15 se muestran las longitudes de onda, los tiempos de retención y las ecuaciones de las rectas obtenidas en la calibración de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular.



**Tabla 15.** Longitudes de onda ( $\lambda$ ), tiempos de retención y rectas de calibrado de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

Compuesto	$\lambda$ (nm)	TR	Recta (mg/L)	R <sup>2</sup>
Ácido gálico	280	6,00	$y = 0,0111 x - 0,4059$	0,9888
Ácido <i>t</i> -cafeico	324	15,28	$y = 0,0047 x - 0,1353$	1,0000
Ácido vanílico	256	15,40	$y = 0,0077 x - 0,0131$	0,9999
Ácido siríngico	280	16,22	$y = 0,0076 x + 0,2128$	0,9993
Ácido <i>t-p</i> -cumárico	308	20,47	$y = 0,0032 x + 0,1152$	0,9989
Ácido ferúlico	324	23,86	$y = 0,0049 x - 0,8537$	1,0000
Ácido sinápico	324	23,86	$y = 0,0055 x - 1,6448$	0,9997
Ácido <i>t</i> -caftárico	324	11,08	$y = 0,0047 x - 0,1353$	1,0000
Ácido <i>t-p</i> -cutárico	308	14,65	$y = 0,0032 x + 0,1152$	0,9989
<i>t</i> -Resveratrol	308	34,69	$y = 0,0032 x + 0,2828$	0,9977
Piceido de <i>t</i> -resveratrol	308	22,31	$y = 0,0041 x + 0,5791$	0,9845
(+) Catequina	280	12,77	$y = 0,0530 x + 0,7189$	0,9992
(-) Epicatequina	280	15,88	$y = 0,0511 x + 0,4969$	0,9988
*Delfinidina 3-O-glucósido	520	11,79	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Cianidina 3-O-glucósido	520	13,64	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Petunidina 3-O-glucósido	520	14,40	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Peonidina 3-O-glucósido	520	16,10	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Malvidina 3-O-glucósido	520	16,60	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Petunidina 3-O-(6'-O-acetil)-glucósido	520	22,42	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Peonidina 3-O-(6'-acetil)-glucósido	520	26,63	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Malvidina 3-O-(6'-acetil)-glucósido	520	27,20	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Malvidina 3-(6'- <i>t</i> -cafeoil)-glucósido	520	29,30	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Cianidina-3 (6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	520	29,85	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Petunidina 3-(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	520	30,35	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Malvidina 3-(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	520	33,05	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Vitisina A Malvidina-3-O-glucósido	520	18,02	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
*Vitisina B Malvidina-3-O-glucósido	520	19,53	$y = 0,0123 x + 0,2464$	0,9981
Quercetina	365	36,79	$y = 0,0034 x + 0,0443$	0,9961
Miricetina	365	31,63	$y = 0,0034 x + 0,0443$	0,9961
Kaempferol	365	38,71	$y = 0,0034 x + 0,0443$	0,9961
Miricetina 3-O-galactósido	365	18,20	$y = 0,0034 x + 0,0443$	0,9961
Miricetina 3-O-(glucurónido+glucósido) <sup>a</sup>	365	18,47-18,58	$y = 0,0034 x + 0,0443$	0,9961
Quercetina 3-O-galactósido	365	23,15	$y = 0,0034 x + 0,0443$	0,9961
Quercetina 3-O-(glucurónido+glucósido) <sup>b</sup>	365	24,05-24,11	$y = 0,0034 x + 0,0443$	0,9961
Laricitrina 3-O-(glucósido/galactósido) <sup>c</sup>	365	24,57	$y = 0,0034 x + 0,0443$	0,9961
Kaempferol 3-O-glucósido	365	28,71	$y = 0,0034 x + 0,0443$	0,9961
Siringetina 3-O-glucósido	365	29,57	$y = 0,0034 x + 0,0443$	0,9961

TR: tiempo de retención (min); y: concentración en mg/L; x: área del compuesto analizado; \*Las antocianinas sólo se buscaron en la variedad Cabernet Sauvignon; <sup>a</sup> Miricetina 3-O-glucurónido y Miricetina 3-O-glucósido, compuestos coeluidos; <sup>b</sup> Quercetina 3-O-glucurónido y Quercetina 3-O-glucósido, compuestos coeluidos; <sup>c</sup> Puede ser glucósido o galactósido de laricitrina.





## 5.7. Métodos de análisis en vinos

A continuación, se describen los parámetros analizados en los vinos. Todos los análisis se realizaron por duplicado.

### 5.7.1. Parámetros enológicos convencionales

El grado alcohólico, el pH, la acidez total (g/L de ácido tartárico) y la acidez volátil (g/L de ácido acético) se analizaron en un equipo basado en la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FT-IR Multispec, TDI, Barcelona, España) usando el compendio de métodos internacionales de análisis de vinos y mostos de la OIV (OIV, 2014).

El sulfuroso libre y total se determinó con un valorador modelo ENO 20 ECO (TDI, Barcelona, España). El método se basa en una valoración yodométrica del sulfuroso del vino según el compendio de métodos internacionales de análisis de vinos y mostos de la OIV (OIV, 2014). El sulfuroso combinado se obtiene por diferencia entre el sulfuroso total y el libre.

### 5.7.2. Parámetros cromáticos

Todos ellos se determinaron con la ayuda de un espectrofotómetro UV-Vis, Lambda 25 (Perkin-Elmer, Norwalk, Connecticut) en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso de luz, después de que las muestras se pasaran por un filtro PVDF Durapore de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE. UU.).

Los parámetros de intensidad colorante y tonalidad se obtuvieron según se indicó en el apartado 5.6.3.

Los parámetros cromáticos relativos al espacio de color CIELAB se calcularon a partir de las medidas de transmitancia cada 5 nm



del espectro de los vinos entre 380 y 780 nm. Los resultados se procesaron mediante el programa informático “color en vinos” de Perkin-Elmer Hispania (Madrid, España), obteniéndose: la coordenada rojo/verde ( $a^*$ ), la coordenada amarillo/azul ( $b^*$ ), la claridad ( $L^*$ ), el croma ( $C^*$ ) y la tonalidad ( $H^*$ ). Las diferencias cromáticas entre vinos se calcularon utilizando la siguiente expresión (Alcalde-Eon *et al.*, 2019):

$$\Delta E_{ab^*} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

### **5.7.3. Índice de polifenoles totales (IPT)**

Se determinó como se ha indicado en el apartado 5.6.4. utilizando 1 mL de vino.

### **5.7.4. Índice de potencial aromático varietal (IPAv)**

Para determinar el IPAv de los vinos, se utilizó el mismo Kit comercial que se indicó en el apartado 5.6.5. Para ello, se tomó una muestra de vino y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. Se diluyó con etanol/agua al 50% (v/v) según Serrano de la Hoz *et al.* (2014) y para las determinaciones se usó el mismo espectrofotómetro indicado anteriormente.

### **5.7.5. Determinación de compuestos volátiles**

Los compuestos volátiles de los vinos se determinaron según el método de Sánchez-Gómez *et al.* (2016). Este método se basa en la técnica por Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) empleando un twister de 10 mm de longitud y 0,5 mm de espesor (Gerstel, Mülheim and der Ruhr, Alemania) mediante inmersión en la muestra. El twister se introdujo en 25 mL de vino, al que se le añadió, como patrón interno,



62,5  $\mu\text{L}$  de 3-metil-1-pentanol (preparado en una concentración de 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  en etanol absoluto). Después de agitar la muestra a 500 rpm a temperatura ambiente durante 60 minutos, el twister se sacó, se lavó con agua Milli-Q, se secó con un papel de celulosa y se introdujo en el tubo de desorción térmica para su posterior análisis por GC-MS.

En el apartado 5.6.6. se detallan los aspectos relacionados con la determinación de los compuestos volátiles.

Las disoluciones de los patrones se prepararon en un vino sintético que consistió en una disolución hidroalcohólica al 12,5% (v/v) preparada con 5 g/L de ácido tartárico a pH 3,6 ajustado con NaOH 10 M.

Las concentraciones fueron de 0,01  $\mu\text{g}/\text{L}$  hasta 400 mg/L, pero cada compuesto tuvo su rango de concentración según lo indicado en la bibliografía para vinos.

En la Tabla 16 se muestran los tiempos de retención, los iones mayoritarios y las rectas de calibrado de los compuestos volátiles buscados en los vinos.



**Tabla 16.** Tiempos de retención, iones mayoritarios y rectas de calibrado de los compuestos volátiles de los vinos.

Compuesto	TR	m/z	Recta (µg/L)	R <sup>2</sup>
Acetato de etilo	2,06	43	$y = 0,8196 x - 0,2945$	0,9878
Butirato de etilo	3,59	88	$y = 10,330 x - 0,005$	0,9950
Acetato de isoamilo	5,13	43	$y = 49,01 x - 0,04$	0,9844
Alcoholes amílicos*	6,96	57	$y = 0,2383 x + 0,0083$	0,9968
Hexanoato de etilo	7,66	101	$y = 51,10 x - 0,08$	0,9906
Acetato de hexilo	8,64	43	$y = 287,60 x - 0,18$	0,9902
1-Hexanol	10,77	56	$y = 1,552 x - 0,694$	0,9940
Trans-2-Hexen-1-ol	12,54	57	$y = 0,8766 x - 0,4213$	0,9954
Octanoato de etilo	13,30	101	$y = 270,50 x - 0,72$	0,9946
Óxido de linalol	13,36	59	$y = 1,936 x + 0,006$	0,9951
Linalol	15,87	71	$y = 38,30 x - 0,09$	0,9872
Acetato de linalol	15,99	93	$y = 595,90 x - 0,92$	0,9912
Decanoato de etilo	17,37	101	$y = 457,9 x - 1,4$	0,9942
Fenilacetaldéhid	17,48	91	$y = 104,70 x - 0,18$	0,9777
$\alpha$ -Terpineol	18,42	59	$y = 6,086 x - 0,034$	0,9866
$\beta$ -Damascona	19,31	177	$y = 14,96 x - 0,09$	0,9861
Citronelol	20,03	69	$y = 36,170 x - 0,002$	0,9853
Nerol	20,89	69	$y = 13,67 x - 0,04$	0,9952
$\beta$ -Damascenona	21,16	121	$y = 6181,0 x - 1,1$	0,9738
Acetato de 2-feniletilo	21,35	104	$y = 193,80 x + 0,08$	0,9841
$\alpha$ -Ionona	22,22	121	$y = 1472,0 x - 0,2$	0,9949
Ácido hexanoico	22,32	60	$y = 0,3004 x + 0,0058$	0,9969
Geraniol	22,41	69	$y = 24,91 x - 0,02$	0,9847
Geranil acetona	22,52	43	$y = 662,50 x - 0,84$	0,9911
Guayacol	22,81	109	$y = 1,232 x + 0,002$	0,9996
Dihidrocinamato de etilo	23,41	104	$y = 270,40 x - 0,16$	0,9993
2-Feniletanol	24,21	91	$y = 1,557 x - 0,018$	0,9829
$\beta$ -Ionol	24,29	205	$y = 1,296 x + 0,018$	0,9759
$\beta$ -Ionona	24,79	177	$y = 5983,0 x - 0,8$	0,9809
Nerolidol	28,03	69	$y = 392,90 x - 0,68$	0,9887
Ácido octanoico	28,79	60	$y = 7,031 x - 0,070$	0,9913
Cinamato de etilo	31,09	131	$y = 1576,0 x - 0,1$	0,9716
Eugenol	32,52	164	$y = 19,30 x - 0,02$	0,9866
4-Vinilguayacol	33,35	150	$y = 16,53 x - 0,03$	0,9938
Ácido decanoico	35,03	60	$y = 58,96 x - 0,03$	0,9746
Farnesol	36,34	69	$y = 185,2 x - 0,1$	0,9853
Vainillina	38,93	151	$y = 0,4263 x + 0,0118$	0,9909
Vainillato de etilo	39,67	151	$y = 6,918 x + 0,144$	0,9935

TR: tiempo de retención (min); m/z: ion mayoritario; y: concentración en µg/L; x: relación entre el área del compuesto analizado y el área del patrón interno; \* 2-Metil-1-butanol y 3-Metil-1-butanol, compuestos coeluidos.



### **5.7.6. Determinación de compuestos fenólicos de bajo peso molecular**

La composición fenólica pormenorizada se analizó de acuerdo al método de Pardo-García *et al.* (2014). Se inyectaron 20  $\mu\text{L}$  de vino directamente en el cromatógrafo tras haber sido filtrado con un filtro PVDF Durapore de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE. UU.).

En el apartado 5.6.7. se detallan los aspectos relacionados con la determinación de los compuestos fenólicos de bajo peso molecular.

### **5.7.7. Determinación de azúcares, ácidos y glicerol**

La determinación de glucosa, fructosa, ácido tartárico, ácido láctico y glicerol se realizó de acuerdo al método propuesto por Martínez-Gil *et al.* (2013), utilizando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución Agilent 1100 (HPLC, Palo Alto, California, EE. UU.) equipado con un detector de índice de refracción (Agilent 1200, Palo Alto, California, EE. UU.). La separación cromatográfica se realizó en una columna PL Hi-Plex H (Varían, Middelburg, Holanda) con un tamaño de partícula de 8  $\mu\text{m}$  (300 x 7,7 mm). La fase móvil fue ácido sulfúrico 0,004 M con un flujo de 0,4 mL/min. La temperatura del horno se mantuvo a 75 °C y el detector a 55 °C. Los vinos se pasaron por un filtro PVDF Durapore de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore, Bedford, Massachusetts, EE. UU.) y se inyectó un volumen de muestra de 10  $\mu\text{L}$ . El tiempo total de análisis fue de 30 minutos.

La identificación se basó en los tiempos de retención y la cuantificación se hizo a partir de rectas de calibrado ( $R^2 > 0,97$ ) de



las disoluciones acuosas de los patrones comerciales de cada uno de los compuestos (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

En la Tabla 17 se muestran los tiempos de retención y las rectas de calibrado de los diferentes compuestos analizados.

**Tabla 17.** Tiempos de retención y rectas de calibrado de azúcares, ácidos y glicerol.

Compuesto	TR	Recta (g/L)	R <sup>2</sup>
Glucosa	17,10	$y = 5 \cdot 10^{-6} x + 0,0140$	0,99
Fructosa	18,20	$y = 5 \cdot 10^{-6} x + 0,0018$	0,99
Ácido tartárico	16,10	$y = 5 \cdot 10^{-6} x + 0,2095$	0,99
Ácido láctico	22,90	$y = 7 \cdot 10^{-6} x + 0,2651$	0,99
Glicerol	23,90	$y = 6 \cdot 10^{-6} x + 0,1134$	0,99

TR: tiempo de retención (min); y: concentración en g/L; x: área del compuesto analizado.

### 5.7.8. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos, tanto de uvas como de vinos, se realizó mediante el programa SPSS (Versión 24.0, IBM Corp., Chicago, EE. UU.). Se hicieron análisis de la varianza (ANOVA) para comparar las diferencias entre medias con el test Tukey-b para un nivel de probabilidad del 95% ( $p \leq 0,05$ ).



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---





## **6.1. Uvas**

### **6.1.1. Cabernet Sauvignon**

#### **6.1.1.1. Seguimiento de la maduración**

Aunque el estudio abarcó tres cosechas, 2015, 2016 y 2017, el seguimiento de la maduración se realizó sólo durante las cosechas de 2016 y 2017. Concretamente se realizaron 4 muestreos representativos, de cada una de las parcelas, en diferentes estados de madurez.

En la Tabla 18 se muestran los resultados correspondientes a los análisis llevados a cabo en las uvas de la cosecha de 2016 y en la Tabla 19 los referentes a la cosecha de 2017.





**Tabla 18.** Evolución de los parámetros enológicos convencionales, índice de polifenoles totales y parámetros cromáticos de uvas Cabernet Sauvignon en la cosecha de 2016.

	23/09/2016			26/09/2016			30/09/2016			06/10/2016		
	C2	T2	T3	C2	T2	T3	C2	T2	T3	C2	T2	T3
<i>Parámetros enológicos convencionales e IPT</i>												
P100 bayas	90,35 ± 0,21a	89,35 ± 0,92a	86,15 ± 1,63a	85,00 ± 2,26a	86,80 ± 0,42a	85,70 ± 2,97a	100,05 ± 11,24a	117,85 ± 6,15a	101,10 ± 8,63a	99,50 ± 1,05a	98,75 ± 1,12a	97,75 ± 1,20a
°Bé	13,20 ± 0,01c	11,50 ± 0,12a	11,75 ± 0,06b	14,10 ± 0,14a	13,75 ± 0,21a	14,60 ± 0,28a	15,25 ± 0,07a	14,80 ± 0,57a	14,50 ± 0,14a	15,40 ± 0,01b	14,50 ± 0,01a	14,82 ± 0,01a
pH	3,64 ± 0,16b	3,03 ± 0,01a	2,92 ± 0,02a	3,71 ± 0,01b	3,36 ± 0,03a	3,39 ± 0,10a	3,87 ± 0,01b	3,62 ± 0,10a	3,85 ± 0,01b	4,02 ± 0,04b	3,76 ± 0,01a	3,97 ± 0,02b
AT	3,28 ± 0,13a	4,22 ± 0,13b	4,43 ± 0,05b	3,34 ± 0,05a	3,71 ± 0,16b	3,98 ± 0,05b	3,17 ± 0,11a	3,41 ± 0,16a	3,43 ± 0,08a	3,09 ± 0,11a	3,86 ± 0,03b	3,11 ± 0,03a
°Bé/AT	4,03 ± 0,13b	2,73 ± 0,04a	2,66 ± 0,04a	4,17 ± 0,05c	3,16 ± 0,14b	2,82 ± 0,03a	4,17 ± 0,11c	3,50 ± 0,11a	3,77 ± 0,05b	4,98 ± 0,14c	3,76 ± 0,02a	4,77 ± 0,03b
IPT	24,74 ± 0,61b	20,91 ± 0,05a	21,00 ± 0,32a	15,52 ± 0,18b	11,44 ± 0,08a	11,47 ± 0,25a	16,32 ± 0,09b	13,93 ± 0,17a	18,09 ± 0,21c	-	-	-
<i>Parámetros cromáticos</i>												
A420	0,10 ± 0,00a	0,11 ± 0,00b	0,12 ± 0,00c	0,10 ± 0,00b	0,07 ± 0,00a	0,07 ± 0,00a	0,14 ± 0,00c	0,06 ± 0,00a	0,08 ± 0,00b	0,07 ± 0,00a	0,10 ± 0,00b	0,12 ± 0,00b
A520	0,19 ± 0,00a	0,26 ± 0,00b	0,28 ± 0,00c	0,19 ± 0,01b	0,14 ± 0,01a	0,14 ± 0,01a	0,26 ± 0,01b	0,12 ± 0,00a	0,11 ± 0,00a	0,11 ± 0,01a	0,21 ± 0,01b	0,25 ± 0,01b
A620	0,03 ± 0,00b	0,03 ± 0,00a	0,03 ± 0,00c	0,03 ± 0,00b	0,02 ± 0,00a	0,02 ± 0,00a	0,04 ± 0,00c	0,01 ± 0,00a	0,02 ± 0,00b	0,02 ± 0,00a	0,03 ± 0,00b	0,04 ± 0,00b
IC	3,26 ± 0,02a	3,96 ± 0,02b	4,28 ± 0,01c	3,24 ± 0,02b	2,24 ± 0,09a	2,24 ± 0,10a	4,40 ± 0,10c	1,85 ± 0,01a	2,10 ± 0,01b	2,02 ± 0,0a	3,43 ± 0,01b	4,02 ± 0,01c
T	0,52 ± 0,00c	0,42 ± 0,00a	0,42 ± 0,00b	0,52 ± 0,01c	0,50 ± 0,02b	0,47 ± 0,01a	0,52 ± 0,01b	0,48 ± 0,01a	0,67 ± 0,01c	0,63 ± 0,01b	0,49 ± 0,01a	0,47 ± 0,01a

P100bayas: peso de 100 bayas (g); °Bé: grados Baumé; AT: acidez total (g/L de ácido tartárico); IPT: índice de polifenoles totales; A420, 520, 620: absorbancias a 420, 520 y 620 nm; IC: intensidad colorante; T: tonalidad; C2: cepas tratadas (sin tratar); T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=4) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y punto de muestreo, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p<0,05).



**Tabla 19.** Evolución de los parámetros enológicos convencionales, índice de polifenoles totales y parámetros cromáticos de uvas Cabernet Sauvignon en la cosecha de 2017.

	30/08/2017			04/09/2017			07/09/2017			11/09/2017		
	C3	T4	T5	C3	T4	T5	C3	T4	T5	C3	T4	T5
<i>Parámetros enológicos convencionales e IPT</i>												
P100 bayas	93,00 ± 2,69a	78,60 ± 6,93a	76,55 ± 1,34a	90,65 ± 4,03a	92,50 ± 7,78a	79,85 ± 2,19a	76,79 ± 3,70a	89,65 ± 1,34b	83,30 ± 0,42ab	88,38 ± 3,08a	93,28 ± 0,81a	85,50 ± 4,71a
°Bé	13,65 ± 0,06c	11,40 ± 0,01a	12,20 ± 0,01b	13,40 ± 0,01b	12,00 ± 0,01a	13,70 ± 0,01c	13,80 ± 0,01c	12,20 ± 0,01a	13,25 ± 0,06b	15,20 ± 0,01c	12,60 ± 0,01a	13,40 ± 0,01b
pH	3,55 ± 0,01c	3,29 ± 0,01a	3,44 ± 0,01b	3,70 ± 0,01c	3,26 ± 0,01a	3,47 ± 0,01b	3,46 ± 0,01c	3,35 ± 0,01b	3,33 ± 0,01a	3,84 ± 0,01b	3,60 ± 0,01a	3,82 ± 0,01b
AT	4,14 ± 0,03a	5,10 ± 0,01c	4,33 ± 0,03b	3,32 ± 0,03a	4,18 ± 0,03b	3,41 ± 0,11a	2,40 ± 0,01a	2,48 ± 0,05a	3,13 ± 0,08b	2,93 ± 0,01a	3,54 ± 0,03b	2,94 ± 0,03a
°Bé/AT	3,29 ± 0,01c	2,24 ± 0,01a	2,82 ± 0,01b	4,04 ± 0,03b	2,87 ± 0,01a	4,01 ± 0,10b	5,75 ± 0,01c	4,93 ± 0,09b	4,23 ± 0,07a	5,19 ± 0,01c	3,56 ± 0,02a	4,56 ± 0,03b
IPT	17,89 ± 0,46b	14,80 ± 0,03a	15,22 ± 0,05a	13,01 ± 0,04b	10,43 ± 0,06a	13,22 ± 0,39b	13,88 ± 0,32a	14,92 ± 0,20b	14,89 ± 0,02b	-	-	-
<i>Parámetros cromáticos</i>												
A420	0,08 ± 0,00c	0,07 ± 0,00b	0,07 ± 0,00a	0,09 ± 0,00c	0,04 ± 0,00a	0,07 ± 0,00b	0,04 ± 0,00a	0,04 ± 0,00a	0,04 ± 0,00a	0,06 ± 0,00b	0,04 ± 0,00a	0,05 ± 0,00a
A520	0,16 ± 0,00c	0,15 ± 0,00b	0,13 ± 0,00a	0,09 ± 0,00c	0,06 ± 0,00a	0,07 ± 0,00b	0,03 ± 0,00a	0,04 ± 0,00b	0,04 ± 0,00b	0,07 ± 0,00b	0,04 ± 0,00a	0,04 ± 0,00a
A620	0,02 ± 0,00c	0,01 ± 0,00a	0,01 ± 0,00b	0,04 ± 0,01c	0,00 ± 0,00a	0,02 ± 0,01b	0,01 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,00 ± 0,00a	0,01 ± 0,00a	0,01 ± 0,00a	0,02 ± 0,00a
IC	2,65 ± 0,02c	2,30 ± 0,03b	2,08 ± 0,01a	2,23 ± 0,10c	0,95 ± 0,02a	1,66 ± 0,13b	0,72 ± 0,04a	0,83 ± 0,03b	0,80 ± 0,03b	1,37 ± 0,04c	0,77 ± 0,07a	1,05 ± 0,06b
T	0,53 ± 0,00b	0,49 ± 0,01a	0,52 ± 0,00b	0,95 ± 0,03c	0,63 ± 0,00a	0,92 ± 0,01b	1,09 ± 0,00b	0,84 ± 0,07a	0,87 ± 0,01a	0,77 ± 0,01a	0,89 ± 0,03b	1,12 ± 0,05c

P100 bayas: peso de 100 bayas (g); °Bé: grados Baumé; AT: acidez total (g/L de ácido tartárico); IPT: índice de polifenoles totales; A420, 520, 620: absorbancias a 420, 520 y 620 nm; IC: intensidad colorante; T: tonalidad; C3: cepas control (sin tratar); T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=4) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y punto de muestreo, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p<0,05).

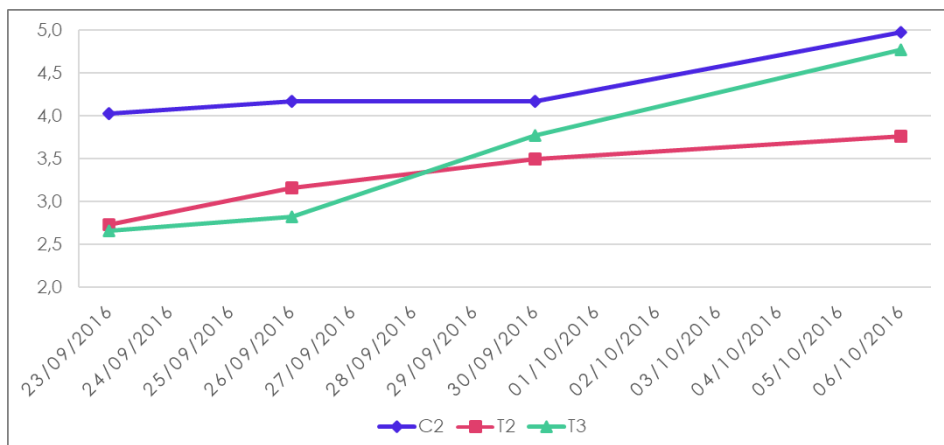


El peso de 100 bayas no estuvo influenciado por los tratamientos con agua ozonizada, ya que fue similar a los controles correspondientes. Sin embargo, si comparamos ambas cosechas, en la de 2016 este parámetro fue mayor que en la cosecha de 2017, seguramente debido a que dicho período fue más lluvioso (Tabla 7).

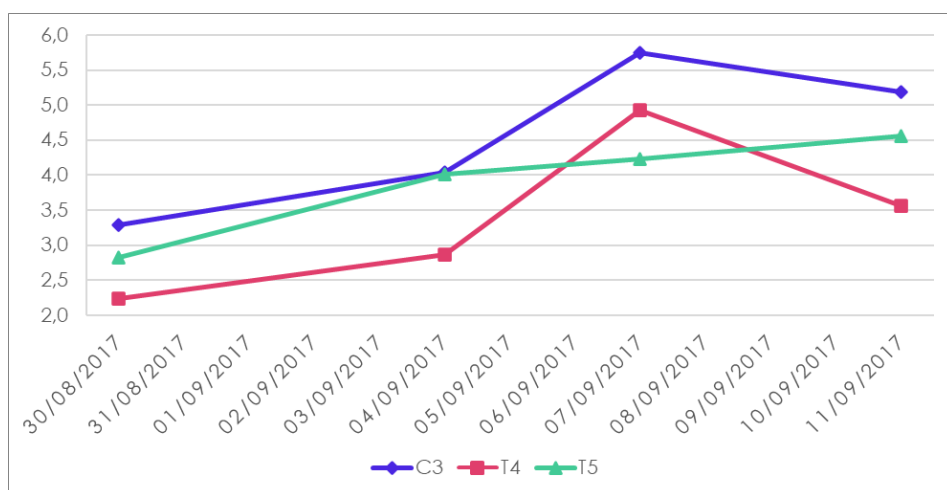
Los tratamientos influyeron en el grado Baumé (°Bé) de manera diferente dependiendo de la estrategia de aplicación, ya que T2 y T3 lo disminuyeron en el primer y cuarto muestreo y no influyeron en el segundo y tercer muestreo, T4 lo disminuyó y T5 lo disminuyó a excepción del segundo muestreo, que lo aumentó.

Los resultados obtenidos para los parámetros pH, acidez total (AT) y °Bé/AT están de acuerdo con los que se proponen para el modelo utilizado para decidir el momento de vendimia: crecimiento del valor de pH (disminución de la acidez) hasta un valor asintótico y crecimiento del parámetro °Bé/AT hasta el valor considerado óptimo (Blouin and Guimberteau, 2004). Éste fue el parámetro utilizado en este trabajo como indicador del momento óptimo de vendimia (Figs. 26 y 27). En la cosecha de 2017, en el cuarto muestreo hubo una disminución del parámetro °Bé/AT en las uvas control y T4 debido a un aumento de la acidez total.





**Figura 26.** Evolución del parámetro °Bé/AT en uvas Cabernet Sauvignon en la cosecha de 2016. C2: cepas control (sin tratar); T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo.



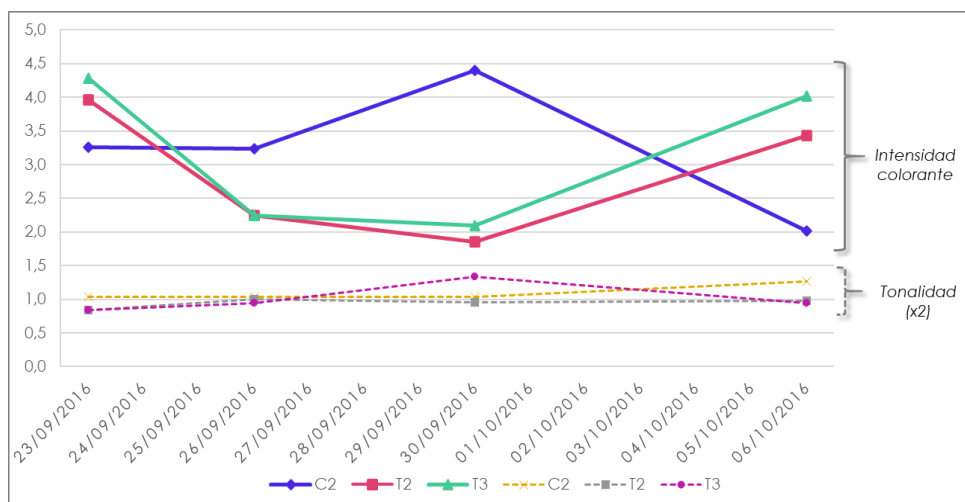
**Figura 27.** Evolución del parámetro °Bé/AT en uvas Cabernet Sauvignon en la cosecha de 2017. C3: cepas control (sin tratar); T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo.

Con respecto al índice de polifenoles totales (IPT), los tratamientos influyeron de manera diferente dependiendo de la estrategia de aplicación y de la cosecha, siendo estos valores generalmente superiores en la cosecha de 2016. En ambas cosechas, se observó una disminución de este parámetro entre el



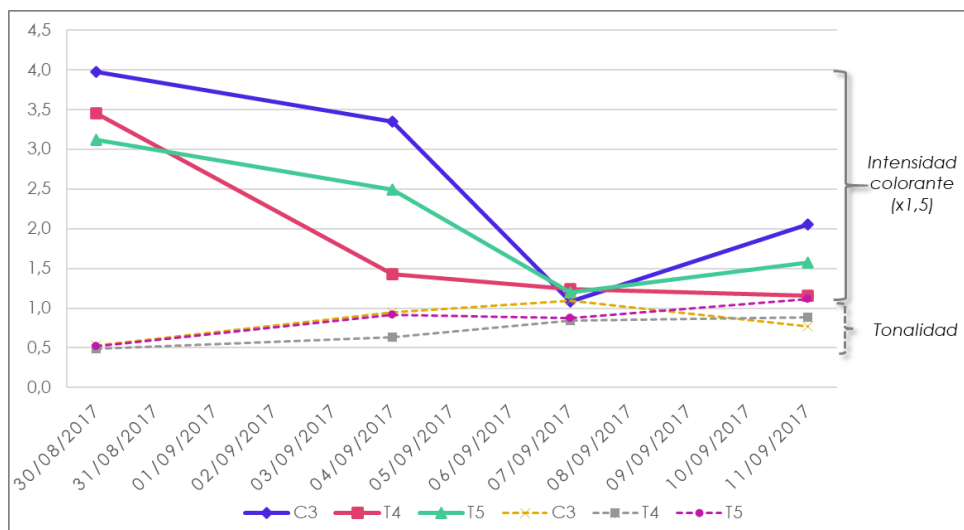
primer y segundo muestreo y un aumento entre el segundo y tercer muestreo.

En cuanto a los parámetros cromáticos de las uvas, las Tablas 18 y 19 muestran las evoluciones de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm, que informan la presencia de colores amarillos, rojos y azules respectivamente en las uvas. Estos parámetros fueron diferentes en los controles de las dos cosechas, con los valores más altos en 2016. Los tratamientos T2 y T3 aumentaron la intensidad colorante (IC) y disminuyeron la tonalidad (T) en el primer y cuarto muestreo con respecto a las uvas control, lo que sugiere una mejor calidad cromática (Fig. 28). Con respecto a los tratamientos T4 y T5, sólo se observó esta tendencia en el tercer muestreo (Fig. 29).



**Figura 28.** Evolución de la intensidad colorante y tonalidad en uvas Cabernet Sauvignon en la cosecha de 2016. C2: cepas control (sin tratar); T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo.





**Figura 29.** Evolución de la intensidad colorante y tonalidad en uvas Cabernet Sauvignon en la cosecha de 2017. C3: cepas control (sin tratar); T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo.

### 6.1.1.2. Momento de vendimia

El día de la vendimia coincidió con el cuarto muestreo, y en las uvas vendimiadas se analizaron los parámetros enológicos convencionales, los parámetros cromáticos, la madurez fenólica, el índice de potencial aromático varietal (IPAv), los compuestos volátiles mediante SBSE-GC-MS y los compuestos fenólicos de bajo peso molecular por HPLC-DAD.

#### 6.1.1.2.1. Parámetros enológicos, cromáticos, madurez fenólica e IPAv de las uvas

Con el fin de facilitar la comparación entre uvas en el momento de vendimia, aunque parte de estos resultados para las cosechas de 2016 y 2017 ya se vieron anteriormente (Tablas 18 y 19 respectivamente), en la Tabla 20 se vuelven a mostrar, incluyendo la madurez fenólica y el parámetro IPAv, junto con los obtenidos para las uvas de la vendimia de 2015.





**Tabla 20.** Parámetros analizados en uvas Cabernet Sauvignon en el día de vendimia.

	2015			2016			2017		
	C1	T1	C2	T2	T3	C3	T4	T5	
<b>Parámetros enológicos convencionales</b>									
P100 bayas	92,00 ± 0,01a	80,00 ± 0,01a	99,50 ± 1,05b	98,75 ± 1,12b	97,75 ± 1,20b	88,38 ± 3,08a	93,28 ± 0,81a	85,50 ± 4,71a	
°Bé	16,00 ± 0,01e	16,00 ± 0,01e	15,40 ± 0,01d	14,50 ± 0,01c	14,82 ± 0,01c	15,20 ± 0,01d	12,60 ± 0,01a	13,40 ± 0,01b	
pH	3,59 ± 0,01b	3,48 ± 0,01a	4,02 ± 0,04e	3,76 ± 0,01c	3,97 ± 0,02e	3,84 ± 0,01d	3,60 ± 0,01b	3,82 ± 0,01d	
AT	3,86 ± 0,01d	4,49 ± 0,01e	3,09 ± 0,11b	3,86 ± 0,03d	3,11 ± 0,03b	2,93 ± 0,01a	3,54 ± 0,03c	2,94 ± 0,03a	
°Bé/AT	4,15 ± 0,01b	3,56 ± 0,01a	4,98 ± 0,14c	3,76 ± 0,02a	4,77 ± 0,03b	5,19 ± 0,01c	3,56 ± 0,02a	4,56 ± 0,03b	
<b>Parámetros cromáticos</b>									
A420	0,11 ± 0,01c	0,22 ± 0,01d	0,07 ± 0,00b	0,10 ± 0,01c	0,12 ± 0,01c	0,06 ± 0,00b	0,04 ± 0,00a	0,05 ± 0,00a	
A520	0,15 ± 0,01b	0,37 ± 0,01d	0,11 ± 0,01b	0,21 ± 0,01c	0,25 ± 0,01c	0,07 ± 0,00b	0,04 ± 0,00a	0,04 ± 0,00a	
A620	0,01 ± 0,00a	0,04 ± 0,00b	0,02 ± 0,00a	0,03 ± 0,00b	0,04 ± 0,00b	0,01 ± 0,00a	0,01 ± 0,00a	0,02 ± 0,00a	
IC	2,70 ± 0,01d	6,30 ± 0,01g	2,02 ± 0,01d	3,43 ± 0,01e	4,02 ± 0,01f	1,37 ± 0,04c	0,77 ± 0,07a	1,05 ± 0,06b	
T	0,73 ± 0,01d	0,59 ± 0,01b	0,63 ± 0,00c	0,49 ± 0,01a	0,47 ± 0,01a	0,77 ± 0,01d	0,89 ± 0,03e	1,12 ± 0,05f	
<b>Madurez fenólica</b>									
IPtPH1	51,82 ± 0,70d	51,31 ± 2,84d	29,64 ± 0,70c	26,89 ± 0,32b	31,13 ± 2,01c	28,11 ± 0,89c	21,18 ± 0,12a	25,73 ± 1,02b	
IPtPH3,4	26,34 ± 0,36e	25,32 ± 0,25d	14,70 ± 0,18c	14,54 ± 0,44c	14,96 ± 0,42c	14,44 ± 0,33c	10,39 ± 0,01a	13,05 ± 0,02b	
ApH1	854,30 ± 16,16d	859,31 ± 2,84d	527,63 ± 19,78a	508,52 ± 59,20a	661,26 ± 38,34c	608,29 ± 1,70b	500,41 ± 8,51a	582,06 ± 25,13b	
ApH3,4	311,70 ± 0,28e	318,30 ± 9,26e	246,38 ± 2,22b	254,57 ± 15,64b	299,04 ± 9,43d	287,66 ± 5,88d	220,00 ± 1,30a	269,54 ± 8,08c	
EA	63,51 ± 0,72c	62,96 ± 1,20c	53,25 ± 2,06b	49,70 ± 2,78a	54,73 ± 1,20b	52,71 ± 0,87b	56,02 ± 1,00b	53,58 ± 3,39b	
MP	52,63 ± 1,68f	49,69 ± 1,96e	32,95 ± 1,33d	29,99 ± 2,16c	20,06 ± 0,30b	20,29 ± 0,19b	15,32 ± 0,51a	17,37 ± 2,53a	
<b>Madurez aromática</b>									
IPAV	16,94 ± 0,15e	18,28 ± 0,65f	9,01 ± 0,36a	8,68 ± 0,45a	16,07 ± 0,51d	13,78 ± 0,61c	8,56 ± 0,35a	9,89 ± 0,26b	

P100 bayas: peso de 100 bayas (g); °Bé: grados Baumé; AT: acidez total (g/L de ácido tartárico); A420, 520, 620: absorbancias a 420, 520 y 620 nm; IC: intensidad colorante; I: tonalidad; IPtPH1: índice de polifenoles totales a pH 1; IPtPH3,4: índice de polifenoles totales a pH 3,4; ApH1: antocianos totales a pH 1; ApH3,4: antocianos totales a pH 3,4; EA: extractabilidad antocianica (%); MP: índice de madurez de las pepitas (%); IPAV: índice de potencial aromático varietal; C1, C2 y C3: cepas control (sin tratar) en las cosechas de 2015, 2016 y 2017 respectivamente; T1: cepas tratadas por tratamiento aéreo; T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=4) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p<0,05).



El peso de 100 bayas no estuvo influenciado por los tratamientos con agua ozonizada, ya que fue similar a los controles correspondientes. Sin embargo, durante la segunda cosecha (2016), este parámetro fue significativamente mayor que los otros años (2015 y 2017), tanto en los tratamientos como en los controles, probablemente porque dicho período fue más lluvioso (Tabla 7).

Como era de esperar, el efecto de la añada tuvo una influencia significativa en el °Baumé (°Bé) de las uvas control, siendo mayor en C1 que en C2 y C3. Las uvas control de las cosechas 2016 y 2017 mostraron valores similares de °Bé, pero los tratamientos lo disminuyeron, especialmente T4, que produjo uvas con el °Bé más bajo.

El año de la cosecha tuvo un efecto significativo en el pH de las uvas control, con los valores más bajos en 2015, seguido de 2017 y los valores más altos en 2016. Los tratamientos combinados no influyeron en el pH de las uvas, pero los tratamientos T1, T2 y T4 lo disminuyeron significativamente. La cosecha tuvo una influencia significativa en la acidez total (AT) de las uvas control, con los valores de AT más altos en 2015, seguido por 2016 y los más bajos en 2017. Asimismo, los tratamientos combinados (T3 y T5) no influyeron en AT, pero los tratamientos T1, T2 y T4 produjeron un aumento significativo.

La relación °Bé/AT, como ya se ha comentado anteriormente, es un criterio clásico utilizado para elegir la fecha de cosecha cuando las uvas están en la madurez tecnológica óptima. Se estima que las ratios alrededor de 4 son las más adecuadas (Hidalgo, 2011) porque las uvas muestran el mejor equilibrio entre azúcar y acidez. De acuerdo a esto, las uvas control tenían una madurez tecnológica adecuada, a excepción de C3 que fue superior a 5. Las uvas de los



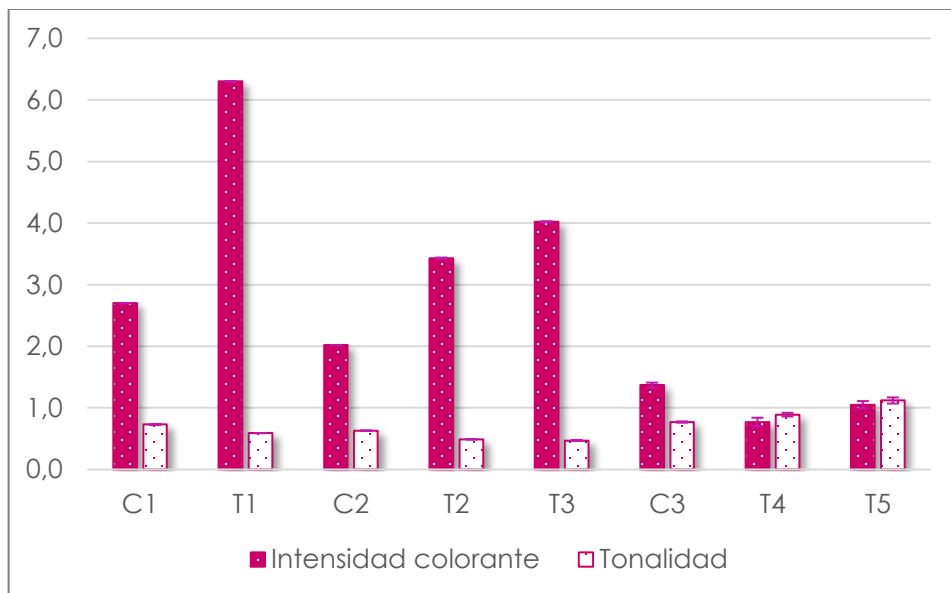
tratamientos con agua ozonizada mostraron una relación °Bé/AT menor que las uvas control, lo que sugiere un posible retraso en la madurez tecnológica.

En cuanto a los parámetros cromáticos de las uvas, la Tabla 20 muestra las absorbancias a 420, 520 y 620 nm. Como era de esperar, estos parámetros fueron diferentes en los controles de las tres cosechas, con los valores más altos en 2015. Los tratamientos T1, T2, T3 produjeron un aumento significativo de todas estas absorbancias, mientras que los tratamientos T4 y T5 condujeron a una disminución significativa, especialmente T4.

En la elaboración del vino, la calidad del color de los vinos se evalúa a través del parámetro llamado intensidad colorante (IC), que es la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm, y el parámetro llamado tonalidad (T), que es la relación entre absorbancias 420/520 nm, de modo que los valores de IC más altos y los valores de T más bajos se asocian con una mejor calidad.

La Tabla 20 y Figura 30 muestra que los tratamientos T1, T2 y T3 con agua ozonizada mejoraron la calidad del color de las uvas en relación con sus controles correspondientes, mientras que los tratamientos T4 y T5 la empeoraron. Cabe señalar que la IC aumentó un 133%, 70% y 99% en T1, T2 y T3 respectivamente, mientras que la tonalidad disminuyó un 19%, 23% y 26% respectivamente para los mismos tratamientos. Por lo tanto, las uvas con una mejor calidad de color fueron las de los tratamientos T1 y T3.





**Figura 30.** Intensidad colorante y tonalidad en uvas Cabernet Sauvignon en el día de vendimia. C1, C2 y C3: cepas control (sin tratar) en las cosechas de 2015, 2016 y 2017 respectivamente; T1: cepas tratadas por tratamiento aéreo; T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo.

La maduración fenólica de las uvas generalmente se evalúa mediante el IPT y el contenido de antocianos totales. En la Tabla 20 se puede observar que el IPT a pH 1 fue mayor en C1 y no hubo diferencias significativas entre C2 y C3. La misma tendencia se observó para el IPT a pH 3,4. Se observó que a pH 3,4 los valores de IPT son aproximadamente la mitad de los valores a pH 1, tanto en las uvas control como en las de los tratamientos con agua ozonizada. En general, para ambos valores de pH, los tratamientos T1 y T3 no tuvieron un efecto significativo sobre el IPT, mientras que los tratamientos T2, T4 y T5 disminuyeron dicho parámetro.

Los antocianos son los polifenoles responsables del color rojo violáceo de las uvas y, por lo tanto, el color de los vinos tintos depende de ellos (Mazza, 1995). Su contenido en las uvas control

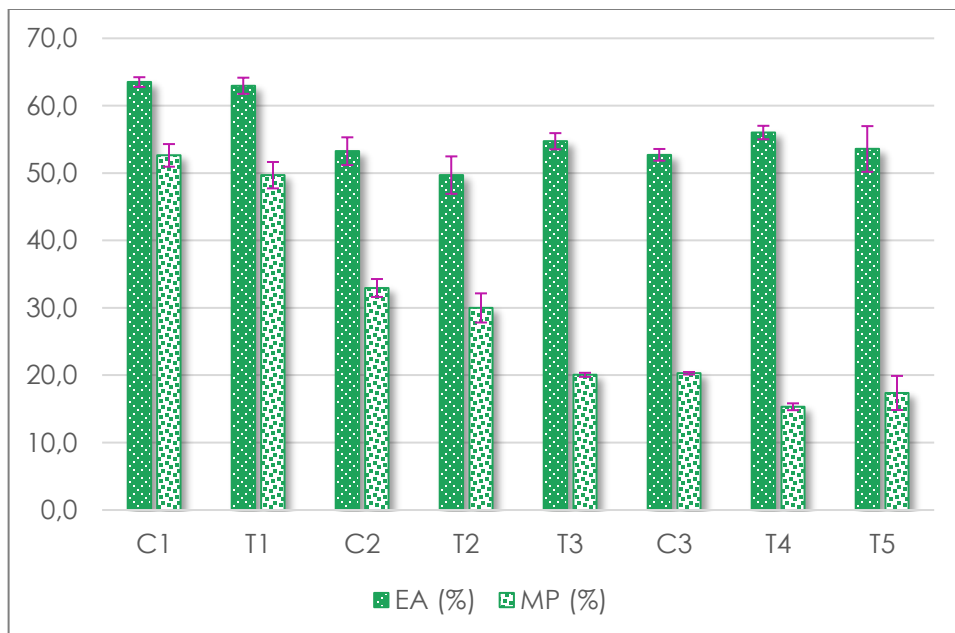


varía significativamente según la cosecha, alcanzando el contenido más alto en C1 y el más bajo en C2. Los tratamientos T1, T2 y T5 con agua ozonizada no influyeron en el contenido de antocianos a pH 1, pero los tratamientos T3 y T4 afectaron a este parámetro de manera diferente, ya que T3 lo aumentó significativamente con respecto a su control y T4 lo disminuyó. Se observó un comportamiento similar en el caso del contenido de antocianos a pH 3,4, cuyos valores fueron aproximadamente la mitad del contenido a pH 1.

La extracción de los antocianos de la piel de la uva al vino depende no solo de su contenido en las uvas, sino también de la capacidad de ser liberados de las vacuolas en las que se encuentran, lo que depende de la degradación de las paredes celulares por enzimas pectolíticas. Dicha extractabilidad se mide a través del parámetro "extractabilidad antociánica" (EA). Además, la maduración fenólica de las uvas también contempla el nivel de los taninos de las pepitas, para lo cual se utiliza el parámetro "índice de madurez de pepitas" (MP). Con respecto al parámetro EA, debe tenerse en cuenta que un valor más bajo es indicativo de que los antocianos de la uva se extraerán mejor, mientras que un valor más bajo de MP indica que el contenido de taninos de las pepitas que podrán estar presentes en el vino obtenido será menor (Saint-Cricq *et al.*, 1998). Por lo tanto, las uvas tendrán una mejor calidad fenólica cuando los parámetros EA y MP tengan valores más bajos.

La Tabla 20 y Figura 31 muestra ambos índices en las uvas control y en las uvas de los tratamientos con agua ozonizada.





**Figura 31.** Madurez fenólica de las uvas Cabernet Sauvignon en el día de vendimia. EA: extractabilidad antocianica; MP: índice de madurez de las pepitas; C1, C2 y C3: cepas control (sin tratar) en las cosechas de 2015, 2016 y 2017 respectivamente; T1: cepas tratadas por tratamiento aéreo; T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo.

Se puede observar que, en todas las uvas, los tratamientos con agua ozonizada no afectaron significativamente EA excepto T2, que lo disminuyó. Por otro lado, los tratamientos disminuyeron significativamente MP, lo que sugiere que el uso de agua ozonizada en el viñedo puede reducir la presencia de los taninos de las pepitas durante la vinificación. Este resultado es de gran interés, ya que uno de los problemas atribuidos al cambio climático es la descompensación entre la madurez de la pulpa, piel y pepita de la uva, lo que se refleja en una mayor presencia de taninos de las pepitas en el vino, que son negativos para su calidad (Bernardo *et al.*, 2018; Mira de Orduña, 2010).



La madurez aromática de las uvas fue evaluada por el índice de potencial aromático varietal (IPAv), que estima el nivel de los precursores aromáticos glicosilados de las uvas, que son el grupo más abundante e importante del aroma (Hjelmeland and Ebeler, 2015). Un índice más alto sugiere que las uvas tendrán una mayor capacidad para liberar aromas varietales positivos en el proceso de vinificación, especialmente terpenoides (Serrano de la Hoz *et al.*, 2014), y por lo tanto el aroma de los vinos puede recordar a la variedad de uva con la que fueron elaborados.

El IPAv de las uvas control dependió de la cosecha (Tabla 20), obteniéndose los valores más altos en C1 y los más bajos en C2. Los tratamientos con agua ozonizada tuvieron una influencia significativa en el IPAv dependiendo de la estrategia de aplicación, excepto T2. Mientras que los tratamientos T1 y T3 aumentaron significativamente el IPAv de las uvas, T4 y T5 lo disminuyeron, especialmente T4. El aumento más importante tuvo lugar en las uvas del tratamiento T3, hasta un 78%, y la disminución más importante en las uvas del tratamiento T4, hasta un 38%.

#### **6.1.1.2.2. Composición fenólica y aromática de las uvas**

Los resultados muestran que las cosechas y los tratamientos con agua ozonizada afectan a la composición fenólica y aromática de las uvas y, por lo tanto, se realizó un análisis detallado de tales compuestos en las cosechas de 2016 y 2017.

La Tabla 21 muestra algunos de los principales compuestos fenólicos de bajo peso molecular (BPM) de las uvas Cabernet Sauvignon.





**Tabla 21.** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular en uvas Cabernet Sauvignon, en las cosechas de 2016 y 2017 en el día de vendimia.

	2016		2017			
	C2	T2	T3	C3	T4	T5
<b>Antocianinas (mg/L)</b>						
Delfinidina 3-O-glucósido	6,98 ± 0,24a	7,14 ± 0,18a	6,97 ± 0,16a	8,83 ± 0,08c	6,90 ± 0,12a	7,50 ± 0,01b
Cianidina 3-O-glucósido	6,49 ± 0,13ab	6,89 ± 0,18b	6,15 ± 0,03a	6,54 ± 0,04b	6,20 ± 0,01a	6,20 ± 0,01a
Petunidina 3-O-glucósido	7,40 ± 0,25a	7,60 ± 0,16a	7,25 ± 0,13a	9,41 ± 0,09c	7,05 ± 0,06a	7,66 ± 0,04b
Peonidina 3-O-glucósido	15,29 ± 0,72c	11,86 ± 0,14b	9,82 ± 0,23a	15,59 ± 0,26c	8,59 ± 0,03a	9,65 ± 0,02b
Malvidina 3-O-glucósido	26,92 ± 1,61a	25,17 ± 0,65a	31,28 ± 0,89b	51,17 ± 0,88c	29,71 ± 0,44a	36,69 ± 0,50b
Peonidina 3-O-(6'-acetil)-glucósido	7,50 ± 0,27b	6,52 ± 0,07a	6,84 ± 0,04a	8,22 ± 0,07c	6,75 ± 0,03a	6,99 ± 0,01b
Malvidina 3-O-(6'-acetil)-glucósido	12,00 ± 0,61a	11,38 ± 0,37a	14,58 ± 0,53b	18,88 ± 0,03c	13,78 ± 0,11a	15,43 ± 0,09b
<b>Total antocianinas</b>	<b>82,59 ± 3,84a</b>	<b>76,55 ± 1,74a</b>	<b>82,90 ± 2,01a</b>	<b>118,64 ± 1,39c</b>	<b>78,97 ± 0,79a</b>	<b>90,13 ± 0,48b</b>
<b>Flavonoles (mg/L)</b>						
Miricetina 3-O-(glucurónido+glucósido) <sup>a</sup>	1,09 ± 0,07a	1,17 ± 0,01ab	1,28 ± 0,01b	1,70 ± 0,03c	1,22 ± 0,01a	1,37 ± 0,01b
Quercetina 3-O-(glucurónido+glucósido) <sup>b</sup>	1,38 ± 0,04b	1,37 ± 0,02b	1,19 ± 0,01a	0,91 ± 0,01b	0,80 ± 0,01a	0,79 ± 0,01a
Laricitrina 3-O-(glucósido/galactósido) <sup>c</sup>	0,84 ± 0,01b	0,82 ± 0,01a	0,84 ± 0,01b	0,82 ± 0,01b	0,78 ± 0,01a	0,78 ± 0,01a
Siringetina 3-O-glucósido	1,00 ± 0,01c	0,93 ± 0,01a	0,98 ± 0,01b	0,88 ± 0,01b	0,81 ± 0,01a	0,80 ± 0,01a
<b>Total flavonoles</b>	<b>4,31 ± 0,03a</b>	<b>4,28 ± 0,03a</b>	<b>4,29 ± 0,03a</b>	<b>4,31 ± 0,02c</b>	<b>3,61 ± 0,01a</b>	<b>3,75 ± 0,01b</b>
<b>Ácidos fenólicos (mg/L)</b>						
Ácido siríngico	0,90 ± 0,02a	1,01 ± 0,01b	1,12 ± 0,03c	1,61 ± 0,04b	1,34 ± 0,04a	1,36 ± 0,02a
Ácido t-caftárico	0,13 ± 0,01c	0,07 ± 0,01a	0,09 ± 0,01b	0,13 ± 0,01c	0,06 ± 0,01a	0,08 ± 0,01b
Ácido t-p-cutárico	0,16 ± 0,01a	0,19 ± 0,01b	0,17 ± 0,01a	0,17 ± 0,01a	0,17 ± 0,01a	0,18 ± 0,01b
<b>Total ácidos fenólicos</b>	<b>1,19 ± 0,02a</b>	<b>1,27 ± 0,01a</b>	<b>1,38 ± 0,03b</b>	<b>1,90 ± 0,04b</b>	<b>1,57 ± 0,04a</b>	<b>1,62 ± 0,02a</b>

C2 y C3: cepas control (sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: cepas tratadas combinando riego y aéreo; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo; <sup>a</sup> Miricetina 3-O-glucurónido y Miricetina 3-O-glucósido, compuestos coeluidos; <sup>b</sup> Quercetina 3-O-glucurónido y Quercetina 3-O-glucósido, compuestos coeluidos; <sup>c</sup> Puede ser glucósido o galactósido de laricitrina. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=4) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p<0,05).

Las antocianinas, los pigmentos violáceos de las uvas a los que se debe el color de los vinos tintos, fueron los compuestos fenólicos más abundantes, seguidos por los flavonoles y los ácidos fenólicos, que supusieron alrededor del 94%, 4% y 2% respectivamente. El grupo más abundante de antocianinas fue el no acilado, que constituyó aproximadamente el 76%, y entre ellos, el orden de mayor a menor abundancia fue: malvidina 3-O-glucósido (Mv3G), peonidina 3-O-glucósido (Pn3G), petunidina 3-O-glucósido (Pt3G), delphinidina 3-O-glucósido (Df3G) y cianidina 3-O-glucósido (Cn3G). Se observaron diferencias significativas en las uvas control de ambas cosechas, excepto en el contenido de flavonoles, lo que puede atribuirse a las diferentes condiciones meteorológicas (Tabla 7), especialmente durante el período de maduración (Bernardo *et al.*, 2018; Hjelmeland, 2015; Ryan *et al.*, 2003), con mayor contenido de antocianinas en las uvas de 2017 que en las de 2016.

Los tratamientos con agua ozonizada influyeron en algunas de las antocianinas, especialmente Mv3G y su derivado de acetilo (Mv3GAc). Por lo tanto, la aplicación de agua ozonizada combinando riego y aéreo (T3) produjo un aumento significativo de ambos compuestos, aunque el tratamiento por riego (T2) no los afectó.

Por otro lado, los tratamientos por endoterapia disminuyeron el contenido de ambos compuestos, pero en menor medida cuando la endoterapia se combinó con el tratamiento aéreo (T5). Estos resultados están en concordancia con los obtenidos de ApH<sub>3,4</sub> en las cosechas de 2016 y 2017 (Tabla 20). Pn3G, el segundo compuesto más abundante, mostró un comportamiento opuesto al descrito para los derivados de la malvidina, pero en todos los casos la relación Mv3G/Pn3G aumentó debido a los tratamientos (1,7, 2,1





y 3,2 para C2, T2 y T3 respectivamente y 3,3, 3,4 y 3,8 para C3, T4 y T5 respectivamente).

El resto de las antocianinas no se vieron significativamente influenciadas por los tratamientos en 2016, pero en 2017 su contenido en la uva disminuyó, aunque en menor proporción cuando se usó T5.

Los flavonoles, pigmentos amarillos de las uvas, también fueron influenciados por los tratamientos con agua ozonizada, aunque su contenido total solo mostró diferencias significativas con respecto a las uvas control en la cosecha de 2017, permaneciendo constantes en 2016. Los flavonoles forman parte del color rojo de los vinos por efecto de copigmentación con antocianinas (Gómez-Míguez *et al.*, 2006). Predominaron los derivados de miricetina y quercetina. El tratamiento T3 disminuyó todos los flavonoles, excepto los derivados de laricitrina, mientras que T2 no afectó a los derivados de miricetina y quercetina. Los tratamientos T4 y T5 disminuyeron significativamente cada uno de los flavonoles analizados, especialmente T4. Los ácidos fenólicos fueron el grupo menos abundante de compuestos fenólicos de bajo peso molecular. Los contenidos más bajos fueron el de los ácidos caftárico y cutárico, que son los correspondientes ésteres tartáricos de los ácidos caféico y cutárico respectivamente. En las uvas, dichos compuestos no participan en su color o sabor, pero pueden influir en el color de los vinos cuando se hidrolizan durante el proceso de vinificación, siendo el ácido caféico un importante copigmento (Gómez-Míguez *et al.*, 2006). El agua ozonizada afectó el contenido de ácidos fenólicos de la uva de manera diferente dependiendo de la cosecha, el tipo de tratamiento y compuesto, por ejemplo, el ácido *t*-caftárico disminuyó, principalmente en las uvas de T2 y T4, mientras



que el ácido *t*-cutárico aumentó, sobre todo en las uvas procedentes de T2 y T5. Además, se observó un aumento significativo del ácido siríngico en las uvas de T3 pero una disminución en las de T4 y T5.

Los metabolitos del aroma de la uva constituyen un grupo muy complejo de sustancias que se pueden encontrar en formas libres, como moléculas volátiles y, por lo tanto son compuestos odorantes, o también se pueden encontrar en forma de precursores no volátiles y, por lo tanto, de moléculas inodoras. Dichos precursores pueden liberar su parte volátil a lo largo del proceso de vinificación y por lo tanto serán los principales protagonistas del aroma de los vinos.

Cabernet Sauvignon es una variedad de uva neutra desde el punto de vista de su aroma (Kalua and Boss, 2010), y tiene un bajo contenido de compuestos aromáticos libres en el momento de la cosecha. Sin embargo, su mayor grupo de aromas se encuentra en forma de precursores, que se midió en este estudio mediante el parámetro IPA<sub>v</sub> (Tabla 20), previamente comentado.

La Tabla 22 muestra los principales compuestos volátiles presentes en las uvas control y en las procedentes de los tratamientos con agua ozonizada, durante las cosechas de 2016 y 2017.



**Tabla 22.** Compuestos volátiles en uvas Cabernet Sauvignon, en las cosechas de 2016 y 2017 en el día de vendimia.

	2016		2017			
	C2	T2	T3	C3	T4	T5
<b>Compuestos C6 (µg/L)</b>						
1-Hexanol	178,33 ± 15,57a	238,55 ± 5,00b	226,76 ± 10,38b	150,97 ± 5,27a	214,79 ± 2,59b	175,72 ± 4,08a
E-2-Hexen-1-ol	140,40 ± 2,29a	202,83 ± 5,30b	180,68 ± 29,55b	85,62 ± 1,46a	150,67 ± 3,95b	122,50 ± 10,77b
Z-3-Hexen-1-ol	19,09 ± 0,66a	26,73 ± 1,44b	22,68 ± 4,97b	21,07 ± 0,83a	30,73 ± 0,02b	21,20 ± 0,58a
E-2-Hexenal	123,37 ± 9,80a	194,00 ± 10,01c	152,48 ± 16,44b	72,06 ± 0,13a	81,51 ± 7,81b	72,39 ± 0,80a
<b>Total compuestos C6</b>	<b>461,19 ± 27,00a</b>	<b>662,11 ± 1,14c</b>	<b>582,60 ± 21,33b</b>	<b>329,72 ± 4,76a</b>	<b>477,70 ± 14,33b</b>	<b>391,81 ± 13,47a</b>
<b>Terpenoides (µg/L)</b>						
β-Damascenona	0,05 ± 0,01a	0,07 ± 0,01a	0,06 ± 0,01a	0,10 ± 0,01a	0,30 ± 0,09b	0,09 ± 0,01a
β-Ionona	0,05 ± 0,01a	0,06 ± 0,01a	0,05 ± 0,01a	0,18 ± 0,01b	0,17 ± 0,01b	0,11 ± 0,01a
Geraniol	3,55 ± 0,21b	3,71 ± 0,15b	2,93 ± 0,23a	4,52 ± 0,60b	2,58 ± 0,17a	2,02 ± 0,12a
Geranil acetona	0,40 ± 0,08a	0,48 ± 0,03a	0,42 ± 0,04a	0,17 ± 0,03b	0,18 ± 0,01b	0,12 ± 0,01a
<b>Total terpenoides</b>	<b>4,05 ± 0,28b</b>	<b>4,32 ± 0,19b</b>	<b>3,46 ± 0,19a</b>	<b>4,97 ± 0,63c</b>	<b>3,23 ± 0,07b</b>	<b>2,34 ± 0,13a</b>

C2 y C3: cepas control (sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=4) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b ( $p \leq 0,05$ ).

Resultados recientes han demostrado que los compuestos C<sub>6</sub> y los terpenoides son los volátiles más relevantes para discriminar las uvas Cabernet Sauvignon de diferentes regiones vitícolas, que están altamente influenciadas por las condiciones ambientales (Xie *et al.*, 2019). La fracción volátil libre consistió principalmente en compuestos C<sub>6</sub>, tal como cabe esperar pues es lo que ocurre en todas las viníferas no aromáticas, mientras que el contenido de terpenoides (terpenos y norisoprenoides) fue muy bajo, entre los cuales el geraniol fue el más abundante, seguido de su derivado geranil acetona. Los compuestos volátiles más importantes encontrados en las uvas fueron la  $\beta$ -damascenona y la  $\beta$ -ionona, que contribuyen al aroma de los vinos con notas frutales y florales si superan su umbral de percepción olfativa (UPO). La presencia de estos volátiles en los vinos, tal como previamente se ha comentado, se debe principalmente a su liberación de los precursores glicosilados de la uva (Asproudi *et al.*, 2018). Por otro lado, los compuestos C<sub>6</sub> si exceden su UPO, proporcionan al vino un olor a hierba, que es más potente si se encuentran como aldehídos que en forma de alcoholes (Kalua and Boss, 2010).

Los aldehídos y los alcoholes C<sub>6</sub> son derivados de lípidos producidos en las plantas en respuesta a las heridas y juegan un papel importante en las estrategias de defensa de las plantas y en la resistencia a plagas (Matsui, 2006). En las uvas, los compuestos C<sub>6</sub> también se pueden encontrar como precursores glicosilados no olorosos, pero su concentración es mucho menor que otros precursores similares (Cabrita *et al.*, 2006). La fracción de compuestos C<sub>6</sub> más abundante en las uvas es en forma libre y no como precursores, ya que, para generar tales precursores, el oxígeno del aire es necesario previamente como iniciador de la síntesis de C<sub>6</sub> a partir de ácidos grasos antes de la glucosilación. Por



lo tanto, la contribución de los compuestos C6 a los vinos depende de su contenido en forma volátil en la uva. Las concentraciones obtenidas en las uvas Cabernet Sauvignon (Tabla 22) están en rangos similares o inferiores a los de esta misma variedad en el área estudiada (Rosillo *et al.*, 1999). Frente a los compuestos C6, los terpenoides se encuentran en variedades de uva no aromáticas en bajas concentraciones, ya que se encuentran principalmente en las uvas como precursores glicosilados (Hjelmeland *et al.*, 2015).

La Tabla 22 muestra que el contenido total de compuestos C6 en las uvas control de 2016 (C2) fue mayor que en 2017 (C3), mientras que el contenido de terpenoides estuvo en concentraciones más altas en 2017 que en 2016, hecho que puede estar relacionado con las diferentes condiciones climáticas en cada cosecha.

Se sabe que una deficiencia de agua en la etapa de maduración aumenta el contenido de terpenoides y disminuye el de C6 (Alem *et al.*, 2018), justo lo contrario de lo que sucedió en 2016, donde al final de esa etapa llovió más que en 2017. Además, la planta sintetiza más compuestos C6 como defensa contra agentes externos, como el agua ozonizada, por lo que este puede ser el motivo del aumento observado en todas las uvas procedentes de los tratamientos, especialmente en T2.

El geraniol, el más abundante de los terpenoides encontrados, disminuyó debido a los tratamientos, especialmente en las uvas de la cosecha 2017. Se observó una disminución significativa en el compuesto geranil acetona en las uvas de 2017 en comparación con 2016, que fue más pronunciada en las uvas del tratamiento T5. La  $\beta$ -damascenona y la  $\beta$ -ionona fueron los compuestos más potentes analizados, como se indicó anteriormente, y su contenido no se vio afectado por el agua ozonizada en 2016. Sin embargo, en



las uvas de la cosecha 2017, se observó un aumento significativo de la  $\beta$ -damascenona cuando se aplicó el agua ozonizada solo por endoterapia, hasta tres veces superior que en las uvas control (C3). Dicho tratamiento (T4) no afectó el contenido de  $\beta$ -ionona, pero disminuyó con el tratamiento combinado de endoterapia y aéreo.

En este estudio, los compuestos aromáticos de las uvas se han evaluado de dos maneras: la primera utilizando el parámetro IPAv (Tabla 20) y la segunda a través del análisis detallado de volátiles (Tabla 22). En un intento de relacionar ambos tipos de parámetros de acuerdo con los tratamientos de agua ozonizada, se obtuvieron las proporciones correspondientes. Por lo tanto, mientras que la relación IPAv/terpenoides fue influenciada por los tratamientos, la relación IPAv/C6 permaneció con valores similares en todos los casos. Los valores de IPAv/terpenoides se mantuvieron alrededor de 2,2, tanto en las uvas control de la cosecha 2016 (C2) como en las uvas del tratamiento por riego (T2), y alrededor de 2,7 en las uvas control de la cosecha 2017 (C3) y en las uvas del tratamiento por endoterapia (T4). Sin embargo, se obtuvo una proporción de 4,6 en uvas de la cosecha 2016 del tratamiento combinado de riego y aéreo (T3), y de 4,2 en las uvas del tratamiento combinado de endoterapia y aéreo (T5).

### **6.1.1.3. Análisis discriminante de las uvas Cabernet Sauvignon**

Para minimizar el efecto del año de cosecha y comprender mejor cuales fueron los metabolitos más afectados por los tratamientos con ozono, se realizó un análisis discriminante agrupando las uvas en tres grupos. El primer grupo estuvo constituido por las uvas control (C2 y C3), y lo hemos llamado grupo control o **grupo C**; el segundo grupo, estuvo constituido por las uvas de los tratamientos con menor número de aplicaciones (T2 y T4), denominado grupo con baja



intensidad de aplicación, o **grupo BI**; y el tercer grupo, estuvo integrado por las uvas de los tratamientos procedentes de viñedos en donde se realizaron el mayor número de aplicaciones con agua ozonizada (T3 y T5), denominado grupo con alta intensidad de aplicación o **grupo AI**.

Se realizaron varios análisis discriminantes utilizando parámetros agrupados por compuestos procedentes del metabolismo secundario de la vid (compuestos fenólicos y aromas varietales (C6 y terpenoides)) y parámetros enológicos convencionales, madurez fenólica e IPAv. De esta manera, se observó que la separación completa de las muestras se logró cuando se realizaron tres análisis discriminantes. El primero usando algunos parámetros enológicos y cromáticos como el peso de 100 bayas, el °Bé y las absorbancias a 520 y 620 nm, la madurez fenólica y el parámetro IPAv. El segundo utilizando todos los volátiles varietales y el IPAv, y el tercero usando todas las antocianinas.

En el primer caso, se obtuvieron dos funciones discriminantes (F), de las cuales F1 explicó el 87% de la varianza, mientras que F2 explicó el 13% de la misma (Tabla 23).

**Tabla 23.** Funciones discriminantes obtenidas cuando se emplearon todos los compuestos procedentes del metabolismo secundario de uvas Cabernet Sauvignon.

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	171,096a	<b>86,9</b>	86,9	0,997
2	25,768a	<b>13,1</b>	100,0	0,981

En la Tabla 24 se muestran los parámetros con los valores absolutos más altos de los coeficientes discriminantes.

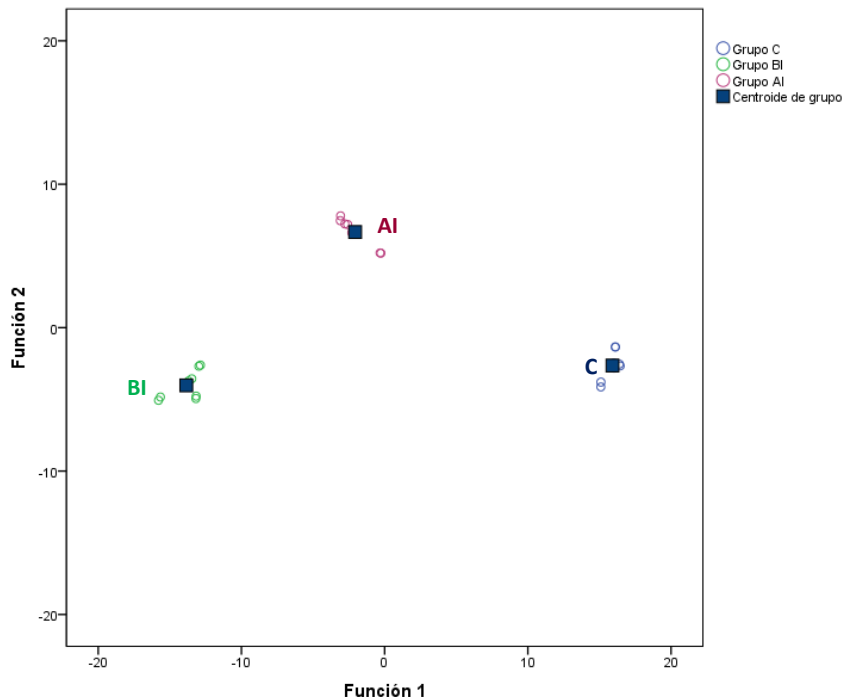


**Tabla 24.** Coeficientes de las funciones discriminantes.

	Función	
	1	2
A520	-18,423	-10,321
A620	4,087	9,972
IPT_pH1	7,019	4,224
IPAv	6,174	3,955

Las variables con los mayores valores absolutos de los coeficientes discriminantes en F1 fueron la absorbancia a 520 nm, el IPT a pH 1, el IPAv y la absorbancia a 620 nm, y en F2 fueron las absorbancias a 520 y 620 nm, el IPT a pH 1 y el IPAv.

En la Figura 32 se observa la separación de las muestras con el análisis discriminante.



**Figura 32.** Gráfico en el que se muestra la separación de grupos resultante del análisis discriminante usando los metabolitos secundarios de las uvas Cabernet Sauvignon. C: grupo control; BI: grupo de tratamientos de baja intensidad; AI: grupo de tratamientos de alta intensidad.





Con el fin de profundizar en el estudio, se volvió a realizar un nuevo análisis discriminante separando los metabolitos secundarios. En las Tablas 25 y 26 se muestra el análisis utilizando los aromas varietales y el IPA<sub>v</sub>. En ellas se observa que F1 explicó el 83% de la varianza y que los compuestos más importantes fueron E-2-hexen-1-ol, 1-hexanol, β-ionona y geranil acetona.

**Tabla 25.** Funciones discriminantes obtenidas empleando los aromas varietales y el IPA<sub>v</sub> de uvas Cabernet Sauvignon.

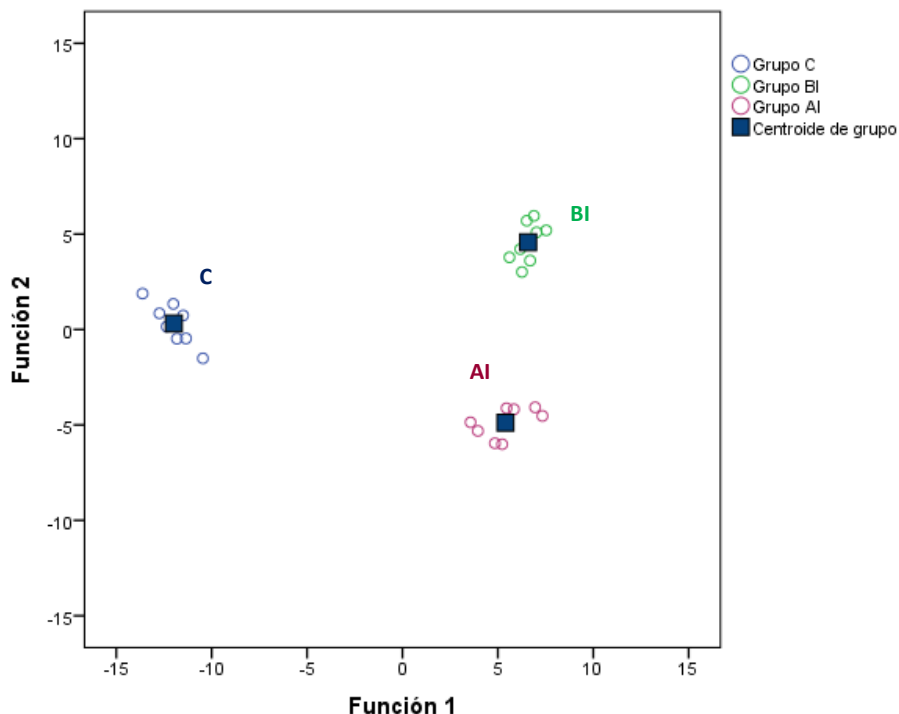
Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	82,317 <sub>a</sub>	<b>82,8</b>	82,8	0,994
2	17,082 <sub>a</sub>	<b>17,2</b>	100,0	0,972

**Tabla 26.** Coeficientes de las funciones discriminantes.

	Función	
	1	2
1- Hexanol	-11,596	1,220
E-2-Hexen-1-ol	17,776	-0,619
β-Ionona	9,952	5,390
Geranil acetona	-4,711	4,422

En la Figura 33 se observa la separación de las muestras con el análisis discriminante.





**Figura 33.** Gráfico en el que se muestra la separación de grupos resultante del análisis discriminante usando los aromas varietales y el IPA<sub>v</sub> de uvas Cabernet Sauvignon. C: grupo control; BI: grupo de tratamientos de baja intensidad; AI: grupo de tratamientos de alta intensidad.

En el caso del análisis discriminante realizado utilizando las antocianinas como variables discriminantes, F1 y F2 explicaron el 99,7% y el 0,3% de la varianza, respectivamente (Tabla 27).

**Tabla 27.** Funciones discriminantes obtenidas cuando se emplearon las antocianinas de uvas Cabernet Sauvignon.

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	313,936a	<b>99,7</b>	99,7	0,998
2	0,947a	<b>0,3</b>	100,0	0,697

En la Tabla 28 se muestran los parámetros con los valores absolutos más altos de los coeficientes discriminantes.

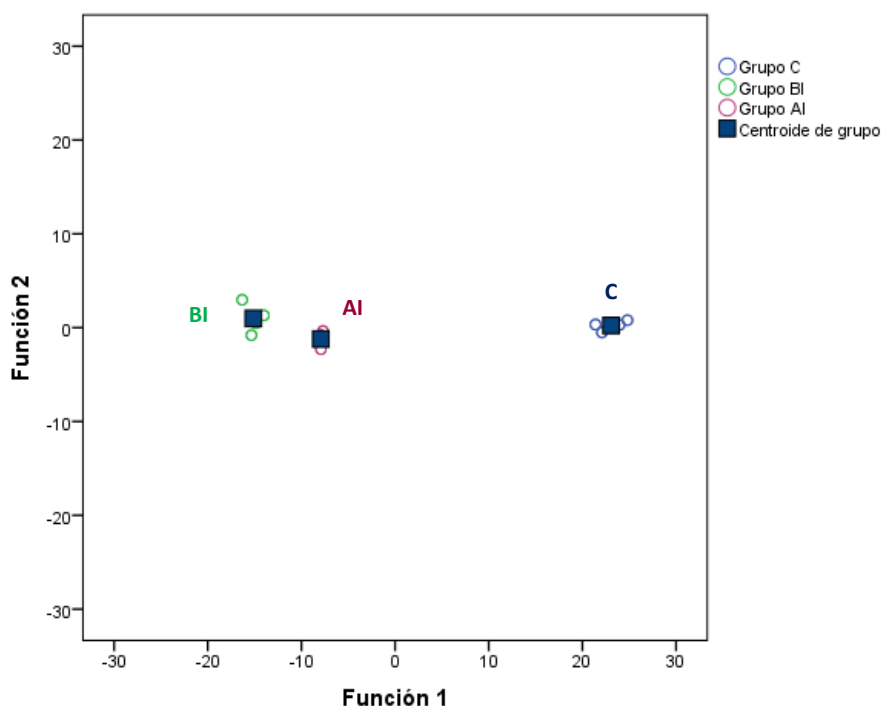


**Tabla 28.** Coeficientes de las funciones discriminantes.

	Función	
	1	2
Delfinidina 3-O-glucósido	1,984	-4,989
Petunidina 3-O-glucósido	-23,325	-5,721
Peonidina 3-O-glucósido	8,786	0,260
Malvidina 3-O-glucósido	20,400	12,293

Los compuestos de mayor contribución a la discriminación fueron petunidina 3-O-glucósido, malvidina 3-O-glucósido, peonidina 3-O-glucósido y delfinidina 3-O-glucósido.

En la Figura 34 se muestra el gráfico con la separación de las muestras empleando las antocianinas.



**Figura 34.** Gráfico en el que se muestra la separación de grupos resultante del análisis discriminante usando las antocianinas de uvas Cabernet Sauvignon. C: grupo control; BI: grupo de tratamientos de baja intensidad; AI: grupo de tratamientos de alta intensidad.



Por lo tanto, los anteriores análisis discriminantes sugieren que los parámetros seleccionados por tener los mayores valores absolutos son los más afectados por la intensidad de las aplicaciones con agua ozonizada. Así, las absorbancias a 520 y 620 nm, el IPT a pH1 y el IPA<sub>v</sub> mostraron unos valores más altos en las uvas del **grupo AI** que en las del **grupo BI** (Tabla 20). Además, también estuvieron influidos por la intensidad de las aplicaciones algunos compuestos C<sub>6</sub> como el 1-hexanol y el *E*-2-hexen-1-ol y determinados terpenoides como la  $\beta$ -ionona y la geranil acetona. Estos compuestos en general se encontraron en concentraciones más elevadas en las uvas del **grupo BI** que en las del **grupo AI** (Tabla 22) y, solo el 1-hexanol y el *E*-2-hexen-1-ol, se encontraron en concentraciones más altas en las uvas de los tratamientos que en los del **grupo C**.

En cuanto a las antocianinas, el grupo más influido por la intensidad de los tratamientos fue el no acilado, destacando de mayor a menor importancia petunidina 3-O-glucósido, malvidina 3-O-glucósido, peonidina 3-O-glucósido y delphinidina 3-O-glucósido. La malvidina 3-O-glucósido se encontró en mayor concentración en las uvas del **grupo AI** que en las del **grupo BI** (Tabla 21). Si se comparan los tratamientos con el **grupo C**, se observa en general una disminución de las antocianinas.

#### **6.1.1.4. Resultados más concluyentes en las uvas Cabernet Sauvignon**

El efecto del agua ozonizada en la uva dependió de las diferentes estrategias de aplicación utilizadas y estuvo influido por el año de la cosecha. Así, al pulverizar la parte superficial de la planta con agua ozonizada (tratamiento aéreo), se observó una mejora del potencial aromático y del color de las uvas. Cuando



dicha aplicación se realizó combinando el tratamiento de riego y el aéreo, se obtuvieron los mejores resultados en los parámetros de calidad de la uva, tanto a nivel fenólico y aromático como en el color. Sin embargo, cuando se aplicó el agua ozonizada mediante endoterapia, se produjo un efecto supresor en la calidad de la uva, pero éste fue menos negativo cuando se combinó la endoterapia con el tratamiento aéreo. Por tanto, los tratamientos de alta intensidad producen uvas de mejor calidad que los de baja intensidad.

## **6.1.2. Macabeo**

### **6.1.2.1. Seguimiento de la maduración**

Al igual que en la variedad Cabernet Sauvignon, el seguimiento de la maduración se realizó sólo durante las cosechas de 2016 y 2017.

En la Tabla 29 se presentan los resultados correspondientes al seguimiento de maduración de las uvas Macabeo en la cosecha de 2016 y en la Tabla 30 los referentes a la cosecha de 2017.



**Tabla 29.** Evolución de los parámetros enológicos convencionales y cromáticos de uvas Macabeo en la cosecha de 2016.

	09/09/2016			13/09/2016			16/09/2016			20/09/2016		
	C2	T2	T3	C2	T2	T3	C2	T2	T3	C2	T2	T3
<b>Parámetros enológicos convencionales</b>												
P100 bayas	112,66 ± 2,17b	110,48 ± 2,72b	99,61 ± 1,33a	114,35 ± 1,20ab	120,30 ± 3,25b	107,05 ± 3,89a	112,35 ± 1,63a	125,85 ± 1,20b	113,20 ± 2,69a	114,04 ± 1,48a	156,75 ± 4,60c	130,75 ± 5,16b
°Bé	10,30 ± 0,12a	10,75 ± 0,06b	10,20 ± 0,12a	12,00 ± 0,23c	11,20 ± 0,01a	11,50 ± 0,12b	11,30 ± 0,12c	11,00 ± 0,01b	10,70 ± 0,12a	11,60 ± 0,01b	11,70 ± 0,01c	11,20 ± 0,01a
pH	4,05 ± 0,02a	3,99 ± 0,06a	3,97 ± 0,12a	3,85 ± 0,17a	3,83 ± 0,02a	3,71 ± 0,08a	3,76 ± 0,03a	3,72 ± 0,02a	3,79 ± 0,10a	3,65 ± 0,01c	3,44 ± 0,01a	3,51 ± 0,01b
AT	5,39 ± 0,01c	5,01 ± 0,01b	4,73 ± 0,01a	5,10 ± 0,01c	4,93 ± 0,01b	4,65 ± 0,01a	3,39 ± 0,01a	3,50 ± 0,01b	3,41 ± 0,01a	2,33 ± 0,01a	3,06 ± 0,19c	2,74 ± 0,01b
°Bé/AT	1,91 ± 0,03a	2,15 ± 0,02b	2,16 ± 0,02b	2,35 ± 0,04a	2,27 ± 0,01a	2,47 ± 0,02b	3,33 ± 0,02b	3,14 ± 0,01a	3,14 ± 0,02a	4,99 ± 0,01c	3,84 ± 0,19a	4,09 ± 0,01b
<b>Parámetros cromáticos</b>												
A420	0,17 ± 0,01c	0,14 ± 0,01b	0,10 ± 0,01a	0,24 ± 0,02b	0,23 ± 0,01b	0,18 ± 0,01a	0,18 ± 0,01a	0,30 ± 0,04b	0,21 ± 0,01a	0,60 ± 0,01c	0,22 ± 0,01a	0,35 ± 0,02b

P100 bayas: peso de 100 bayas (g); °Bé: grados Baumé; AT: acidez total (g/L de ácido tartárico); A420: absorbancias a 420 nm; C2: cepas control (sin tratar); T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=4) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y punto de muestreo, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p≤0,05).

**Tabla 30.** Evolución de los parámetros enológicos convencionales y cromáticos de uvas Macabeo en la cosecha de 2017.

	24/08/2017		28/08/2017		30/08/2017		31/08/2017		
	C3	T4	C3	T4	C3	T4	C3	T4	
<i>Parámetros enológicos convencionales</i>									
P100 bayas	98,50 ± 0,01a	99,45 ± 3,46a	93,30 ± 1,41a	105,30 ± 4,10a	101,85 ± 3,32a	94,70 ± 4,81a	106,85 ± 11,38a	102,50 ± 1,41a	122,80 ± 2,69b
°Bé	11,60 ± 0,01c	10,60 ± 0,01b	10,20 ± 0,01a	10,40 ± 0,01a	10,40 ± 0,01a	9,80 ± 0,01a	10,80 ± 0,01b	11,55 ± 0,06c	11,15 ± 0,05b
pH	3,54 ± 0,01b	3,56 ± 0,01c	3,43 ± 0,01a	3,50 ± 0,01c	3,49 ± 0,01b	3,52 ± 0,01b	3,53 ± 0,01b	3,44 ± 0,01a	3,43 ± 0,01a
AT	3,39 ± 0,08b	2,89 ± 0,05a	3,58 ± 0,08b	2,83 ± 0,03a	3,06 ± 0,08b	2,40 ± 0,01a	2,48 ± 0,05a	3,13 ± 0,08b	2,34 ± 0,03a
°Bé/AT	3,42 ± 0,07b	3,67 ± 0,06c	2,85 ± 0,05a	3,67 ± 0,03b	3,40 ± 0,07a	4,08 ± 0,01b	4,36 ± 0,08c	3,69 ± 0,06a	4,76 ± 0,04b
<i>Parámetros cromáticos</i>									
A420	0,33 ± 0,01b	0,29 ± 0,01a	0,67 ± 0,02c	0,34 ± 0,02b	0,28 ± 0,01a	0,16 ± 0,00a	0,18 ± 0,00b	0,22 ± 0,00c	0,47 ± 0,01ab

P100 bayas: peso de 100 bayas (g); °Bé: grados Baumé; AT: acidez total (g/L de ácido tartárico); A420: absorbancias a 420 nm; C3: cepas control (sin tratar); T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=4) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y punto de muestreo, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p≤0,05).



En el año 2016, T3 disminuyó el peso de 100 bayas en el primer muestreo y lo aumentó en el cuarto muestreo, mientras que T2 lo aumentó en el tercer y cuarto muestreo. Sin embargo, en la campaña 2017 el peso de 100 bayas no estuvo influenciado por los tratamientos con agua ozonizada en los tres primeros muestreos, pero lo aumentaron en el cuarto muestreo. Si comparamos ambas cosechas, en la de 2016 este parámetro fue mayor con respecto a la cosecha de 2017, seguramente debido a que dicho período fue más lluvioso (Tabla 7).

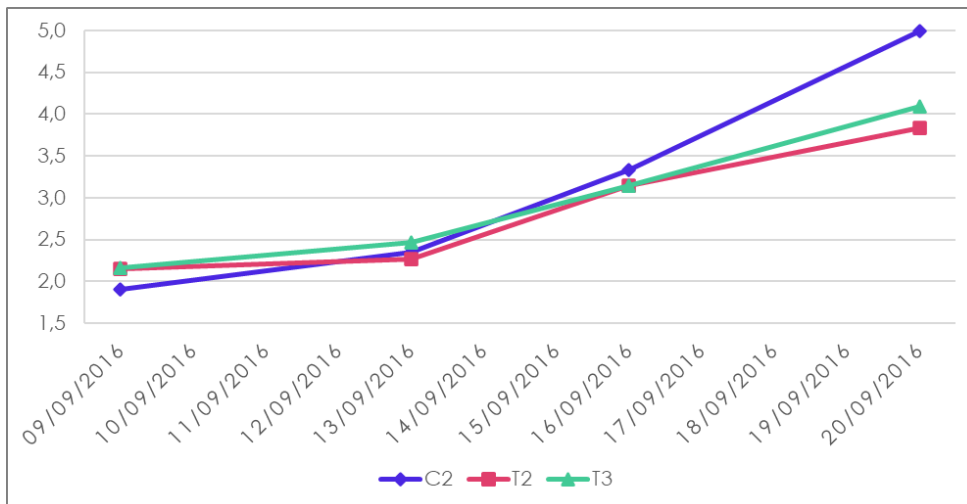
Los tratamientos influyeron en el grado Baumé (°Bé) de manera diferente dependiendo de la estrategia de aplicación, ya que T2 y T3 lo disminuyeron en el segundo y tercer muestreo y T4 y T5 lo disminuyeron en el primer, segundo y cuarto muestreo, pero lo aumentaron en el tercer muestreo.

Con respecto al pH, en la cosecha de 2016 no hubo diferencias significativas entre los tratamientos y sus respectivos controles, excepto en el cuarto muestreo que los tratamientos lo disminuyeron. Sin embargo, si comparamos estos resultados con los obtenidos en otros estudios realizados en La Mancha (García *et al.*, 2003), los valores son más altos en todas las uvas (control y tratamiento), lo que podría deberse al verano cálido de ese año. En la cosecha de 2017, T4 aumentó el pH en el primer y segundo muestreo y T5 en el segundo y cuarto muestreo. Si comparamos ambas cosechas, en la de 2016 la acidez total y pH fueron superiores a la de 2017.

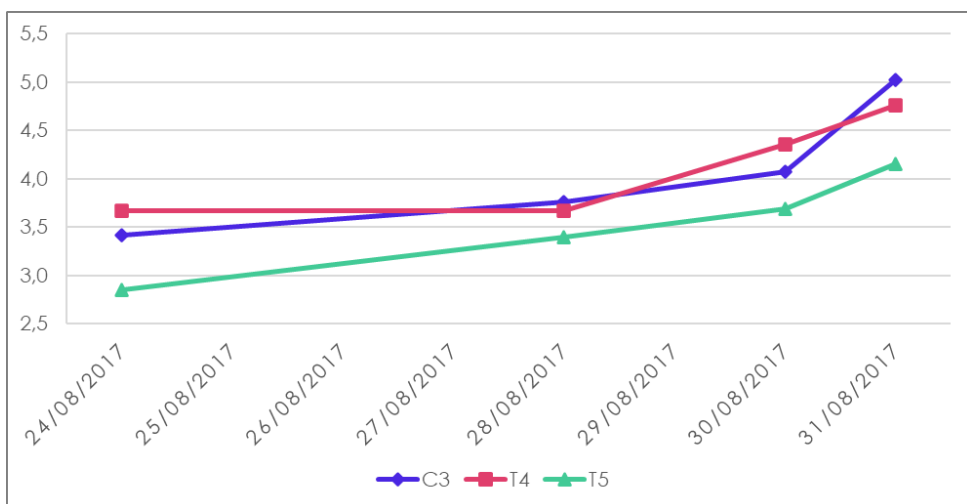
En las Figuras 35 y 36 se muestra como la relación °Bé/AT fue aumentando conforme se iba acercando el momento de vendimia tanto en la cosecha de 2016 como en la de 2017.







**Figura 35.** Evolución del parámetro °Bé/AT en uvas Macabeo en la cosecha de 2016. C2: cepas control (sin tratar); T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo.

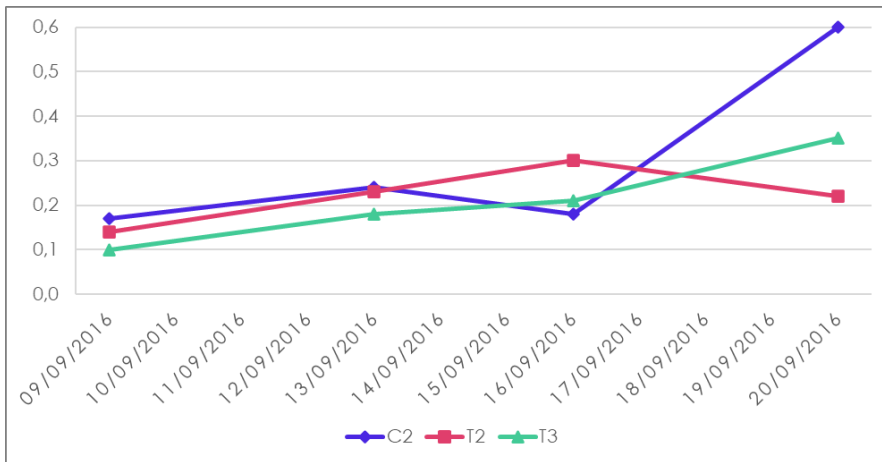


**Figura 36.** Evolución del parámetro °Bé/AT en uvas Macabeo en la cosecha de 2017. C3: cepas control (sin tratar); T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo.

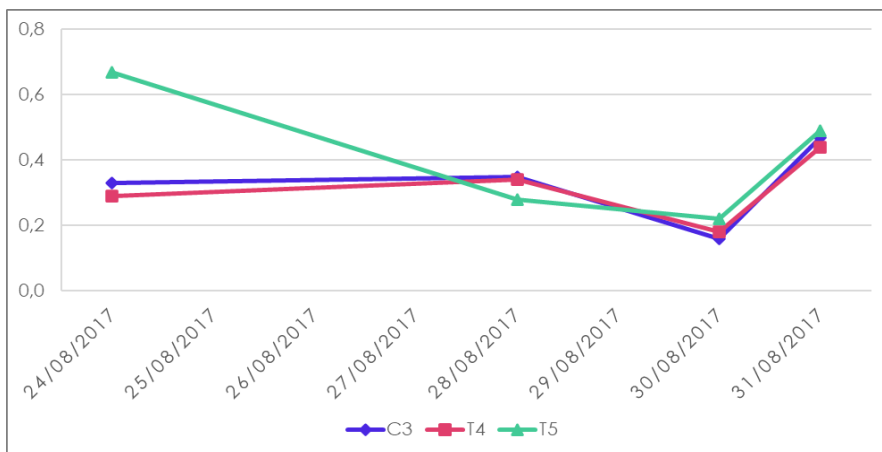
La absorbancia a 420 nm que informa de la presencia de colores amarillos en las uvas también estuvo influenciada por los tratamientos con agua ozonizada (Figs. 37 y 38). Los tratamientos T2 y T4 la disminuyeron en el primer y cuarto muestreo pero la aumentaron en el tercero y T5 la aumentó en el primer y tercer



muestreo, con respecto a las uvas control. El tratamiento T3 aumentó los colores amarillos de las uvas conforme iba madurando la uva. Sin embargo, T2 los aumentó en los tres primeros muestreos y los disminuyó en el último muestreo, T4 los aumentó entre el primer y segundo muestreo pero en el tercer muestreo los disminuyó y T5 en cambio, fue disminuyendo los tonos amarillos con la madurez de la uva hasta el tercer muestreo y en el último muestreo los aumentó.



**Figura 37.** Evolución de la absorbancia a 420 nm en uvas Macabeo en la cosecha de 2016. C2: cepas control (sin tratar); T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo.



**Figura 38.** Evolución de la absorbancia a 420 nm en uvas Macabeo en la cosecha de 2017. C3: cepas control (sin tratar); T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo.



### **6.1.2.2. Momento de vendimia**

El día de la vendimia coincidió con el cuarto muestreo, y en las uvas vendimiadas se analizaron los parámetros enológicos convencionales, el color, el índice de potencial aromático varietal (IPAv), los compuestos volátiles mediante SBSE-GC-MS y los compuestos fenólicos de bajo peso molecular por HPLC-DAD.

#### **6.1.2.2.1. Parámetros enológicos, absorbancia a 420 nm e IPAv de las uvas**

Con el fin de facilitar la comparación entre uvas en el momento de vendimia, aunque parte de estos resultados para las cosechas de 2016 y 2017 ya se vieron anteriormente (Tablas 29 y 30 respectivamente), en la Tabla 31 se vuelven a mostrar, incluyendo el parámetro IPAv, junto con los obtenidos para las uvas de la vendimia de 2015.



**Tabla 31.** Parámetros analizados en uvas Macabeo en el día de vendimia.

	2015			2016			2017		
	C1	T1	C2	T2	T3	C3	T4	T5	
<b>Parámetros enológicos convencionales</b>									
P100 bayas	99,00 ± 0,01b	79,00 ± 0,01a	114,04 ± 1,68c	156,75 ± 4,60f	130,75 ± 5,16e	100,55 ± 9,97b	122,80 ± 2,69d	117,65 ± 6,01cd	
°Bé	10,60 ± 0,01a	11,60 ± 0,01f	11,60 ± 0,01f	11,70 ± 0,01g	11,20 ± 0,01d	11,50 ± 0,01e	11,15 ± 0,05c	11,00 ± 0,01b	
pH	3,63 ± 0,01e	3,40 ± 0,01a	3,65 ± 0,01f	3,44 ± 0,01b	3,51 ± 0,01d	3,46 ± 0,01c	3,43 ± 0,01b	3,51 ± 0,01d	
AT	3,20 ± 0,01d	3,72 ± 0,01e	2,33 ± 0,01a	3,06 ± 0,19c	2,74 ± 0,01b	2,29 ± 0,05a	2,34 ± 0,03a	2,64 ± 0,03b	
°Bé/AT	3,31 ± 0,01b	3,12 ± 0,01a	4,99 ± 0,01f	3,84 ± 0,19c	4,09 ± 0,01d	5,03 ± 0,10f	4,76 ± 0,04e	4,16 ± 0,03d	
<b>Absorbancia 420 nm</b>									
A420	1,37 ± 0,01g	0,40 ± 0,01c	0,60 ± 0,01f	0,22 ± 0,01a	0,35 ± 0,02b	0,47 ± 0,01de	0,44 ± 0,01d	0,49 ± 0,03e	
<b>Madurez aromática</b>									
IPAV	5,87 ± 0,03c	6,84 ± 0,22d	6,09 ± 0,11c	5,42 ± 0,21b	4,72 ± 0,20a	9,61 ± 0,15g	8,55 ± 0,04f	7,74 ± 0,14e	

P100 bayas: peso de 100 bayas (g); °Bé: grados Baumé; AT: acidez total (g/L de ácido tartárico); A420: absorbancias a 420 nm; IPAV: índice de potencial aromático varietal; C1, C2 y C3: cepas control (sin tratar) en las cosechas de 2015, 2016 y 2017 respectivamente; T1: cepas tratadas por tratamiento aéreo; T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=4) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p<0,05).

Los tratamientos aumentaron el peso de 100 bayas en la segunda y tercera cosecha, pero lo disminuyeron en la primera cosecha. Este parámetro fue significativamente mayor en las uvas de 2016 que en las de 2015 y 2017, tanto en los tratamientos como en los controles, probablemente porque en las fechas previas a la vendimia llovió (Tabla 7).

El efecto de la añada tuvo una influencia significativa en el °Baumé (°Bé) de las uvas control, siendo mayor en C2 y C3 que en C1. Los tratamientos lo disminuyeron respecto a sus correspondientes controles en T3, T4 y T5 y lo aumentaron en T1 y T2.

La cosecha tuvo un efecto significativo en el pH de las uvas control, con los valores más bajos en 2017, seguido de 2015 y los valores más altos en 2016. Exceptuando T5, todos los tratamientos lo disminuyeron significativamente.

En cuanto a la acidez total (AT), los valores más altos se obtuvieron en la cosecha de 2015. Los tratamientos produjeron un aumento significativo en AT excepto el tratamiento T4 que produjo el valor más bajo de entre todos los tratamientos.

Como ya se ha comentado anteriormente, las ratios alrededor de 4 son las más adecuadas (Hidalgo, 2011) porque las uvas muestran el mejor equilibrio entre azúcar y acidez. De acuerdo con esto, las uvas control de la cosecha de 2016 tuvieron una madurez tecnológica adecuada, pero las de 2015 y 2017 no ya que una estaba en torno a 3 (2015) y la otra fue superior a 5 (2017). Las uvas de los tratamientos con agua ozonizada mostraron una relación °Bé/AT menor que las uvas control, lo que sugiere que ha habido un retraso en la madurez tecnológica. Si se comparan los valores obtenidos en el momento de vendimia con los de la evolución, se



observa como la relación °Bé/AT ha ido aumentando conforme la uva iba madurando, tal y como era de esperar.

En cuanto a las absorbancias a 420 nm, fueron diferentes en los controles de las tres cosechas, con los valores más altos en 2015. Los tratamientos T1, T2, T3 produjeron una disminución significativa, especialmente T2, mientras que los tratamientos T4 y T5 no influyeron. Esto indica una mayor presencia de tonos amarillos en las uvas de 2015.

Con respecto al IPAv, los valores más altos se obtuvieron en C3 y no hubo diferencias significativas entre C1 y C2. Los tratamientos con agua ozonizada tuvieron una influencia significativa en el IPAv dependiendo de la estrategia de aplicación. Mientras que el tratamiento T1 aumentó significativamente el IPAv de las uvas, el resto lo disminuyeron, especialmente T3. El aumento que produjo T1 fue del 17%, mientras que la disminución que produjo T3 fue de un 22%.

#### **6.1.2.2.2. Composición fenólica y aromática de las uvas**

Los resultados previos indicaron que la añada y los tratamientos con agua ozonizada afectaron a la composición fenólica y aromática de las uvas Macabeo y, por lo tanto, se realizó un análisis detallado de tales compuestos.

La Tabla 32 muestra algunos de los principales compuestos fenólicos de bajo peso molecular de las uvas Macabeo.



**Tabla 32.** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular en uvas Macabeo, en las cosechas de 2016 y 2017 en el día de vendimia.

	2016				2017			
	C2	T2	T3	C3	T4	T5		
<b>Flavonoles (mg/L)</b>								
Queretina 3-O-(glucurónido+glucósido) <sup>a</sup>	1,02 ± 0,06a	0,94 ± 0,03a	0,89 ± 0,02a	0,81 ± 0,00a	0,81 ± 0,00a	0,82 ± 0,00b		
Kaempferol 3-O-glucósido	1,00 ± 0,01a	0,99 ± 0,01a	0,98 ± 0,01a	0,79 ± 0,01a	0,80 ± 0,01a	0,80 ± 0,01a		
<b>Total flavonoles</b>	<b>2,02 ± 0,06a</b>	<b>1,93 ± 0,04a</b>	<b>1,88 ± 0,03a</b>	<b>1,60 ± 0,01a</b>	<b>1,60 ± 0,01a</b>	<b>1,63 ± 0,01b</b>		
<b>Ácidos fenólicos (mg/L)</b>								
Ácido síringico	1,35 ± 0,02a	1,33 ± 0,01a	1,32 ± 0,01a	1,19 ± 0,02a	1,34 ± 0,02b	1,34 ± 0,02b		
Ácido t-caffáico	0,23 ± 0,01c	0,20 ± 0,01b	0,16 ± 0,01a	0,16 ± 0,01c	0,09 ± 0,01a	0,11 ± 0,01b		
<b>Total ácidos fenólicos</b>	<b>1,58 ± 0,03c</b>	<b>1,53 ± 0,01b</b>	<b>1,48 ± 0,02a</b>	<b>1,35 ± 0,01a</b>	<b>1,43 ± 0,01b</b>	<b>1,45 ± 0,02b</b>		

C2 y C3: cepas control (sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo; <sup>a</sup> Queretina 3-O-glucurónido y Queretina 3-O-glucósido, compuestos coeluidos. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=4) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p<0,05).

Los flavonoles, pigmentos amarillos de las uvas, también fueron sensibles a los tratamientos con agua ozonizada, aunque solo se encontraron diferencias significativas con respecto a las uvas control en la cosecha de 2017, permaneciendo constantes en 2016. Si se compara entre cosechas, el contenido de flavonoles fue mayor en 2016 que en 2017. Los tratamientos no influyeron en el contenido de kaempferol 3-O-glucósido ni quercetina 3-O-(glucurónido+glucósido), a excepción de T5 que aumentó este último.

En el grupo de los ácidos fenólicos sólo pudimos cuantificar el ácido siríngico y el ácido *t*-caftárico, y el contenido total de ambos fue superior en 2016 que en 2017. El ácido *t*-caftárico, éster tartárico del ácido caféico, se encontró en menor concentración que el ácido siríngico y disminuyó por efecto de los tratamientos. El ácido siríngico no se vio influenciado por los tratamientos en 2016, pero aumentó en una forma similar en 2017 respecto al control.

La Tabla 33 muestra los principales compuestos volátiles presentes en las uvas control y tratadas con agua ozonizada, durante las cosechas de 2016 y 2017.





**Tabla 33.** Compuestos volátiles en uvas Macabeo, en las cosechas de 2016 y 2017 en el día de vendimia.

	2016			2017		
	C2	T2	T3	C3	T4	T5
<b>Compuestos C6 (µg/L)</b>						
1-Hexanol	277,37 ± 81,27a	393,09 ± 37,19a	352,24 ± 11,59a	126,50 ± 0,42a	134,27 ± 5,98a	120,38 ± 1,60a
E-2-Hexen-1-ol	133,10 ± 32,33a	219,36 ± 37,84a	202,05 ± 0,63a	75,91 ± 2,64a	86,55 ± 3,90a	75,85 ± 1,99a
Z-3-Hexen-1-ol	63,07 ± 11,52a	71,83 ± 0,49a	68,31 ± 3,27a	45,25 ± 1,41b	36,66 ± 0,06a	46,02 ± 1,71b
E-2-Hexenal	176,33 ± 52,06a	275,22 ± 6,23a	241,40 ± 11,09a	89,92 ± 6,28ab	74,12 ± 3,09a	98,47 ± 2,91b
<b>Total compuestos C6</b>	<b>649,87 ± 177,17a</b>	<b>959,50 ± 69,29a</b>	<b>864,00 ± 26,58a</b>	<b>337,57 ± 2,64a</b>	<b>331,59 ± 0,94a</b>	<b>340,72 ± 8,22a</b>
<b>Terpenoides (µg/L)</b>						
β-Ionol	13,96 ± 0,97a	10,26 ± 1,56a	14,87 ± 2,30a	27,23 ± 0,59a	42,84 ± 25,86a	38,11 ± 4,94a
β-Ionona	0,08 ± 0,01a	0,10 ± 0,01a	0,11 ± 0,01a	0,07 ± 0,01a	0,09 ± 0,01a	0,08 ± 0,01a
Farnesol	46,40 ± 10,33a	27,54 ± 6,33a	39,71 ± 21,46a	80,71 ± 8,58a	80,14 ± 3,34a	95,43 ± 0,43a
Geraniol	5,37 ± 0,27a	4,25 ± 0,33a	6,14 ± 2,28a	3,94 ± 0,34a	3,11 ± 0,01a	3,15 ± 0,27a
Geranil acetona	0,67 ± 0,07a	0,32 ± 0,03a	0,79 ± 0,49a	0,51 ± 0,05a	0,39 ± 0,02a	0,42 ± 0,05a
<b>Total terpenoides</b>	<b>66,48 ± 9,68a</b>	<b>42,48 ± 5,14a</b>	<b>61,61 ± 26,53a</b>	<b>112,45 ± 9,56a</b>	<b>126,56 ± 29,17a</b>	<b>137,19 ± 4,18a</b>

C2 y C3: cepas control (sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: cepas tratadas por riego; T3: cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: cepas tratadas por endoterapia; T5: cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=4) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p<0,05).

La Tabla 33 muestra que el contenido total de compuestos C6 en las uvas control de 2016 (C2) fue casi el doble al de las uvas de 2017 (C3), mientras que el contenido de terpenoides fue mayor en 2017 que en 2016, hecho que puede estar relacionado con las diferentes condiciones climáticas en cada cosecha.

Con respecto a sus correspondientes controles, los tratamientos con agua ozonizada no afectaron significativamente al contenido de compuestos C6 ni terpenoides. En cuanto al contenido de terpenoides, destacan el farnesol y el  $\beta$ -ionol, ya que su contenido en 2017 fue muy superior al de 2016, encontrándose el mayor contenido de  $\beta$ -ionol en las uvas del tratamiento T4 y de farnesol en las uvas del tratamiento combinado T5.

Los compuestos aromáticos de las uvas se han evaluado de dos maneras: la primera utilizando el parámetro IPAv (Tabla 31) y la segunda a través del análisis detallado de volátiles (Tabla 33). Al igual que se hizo en la variedad Cabernet Sauvignon, en un intento de relacionar ambos tipos de parámetros de acuerdo con los tratamientos de agua ozonizada, se obtuvieron las proporciones correspondientes. Los tratamientos por riego (T2), riego y aéreo (T3) y endoterapia y aéreo (T5) disminuyeron la relación IPAv/C6, especialmente T3 que la disminuyó un 44% con respecto a las uvas control, lo cual sugiere que potencia la formación de aromas libres C6 más que los demás tratamientos. Los valores de IPAv/terpenoides se mantuvieron alrededor de 0,09, tanto en las uvas control de la cosecha 2016 (C2) como en las uvas control de la cosecha de 2017 (C3). Los tratamientos por riego y aéreo (T3), endoterapia (T4) y endoterapia y aéreo (T5) influyeron en la ratio IPAv/terpenoides disminuyéndola, pero el tratamiento por riego (T2) la aumentó considerablemente, con un valor de 0,13, lo que sugiere



un aumento del 45% con respecto a las uvas control. Por lo tanto, aunque todos los tratamientos favorecen la formación de aromas libres frente a precursores, el tratamiento T2 es el que más favorece la formación de precursores.

### 6.1.2.3. Análisis discriminante de las uvas Macabeo

Al igual que en las uvas Cabernet Sauvignon, se realizó un análisis discriminante agrupando las uvas en tres grupos: **grupo C** (uvas control C2 y C3), **grupo BI** (uvas de los tratamientos de baja intensidad, T2 y T4) y **grupo AI** (uvas de los tratamientos de alta intensidad, T3 y T5).

Se realizaron varios análisis discriminantes, pero se observó que la separación completa de las muestras se logró cuando se usaron los parámetros enológicos convencionales y el IPAv.

En la Tabla 34 se muestran las dos funciones discriminantes (F), de las cuales F1 explicó el 94% de la varianza, mientras que F2 explicó el 6% de la misma, y en la Tabla 35 los parámetros con mayor contribución a la discriminación.

**Tabla 34.** Funciones discriminantes obtenidas cuando se emplearon los parámetros enológicos de uvas Macabeo.

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	103,210a	<b>94,0</b>	94,0	0,995
2	6,638a	<b>6,0</b>	100,0	0,932

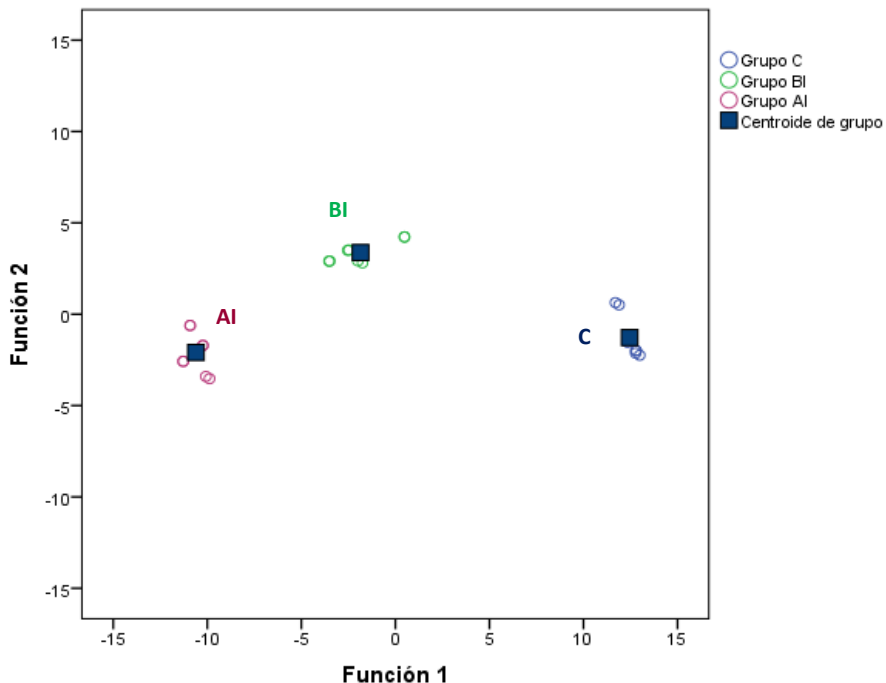


**Tabla 35.** Coeficientes de las funciones discriminantes.

	Función	
	1	2
P100 bayas	-0,465	3,097
°Bé	5,547	0,310
Acidez total	-2,977	-2,320
IPAv	3,093	0,888

Se observa que las variables con los valores absolutos más altos de los coeficientes discriminantes en F1 fueron el °Bé, el IPAv, la acidez total y el peso de 100 bayas, y en F2 fueron el peso de 100 bayas, la acidez total, el IPAv y el °Bé.

En la Figura 39 se observa la separación de las muestras con el análisis discriminante.



**Figura 39.** Gráfico en el que se muestra la separación de grupos resultante del análisis discriminante usando los parámetros enológicos y el IPAv de uvas Macabeo. C: grupo control; BI: grupo de tratamientos de baja intensidad; AI: grupo de tratamientos de alta intensidad.



De todos los parámetros analizados en las uvas el día de vendimia, los más afectados por la intensidad de las aplicaciones con agua ozonizada fueron el °Bé, el IPA<sub>v</sub> y el peso de 100 bayas, que alcanzaron valores más altos en las uvas del **grupo B1** que en las del **grupo A1** (Tabla 31). Sólo el peso de 100 bayas fue mayor en las uvas de los tratamientos que en las del **grupo C**.

#### **6.1.2.4. Resultados más concluyentes en las uvas Macabeo**

Al igual que en la variedad Cabernet Sauvignon, el efecto del agua ozonizada en la uva dependió de las diferentes estrategias de aplicación utilizadas, pero estuvo influido por el año de la cosecha. La mayor repercusión de los tratamientos tuvo lugar en el equilibrio azúcar/acidez de las uvas, que sugiere un retraso en la maduración.

Además, cuando los tratamientos fueron de baja intensidad, se observó un aumento de los precursores aromáticos glicosilados con respecto a los de alta intensidad, mientras que los C<sub>6</sub> permanecieron constantes. Esto podría indicar una mejora de la calidad aromática de las uvas cuando se someten a los tratamientos de riego y de endoterapia sin combinarlos con aplicaciones aéreas.

Estos resultados difieren de los obtenidos en uvas Cabernet Sauvignon, lo cual pone de manifiesto que la repercusión de los tratamientos en la calidad de la uva depende estrechamente de la variedad.



## **6.2. Vinos**

### **6.2.1. Cabernet Sauvignon**

Como se ha indicado en el apartado de Materiales y Métodos, los vinos de la cosecha de 2015 se elaboraron de forma diferente a los del resto de cosechas. Por lo tanto, la discusión de resultados se hará solamente de los vinos de las cosechas de 2016 y 2017.

#### **6.2.1.1. Parámetros enológicos**

En la Tabla 36 se muestran los parámetros enológicos que estiman las características químicas globales de los vinos.

Todos los vinos mostraron una similar cinética de la fermentación alcohólica, y los valores de los parámetros enológicos clásicos se encuentran en los rangos propios de los vinos Cabernet Sauvignon de zonas cálidas que han realizado la fermentación maloláctica, como es el caso que nos ocupa.





**Tabla 36.** Parámetros enológicos de vinos Cabernet Sauvignon procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

	2016			2017		
	C2	T2	T3	C3	T4	T5
<b>Parámetros enológicos convencionales e IPT</b>						
Grado alcohólico (%vol)	15,36 ± 0,10c	14,48 ± 0,10a	14,83 ± 0,10b	15,00 ± 0,10c	12,79 ± 0,10a	14,21 ± 0,10b
pH	3,75 ± 0,01b	3,66 ± 0,01a	3,78 ± 0,01b	3,75 ± 0,02b	3,58 ± 0,01a	3,74 ± 0,01b
AT	4,57 ± 0,05b	4,61 ± 0,02b	4,48 ± 0,02a	4,09 ± 0,14a	4,59 ± 0,09b	4,34 ± 0,16a
AV	0,50 ± 0,01b	0,31 ± 0,01a	0,38 ± 0,01a	0,35 ± 0,02a	0,37 ± 0,03a	0,35 ± 0,01a
IPT	78,88 ± 2,42b	59,90 ± 1,99a	80,27 ± 1,03b	67,83 ± 0,72b	62,73 ± 1,42a	78,81 ± 0,23c
<b>Ácidos, azúcares y glicerol</b>						
Ácido láctico (g/L)	1,00 ± 0,01a	1,11 ± 0,03b	1,25 ± 0,01c	1,06 ± 0,02a	1,30 ± 0,01b	1,37 ± 0,02b
Ácido tartárico (g/L)	1,94 ± 0,05b	2,09 ± 0,02b	1,48 ± 0,13a	1,69 ± 0,03a	2,05 ± 0,02b	1,72 ± 0,02a
Glucosa (g/L)	0,94 ± 0,04b	0,84 ± 0,01a	0,96 ± 0,01b	0,87 ± 0,01a	0,83 ± 0,02a	0,95 ± 0,02b
Fructosa (g/L)	0,90 ± 0,01b	0,66 ± 0,02a	0,54 ± 0,01a	0,37 ± 0,01a	0,34 ± 0,02a	0,36 ± 0,01a
Glucosa/Fructosa	1,05 ± 0,04a	1,29 ± 0,05a	1,79 ± 0,05b	2,35 ± 0,04a	2,49 ± 0,19a	2,63 ± 0,15b
Glicerol (g/L)	13,97 ± 0,13b	12,88 ± 0,10a	12,68 ± 0,17a	12,57 ± 0,10c	10,25 ± 0,02a	11,28 ± 0,08b
<b>IPAV</b>						
IPAV	13,89 ± 0,38c	10,85 ± 0,48a	12,16 ± 0,81b	10,39 ± 0,08c	7,89 ± 0,39a	9,47 ± 0,27b

AT: acidez total (g/L de ácido tartárico); AV: acidez volátil (g/L de ácido acético); IPT: índice de polifenoles totales; IPAV: índice de potencial aromático varietal; C2 y C3: vinos control (procedentes de cepas sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: vinos de cepas tratadas por riego; T3: vinos de cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: vinos de cepas tratadas por endoterapia; T5: vinos de cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=2) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p<0,05).



Tuvo lugar un significativo descenso del grado alcohólico en todos los vinos procedentes de los tratamientos, lo cual es muy interesante, ya que en un escenario de cambio climático se percibe un aumento de graduación de los vinos, en especial en zonas cálidas, mientras que la tendencia del consumidor es hacia vinos de menor graduación alcohólica (Mira de Orduña, 2010). Esto puede deberse a un retraso en la maduración de las uvas procedentes de los tratamientos en relación con el control. No obstante, Pérez *et al.* (1999) observaron una disminución de azúcares en fresas almacenadas en una atmósfera con ozono, lo cual atribuyeron a una activación de la vía de degradación de azúcares en respuesta al estrés oxidativo que el ozono pudo causar. Bellincontro *et al.* (2017) también observaron un menor grado alcohólico en vinos de Petit Verdot tras la fermentación maloláctica, pero en este caso, a diferencia del nuestro, las uvas habían sido tratadas con ozono después de la cosecha.

Los demás parámetros también se vieron influidos por los tratamientos dependiendo de la cosecha y de la estrategia de aplicación. En los vinos de los tratamientos T2 y T4 se observó un descenso significativo del pH que correspondió con un aumento del contenido en ácido tartárico. Sin embargo, los tratamientos T3 y T5 tuvieron un pH y un contenido en ácido tartárico similar a los correspondientes vinos control.

Todos los vinos tuvieron un contenido similar de azúcares reductores (por debajo de 2 g/L) tras la fermentación alcohólica, por lo que se consideran vinos secos, en los que la mayor parte de los azúcares del mosto han sido consumidos. Sin embargo, ha habido una mayor preferencia de las levaduras por la fructosa que por la glucosa, como se puede ver en la Tabla 36, ya que mientras





los contenidos de glucosa son similares en todos los vinos en relación con su control, entre 0,83 y 0,96 g/L, los de fructosa fueron inferiores a los de la glucosa, en especial en los vinos de la cosecha de 2017 (en torno a 0,35 g/L). Como consecuencia, se observó una ratio glucosa/fructosa superior a 1 en todos los vinos, que fue significativamente mayor en los procedentes de los tratamientos T3 y T5.

El glicerol fue el segundo compuesto más abundante de los vinos, después del etanol, y tiene un efecto positivo en la calidad, ya que contribuye al cuerpo de los vinos, así como a potenciar la intensidad del sabor (Arroyo-López *et al.*, 2010). En la bibliografía se indica que el contenido en glicerol de los vinos varía entre 4 y 15 g/L, situándose alrededor de 7 g/L en la mayoría de ellos (Zhao *et al.*, 2015). En los vinos objeto de estudio los valores se situaron entre 10,25 y 13,97 g/L, encontrándose los mayores contenidos en los vinos con las mayores graduaciones alcohólicas, ya que todos los tratamientos con agua ozonizada lo disminuyeron en relación con su correspondiente control, en especial en el caso de los vinos del tratamiento T4. Actualmente, se tiende a elaborar vinos con baja graduación alcohólica, pero con óptima calidad sensorial, para ello se proponen nuevas cepas de levaduras capaces de trabajar en diferentes ambientes (Maturano *et al.*, 2019). En este trabajo se pone de manifiesto que los tratamientos con agua ozonizada reducen el grado alcohólico de los vinos, independientemente de la estrategia de aplicación, y aunque disminuyen el contenido en glicerol, aun así, se mantiene este compuesto en niveles altos.

Los parámetros que miden a nivel global el contenido en metabolitos secundarios son el índice de polifenoles totales (IPT) y el índice de potencial aromático varietal (IPAv), éste último, como ya



se ha venido comentando, siendo una estimación de los precursores glicosilados de las uvas que permanecen intactos en los vinos. Varios trabajos realizados aplicando ozono en uvas, una vez que habían sido cosechadas, han demostrado que tiene lugar una estimulación de la defensa de la planta aumentando la síntesis de compuestos fenólicos de la baya (Mencarelli and Bellincontro, 2018) y favoreciéndose la glicosilación de compuestos aromáticos (De Sanctis *et al.*, 2015). Sin embargo, estos resultados son contradictorios, dependiendo de muchos factores tales como la variedad de uva, su estado de hidratación, la dosis aplicada de ozono y la estrategia de su aplicación, así como la temperatura a la que fue realizada (Mencarelli and Bellincontro, 2018). Además, tales efectos podrían deberse más a que el ozono podría modificar la permeabilidad de la pared y la membrana celular de las bayas, que a la formación o no de polifenoles y compuestos aromáticos (Paissoni *et al.*, 2017). Nuestros resultados muestran que los vinos de los tratamientos T2 y T4 disminuyeron el IPT y el IPAv, que también tuvieron los menores valores de pH. Los vinos de los tratamientos T3 y T5 mostraron valores similares de IPT y mayores valores de IPAv que los tratamientos T2 y T4.

#### **6.2.1.2. Parámetros cromáticos**

El color es uno de los atributos más importantes de los vinos tintos, y son los compuestos fenólicos, los principales responsables de éste (Heredia *et al.*, 1998), en especial las antocianinas o sus derivados que son extraídos de las uvas o formados durante el proceso de vinificación.

En la Tabla 37 se muestran los resultados de los parámetros cromáticos de los vinos.



**Tabla 37.** Parámetros cromáticos de vinos Cabernet Sauvignon procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

	2016			2017		
	C2	T2	T3	C3	T4	T5
A420	0,55 ± 0,02b	0,49 ± 0,02a	0,58 ± 0,01c	0,41 ± 0,01c	0,25 ± 0,01a	0,35 ± 0,01b
A520	0,93 ± 0,03b	0,87 ± 0,04a	0,97 ± 0,01c	0,59 ± 0,01c	0,38 ± 0,01a	0,50 ± 0,01b
A620	0,20 ± 0,01a	0,20 ± 0,01a	0,21 ± 0,01a	0,14 ± 0,01c	0,08 ± 0,01a	0,12 ± 0,01b
IC	16,85 ± 0,58b	15,63 ± 0,70a	17,56 ± 0,24c	11,44 ± 0,04c	7,13 ± 0,07a	9,76 ± 0,02b
T	0,59 ± 0,01a	0,56 ± 0,01a	0,60 ± 0,01a	0,71 ± 0,01b	0,66 ± 0,01a	0,71 ± 0,01b
α*	36,66 ± 0,22b	37,11 ± 0,20c	35,08 ± 0,25a	41,97 ± 0,04a	45,41 ± 0,39b	45,59 ± 0,01b
b*	11,78 ± 0,19b	12,13 ± 0,18c	10,69 ± 0,19a	18,74 ± 0,04a	24,67 ± 0,43c	23,88 ± 0,01b
L*	6,83 ± 0,11b	7,04 ± 0,10c	6,20 ± 0,11a	10,90 ± 0,02a	15,95 ± 0,25c	14,04 ± 0,01b
C*	38,50 ± 0,27b	39,04 ± 0,24c	36,67 ± 0,30a	45,97 ± 0,06a	51,68 ± 0,55b	51,47 ± 0,01b
H*	17,82 ± 0,17b	18,10 ± 0,16b	16,95 ± 0,17a	24,06 ± 0,02a	28,51 ± 0,21c	27,65 ± 0,01b
ΔEab*	0,01 ± 0,01a	0,64 ± 0,07b	2,12 ± 0,27c	0,01 ± 0,01a	8,83 ± 0,58c	7,28 ± 0,06b

A420, 520, 620: absorbancias a 420, 520 y 620 nm; IC: intensidad colorante; T: tonalidad; parámetros CIELAB; α\*: coordenada rojo-verde, b\*: coordenada amarillo-azul, L\*: claridad, C\* croma, H\* tonalidad y ΔEab\* diferencias cromáticas entre los vinos control y los tratamientos; C2 y C3: vinos control (procedentes de cepas sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: vinos de cepas tratadas por riego; T3: vinos de cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: vinos de cepas tratadas por endoterapia; T5: vinos de cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=2) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (ps<0,05).



Los vinos de la cosecha 2016 tuvieron una intensidad colorante (IC) mayor que los de 2017 debido a que todas las absorbancias fueron más altas, lo que está de acuerdo con los valores obtenidos de IPT. Los vinos resultantes de los tratamientos tuvieron una IC más baja que sus respectivos vinos control, excepto el vino T3 que alcanzó la IC más alta y el vino T4 que tuvo la IC más baja. Como se esperaba, los vinos con la IC más baja en cada cosecha también fueron los que obtuvieron un valor de IPT más bajo (Tabla 36). No se observaron diferencias en la tonalidad de los vinos de 2016; en cambio, en los vinos de 2017, los que provenían del tratamiento por endoterapia (T4) tuvieron un valor de tonalidad ligeramente más bajo que el resto. Por tanto, los vinos del tratamiento T3 mostraron el mejor color y los vinos del tratamiento T4 el peor.

Los parámetros CIELAB, además de informar sobre el color, también nos indican cómo éste es percibido sensorialmente por parte del consumidor. Es decir, los parámetros CIELAB complementan los índices cromáticos anteriores, ya que tienen en cuenta elementos de color tales como la fuente de luz, el objeto y el observador, que definen el funcionamiento psicosenorial del ojo humano, y se ha demostrado que están correlacionados con el análisis sensorial (Monagas *et al.*, 2005).

Los vinos de la cosecha 2017 tuvieron valores más altos de  $a^*$  (componente roja cuando es positiva),  $b^*$  (componente amarilla cuando es positiva) y  $L^*$  (claridad) que los vinos de 2016, así como un mayor croma ( $C^*$ ) y tonalidad ( $H^*$ ), lo que significa que fueron menos oscuros y tuvieron colores más puros y menos rojos que los de 2016. Estos resultados están de acuerdo con los valores de IC discutidos anteriormente.



Con respecto a la percepción del color por parte del consumidor, en comparación con los vinos control correspondientes, solo los vinos T4 y T5 podrían distinguirse por el ojo humano, ya que tienen un  $\Delta E_{ab}^* > 3$  (Alcalde-Eón *et al.*, 2019).

### **6.2.1.3. Composición fenólica**

En la Tabla 38 se muestra el contenido de los principales compuestos fenólicos de bajo peso molecular, en los vinos procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada y en los vinos control.

Se puede observar que los vinos de los tratamientos T3 y T5 tuvieron el mayor contenido total de compuestos fenólicos en las cosechas de 2016 y 2017. La añada también influyó en el contenido polifenólico, ya que los vinos control de 2017 tuvieron contenidos más altos que los de 2016.

Entre los diferentes grupos de compuestos fenólicos estudiados, predominaron las antocianinas, seguidos por los flavanoles, ácidos y flavonoles. El total de los ácidos fenólicos varió según los tratamientos, siendo el ácido gálico el compuesto más abundante y, por lo tanto, el que decidió el comportamiento de dicho grupo. Se observó un claro efecto de los tratamientos T2, T3 y T4 sobre el contenido de ácido gálico de los vinos, ya que disminuyó significativamente en comparación con el correspondiente control.

En el grupo de los flavanoles, la (+) catequina fue el compuesto más abundante y se vio afectada por los tratamientos con agua ozonizada, disminuyendo en los vinos T2 más del 45%. Sin embargo, en los vinos del tratamiento T4, su contenido fue similar al del vino control, y en los vinos de los tratamientos T3 y T5, aumentó significativamente. Un comportamiento similar se observó en la (-)



epicatequina, aunque la disminución en el vino T2 fue del 24%. Cabe señalar que, aunque los flavanoles no son compuestos coloreados, se ha demostrado que son cofactores en las reacciones de copigmentación con antocianinas, y pueden participar en el color de los vinos tintos jóvenes (González-Manzano *et al.*, 2009), aunque las proporciones de los componentes involucrados en la copigmentación deben ser adecuadas (He *et al.*, 2012).





**Tabla 38.** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular de vinos Cabernet Sauvignon procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

	2016			2017		
	C2	T2	T3	C3	T4	T5
	<b>Ácidos (mg/L)</b>					
Ácido gálico	26,00 ± 0,09c	21,66 ± 0,37a	23,84 ± 0,41b	33,06 ± 0,10b	28,18 ± 0,18a	33,56 ± 0,20b
Ácido siríngico	7,06 ± 0,48b	3,85 ± 0,41a	7,88 ± 0,29c	4,51 ± 0,25a	4,36 ± 0,34a	4,50 ± 0,22a
Ácido <i>t</i> -p-cutárico	2,14 ± 0,11c	1,44 ± 0,14a	1,76 ± 0,10b	1,41 ± 0,01b	1,26 ± 0,03a	1,26 ± 0,03a
<b>Total ácidos</b>	<b>35,20 ± 0,62c</b>	<b>26,95 ± 0,29a</b>	<b>33,48 ± 0,72b</b>	<b>38,98 ± 0,16b</b>	<b>33,80 ± 0,49a</b>	<b>39,32 ± 0,02b</b>
	<b>Flavonoles (mg/L)</b>					
(+) Catequina	139,16 ± 12,80b	74,02 ± 6,44a	156,01 ± 2,02c	173,09 ± 1,49a	180,27 ± 1,34a	205,31 ± 0,77b
(-) Epicatequina	57,64 ± 5,25b	42,56 ± 1,13a	64,18 ± 2,34c	134,72 ± 1,64a	127,64 ± 2,47a	148,96 ± 2,17b
<b>Total flavanoles</b>	<b>196,79 ± 18,00b</b>	<b>116,58 ± 6,71a</b>	<b>220,19 ± 3,52c</b>	<b>307,81 ± 3,13a</b>	<b>307,91 ± 1,13a</b>	<b>354,27 ± 1,40b</b>
	<b>Flavonoles (mg/L)</b>					
Quer cetina	1,56 ± 0,06b	1,27 ± 0,03a	1,28 ± 0,02a	1,52 ± 0,02a	1,24 ± 0,01a	1,28 ± 0,01a
Miricetina	1,26 ± 0,04a	1,28 ± 0,03a	1,47 ± 0,01b	1,09 ± 0,01a	0,96 ± 0,01a	1,05 ± 0,01a
Miricetina 3-O-(glucurónido+glucósido) <sup>a</sup>	5,91 ± 0,45a	5,21 ± 0,12a	7,97 ± 0,14b	7,48 ± 0,13b	4,91 ± 0,11a	7,15 ± 0,06b
Quer cetina 3-O-(glucurónido+glucósido) <sup>b</sup>	5,92 ± 0,28b	5,91 ± 0,10b	4,40 ± 0,04a	5,53 ± 0,02c	3,87 ± 0,02a	4,31 ± 0,05b
Laricítina 3-O-(glucósido/galactósido) <sup>c</sup>	1,91 ± 0,04a	1,82 ± 0,03a	2,04 ± 0,01a	2,03 ± 0,06a	1,60 ± 0,09a	1,89 ± 0,05a
Kaempferol 3-O-glucósido	1,08 ± 0,02a	1,02 ± 0,01a	0,99 ± 0,02a	1,21 ± 0,02b	0,98 ± 0,01a	1,06 ± 0,01a
Siringetina 3-O-glucósido	2,81 ± 0,15a	2,30 ± 0,03a	2,85 ± 0,02a	3,19 ± 0,03b	2,53 ± 0,01a	3,05 ± 0,01b
<b>Total flavonoles</b>	<b>20,45 ± 1,02b</b>	<b>18,81 ± 0,28a</b>	<b>21,00 ± 0,10b</b>	<b>22,05 ± 0,15b</b>	<b>16,09 ± 0,08a</b>	<b>19,79 ± 0,17b</b>

(Continúa la tabla en la página siguiente)



**Tabla 38 (continuación).** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular de vinos Cabernet Sauvignon procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

	2016		2017			
	C2	T2	T3	C3	T4	T5
<i>Antocianinas no aciladas (mg/L)</i>						
Delfinidina 3-O-glucósido	15,03 ± 1,36a	13,73 ± 0,86a	17,71 ± 0,72b	19,78 ± 0,06c	14,84 ± 0,12a	17,35 ± 0,14b
Cianidina 3-O-glucósido	7,72 ± 0,19a	7,70 ± 0,24a	7,49 ± 0,39a	8,30 ± 0,08a	7,35 ± 0,06a	8,08 ± 0,13a
Petunidina 3-O-glucósido	17,73 ± 1,87b	14,80 ± 1,09a	25,28 ± 1,21c	25,57 ± 0,51c	17,24 ± 0,18a	20,76 ± 0,10b
Peonidina 3-O-glucósido	15,12 ± 1,21b	12,08 ± 0,57a	13,06 ± 0,71a	15,12 ± 0,16b	11,92 ± 0,25a	13,00 ± 0,47a
Malvidina 3-O-glucósido	168,37 ± 17,27b	140,45 ± 8,98a	239,95 ± 9,50c	204,55 ± 0,45b	178,46 ± 0,29a	213,83 ± 0,30c
<b>Total antocianinas no aciladas</b>	<b>223,97 ± 21,61b</b>	<b>188,76 ± 11,59a</b>	<b>303,49 ± 11,22c</b>	<b>273,32 ± 0,07b</b>	<b>229,81 ± 0,89a</b>	<b>273,02 ± 1,13b</b>
<i>Antocianinas aciladas (mg/L)</i>						
Petunidina 3-O-(6'-O-acetil)-glucósido	8,80 ± 0,22a	8,70 ± 0,13a	8,71 ± 0,06a	11,50 ± 0,04c	9,31 ± 0,06a	10,37 ± 0,08b
Peonidina 3-O-(6'-acetil)-glucósido	11,89 ± 0,75b	9,92 ± 0,29a	16,96 ± 0,31c	14,70 ± 0,22b	12,62 ± 0,20a	14,84 ± 0,97b
Malvidina 3-O-(6'-acetil)-glucósido	85,56 ± 10,55b	71,38 ± 5,32a	121,94 ± 5,94c	97,83 ± 1,39a	94,69 ± 0,88a	111,83 ± 1,79b
Malvidina 3-(6'-t-cafeoil)-glucósido	7,78 ± 0,21b	6,94 ± 0,09a	11,09 ± 0,10c	9,59 ± 0,19a	8,76 ± 0,13a	9,23 ± 0,07a
Petunidina 3-(6'-p-cumaroil)-glucósido	7,00 ± 0,22b	6,71 ± 0,09a	6,75 ± 0,05a	7,78 ± 0,04c	6,71 ± 0,03a	7,02 ± 0,08b
Malvidina 3-(6'-p-cumaroil)-glucósido	25,56 ± 2,40b	21,32 ± 1,24a	36,42 ± 1,57c	33,00 ± 0,35c	27,00 ± 0,57a	30,61 ± 0,41b
<b>Total antocianinas aciladas</b>	<b>146,59 ± 14,26b</b>	<b>124,97 ± 7,09a</b>	<b>201,87 ± 7,71c</b>	<b>174,40 ± 0,98b</b>	<b>159,09 ± 1,21a</b>	<b>183,90 ± 0,34c</b>
<b>Total antocianinas</b>	<b>370,56 ± 35,61b</b>	<b>313,73 ± 18,62a</b>	<b>505,36 ± 18,81c</b>	<b>447,72 ± 1,06b</b>	<b>388,90 ± 2,11a</b>	<b>456,92 ± 0,78c</b>
<b>TOTAL COMPUESTOS FENÓLICOS (mg/L)</b>	<b>618,32 ± 55,00b</b>	<b>476,07 ± 25,49a</b>	<b>780,03 ± 15,09c</b>	<b>816,56 ± 2,08b</b>	<b>746,70 ± 3,65a</b>	<b>870,30 ± 2,00c</b>

C2 y C3: vinos control (procedentes de cepas sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: vinos de cepas tratadas por riego; T3: vinos de cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: vinos de cepas tratadas por endoterapia; T5: vinos de cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo; <sup>a</sup> Miricetina 3-O-glucurónido y Miricetina 3-O-glucósido, compuestos coeluidos; <sup>b</sup> Quercetina 3-O-glucurónido y Quercetina 3-O-glucósido, compuestos coeluidos; <sup>c</sup> Puede ser glucósido o galactósido de laricitina. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=2) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p<0,05).





El contenido total de flavonoles en los vinos no se vio afectado por los tratamientos T3 y T5, ya que no se encontraron diferencias significativas con sus respectivos vinos control. Sin embargo, disminuyeron en los vinos de los tratamientos T2 y T4.

Los compuestos más abundantes entre los flavonoles fueron los glucósidos, especialmente los derivados de quercetina y miricetina, que representaron alrededor del 30% del total de flavonoles cada uno. Los flavonoles facilitan la extracción de antocianinas durante la vinificación (Hermosín-Gutiérrez *et al.*, 2011), lo cual está en concordancia con los resultados obtenidos. En efecto, se encontró un mayor contenido de antocianinas en aquellos vinos en donde fue mayor el contenido de flavonoles, independientemente de los tratamientos y las cosechas.

Las antocianinas son los principales compuestos responsables del color de los vinos tintos jóvenes, y su contenido se vio influenciado significativamente por los tratamientos con agua ozonizada. Aunque se observó un efecto de la añada, pues los vinos control de 2017 tuvieron un mayor contenido que los de 2016, las concentraciones reportadas fueron similares a las que se suelen encontrar en vinos Cabernet Sauvignon producidos en climas similares (Gil *et al.*, 2015). Estas diferencias pueden deberse a las condiciones meteorológicas, ya que 2017 fue un año poco lluvioso, a diferencia de 2016, como se puede ver en la Tabla 7.

El contenido de antocianinas de los vinos es una característica varietal, que depende fuertemente de factores climáticos y agronómicos (González-Neves *et al.*, 2007), y que también está influido por las condiciones del proceso de vinificación, especialmente por la etapa de maceración (González-San José *et al.*, 1990). Los tratamientos T3 y T5 con agua ozonizada aumentaron



significativamente el contenido total de antocianinas en relación con los vinos control, aunque en los vinos T3 aumentaron tanto las aciladas como las no aciladas y en los vinos T5 solo las antocianinas aciladas. En cambio, los tratamientos T2 y T4 disminuyeron el contenido de ambos tipos de antocianinas.

#### **6.2.1.4. Composición aromática**

En la Tabla 39 se muestran los compuestos volátiles más importantes encontrados en los vinos, agrupados por familias, así como el umbral de percepción olfativa de cada compuesto junto con el descriptor olfativo.

Tal y como se espera, los alcoholes fueron los compuestos más abundantes, seguidos por los ésteres y los ácidos, mientras que los terpenoides fueron los compuestos de menor concentración. Todos los compuestos volátiles analizados se encontraron dentro de los rangos de vinos con características similares.

Los tratamientos con agua ozonizada afectaron al contenido volátil total de manera diferente dependiendo de la estrategia de aplicación, pero en general, se observó que los vinos de los tratamientos con el mayor número de aplicaciones (T3 y T5) tuvieron contenidos totales más altos, aunque no hubo diferencias significativas con el vino control en el caso del tratamiento T5.

A nivel individual, el comportamiento difiere mucho de un compuesto a otro. Por ejemplo, en el grupo de los ácidos, se observó un efecto significativo de los tratamientos con agua ozonizada sobre los ácidos hexanoico y octanoico, que aumentaron con respecto a sus vinos control correspondientes, especialmente en el caso del ácido octanoico en los vinos T2 y T4. Solo los ácidos hexanoico y octanoico excedieron su umbral de



percepción olfativa (UPO) correspondiente y, aunque están relacionados con olores desagradables, en los contenidos encontrados se consideran necesarios para el buen equilibrio del aroma del vino (Flanzy, 2000).





**Tabla 39.** Compuestos aromáticos de vinos Cabernet Sauvignon procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

UPO	Descriptor aromático	2016			2017		
		C2	T2	T3	C3	T4	T5
<b>Ácidos (mg/L)</b>							
Ácido decanoico	1 mg/L (a)	0,35 ± 0,03a	0,44 ± 0,02a	0,32 ± 0,04a	0,34 ± 0,01a	0,39 ± 0,01a	0,37 ± 0,04a
Ácido hexanoico	0,42 mg/L (a)	<b>3,74 ± 0,20a</b>	<b>5,19 ± 0,21b</b>	<b>5,01 ± 0,72b</b>	<b>3,43 ± 0,01a</b>	<b>4,61 ± 0,31b</b>	<b>3,98 ± 0,67b</b>
Ácido octanoico	0,50 mg/L (a)	<b>1,44 ± 0,10a</b>	<b>2,14 ± 0,14c</b>	<b>1,73 ± 0,19b</b>	<b>1,48 ± 0,10a</b>	<b>2,13 ± 0,04c</b>	<b>1,74 ± 0,23b</b>
<b>Total ácidos</b>		<b>5,52 ± 0,31a</b>	<b>7,77 ± 0,33b</b>	<b>7,06 ± 0,95b</b>	<b>5,25 ± 0,11a</b>	<b>7,14 ± 0,25b</b>	<b>6,09 ± 0,94b</b>
<b>Alcoholes (mg/L)</b>							
Alcoholes amilicos	30 mg/L (a)	<b>267,39 ± 6,06a</b>	<b>279,76 ± 18,02a</b>	<b>300,99 ± 21,40a</b>	<b>221,25 ± 4,04a</b>	<b>187,66 ± 2,64a</b>	<b>211,12 ± 3,75a</b>
2-feniletanol	10 mg/L (a)	<b>51,61 ± 2,01a</b>	<b>66,45 ± 4,72b</b>	<b>73,41 ± 6,18b</b>	<b>46,27 ± 0,11b</b>	<b>35,31 ± 0,28a</b>	<b>44,61 ± 1,48b</b>
1-hexanol	8 mg/L (b)	1,02 ± 0,03b	1,08 ± 0,08b	0,95 ± 0,07a	0,55 ± 0,02a	0,55 ± 0,01a	0,54 ± 0,02a
<b>Total alcoholes</b>		<b>320,02 ± 5,43a</b>	<b>347,29 ± 22,61b</b>	<b>375,36 ± 26,51b</b>	<b>268,08 ± 4,18b</b>	<b>223,52 ± 2,37a</b>	<b>256,27 ± 5,25b</b>
<b>Ésteres de etilo y acetatos (µg/L)</b>							
Dihidrocinnamato de etilo	1,6 µg/L (b)	0,25 ± 0,02a	0,48 ± 0,03b	0,42 ± 0,05b	0,29 ± 0,03a	0,35 ± 0,01a	0,40 ± 0,01a
Vainillato de etilo	8000 µg/L (c)	66,58 ± 5,99b	59,42 ± 4,90b	37,51 ± 3,13a	30,81 ± 1,12b	18,44 ± 1,31a	22,35 ± 1,10a
Butirato de etilo	125 µg/L (d)	107,90 ± 23,32a	100,71 ± 14,16a	100,10 ± 1,75a	<b>131,23 ± 8,05a</b>	<b>128,79 ± 4,36a</b>	123,04 ± 10,20a
Hexanoato de etilo	62 µg/L (a)	<b>281,79 ± 49,03a</b>	<b>382,24 ± 27,42b</b>	<b>365,29 ± 28,30b</b>	<b>293,74 ± 20,28a</b>	<b>387,37 ± 5,69c</b>	<b>338,76 ± 37,50b</b>
Octanoato de etilo	580 µg/L (d)	450,90 ± 42,30a	<b>660,06 ± 52,57b</b>	<b>676,45 ± 62,77b</b>	372,18 ± 15,07a	474,27 ± 1,29c	409,45 ± 24,76b
Decanoato de etilo	200 µg/L (d)	<b>230,70 ± 17,88a</b>	<b>241,63 ± 26,96a</b>	<b>252,83 ± 32,96a</b>	158,76 ± 14,08a	143,37 ± 0,46a	146,32 ± 6,18a
<b>Total ésteres de etilo</b>		<b>1138,14 ± 97,81a</b>	<b>1444,55 ± 104,46b</b>	<b>1432,62 ± 115,07b</b>	<b>987,01 ± 0,33a</b>	<b>1152,61 ± 9,58c</b>	<b>1040,33 ± 79,75b</b>
Acetato de hexilo	1500 µg/L (d)	0,61 ± 0,16a	0,83 ± 0,08b	0,56 ± 0,15a	0,97 ± 0,08b	0,77 ± 0,03a	0,72 ± 0,09a
Acetato de isoamillo	30 µg/L (a)	<b>264,97 ± 67,62a</b>	<b>332,67 ± 49,04a</b>	<b>275,63 ± 39,30a</b>	<b>452,82 ± 44,17b</b>	<b>365,06 ± 11,65a</b>	<b>394,41 ± 63,19a</b>
Acetato de 2-feniletilo	250 µg/L (a)	11,88 ± 1,17a	15,82 ± 1,19b	14,04 ± 1,33b	12,92 ± 0,69b	8,80 ± 0,06a	11,15 ± 0,80b
<b>Total acetatos</b>		<b>277,46 ± 68,62a</b>	<b>349,32 ± 48,53b</b>	<b>290,23 ± 40,59a</b>	<b>466,71 ± 44,95b</b>	<b>374,63 ± 11,63a</b>	<b>406,28 ± 64,07a</b>
Acetato de etilo (mg/L)	7,5 mg/L (a)	<b>56,71 ± 18,56b</b>	<b>38,00 ± 9,05a</b>	<b>39,05 ± 2,58a</b>	<b>58,65 ± 2,38b</b>	<b>44,99 ± 0,85a</b>	<b>46,96 ± 1,30a</b>
<b>Total ésteres (sin acetato de etilo)</b>		<b>1415,60 ± 166,17a</b>	<b>1793,87 ± 145,51b</b>	<b>1722,85 ± 133,31b</b>	<b>1453,72 ± 45,28a</b>	<b>1527,24 ± 21,21b</b>	<b>1446,61 ± 143,82a</b>

(Continúa la tabla en la página siguiente)



**Tabla 39 (continuación).** Compuestos aromáticos de vinos Cabernet Sauvignon procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

UPO	Descriptor aromático	2016		2017		
		C2	T2	C3	T4	T5
<b>Terpenoides (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>						
$\beta$ -ionona	0,09 $\mu\text{g/L}$ (c)	0,05 $\pm$ 0,01a	0,05 $\pm$ 0,01a	0,04 $\pm$ 0,01a	0,03 $\pm$ 0,01a	0,04 $\pm$ 0,01a
Farnesol	1000 $\mu\text{g/L}$ (e)	108,49 $\pm$ 8,57b	86,76 $\pm$ 5,25a	83,24 $\pm$ 1,28c	53,59 $\pm$ 0,95a	69,35 $\pm$ 5,11b
Nerolidol	15 $\mu\text{g/L}$ (d)	2,29 $\pm$ 0,30a	2,68 $\pm$ 0,09a	1,06 $\pm$ 0,01a	1,55 $\pm$ 0,04c	1,33 $\pm$ 0,01b
Citronelol	100 $\mu\text{g/L}$ (a)	6,78 $\pm$ 0,48a	6,93 $\pm$ 0,56a	7,73 $\pm$ 0,13b	6,86 $\pm$ 0,12a	6,71 $\pm$ 0,09a
Geramil acetona	60 $\mu\text{g/L}$ (a)	0,22 $\pm$ 0,03c	0,19 $\pm$ 0,01b	0,08 $\pm$ 0,01b	0,05 $\pm$ 0,01a	0,07 $\pm$ 0,01b
Geraniol	30 $\mu\text{g/L}$ (a)	6,57 $\pm$ 0,45a	8,37 $\pm$ 0,96b	9,13 $\pm$ 1,56b	12,47 $\pm$ 0,04c	10,98 $\pm$ 0,42b
Linalol	15 $\mu\text{g/L}$ (a)	1,12 $\pm$ 0,08a	2,04 $\pm$ 0,30c	1,11 $\pm$ 0,01a	1,42 $\pm$ 0,11b	1,24 $\pm$ 0,04a
Nerol	15 $\mu\text{g/L}$ (a)	3,91 $\pm$ 0,43a	3,73 $\pm$ 0,32a	3,57 $\pm$ 0,84a	2,77 $\pm$ 0,04a	3,26 $\pm$ 0,32a
<b>Total terpenoides</b>		<b>129,43 <math>\pm</math> 9,54b</b>	<b>110,75 <math>\pm</math> 6,70a</b>	<b>110,43 <math>\pm</math> 14,24a</b>	<b>106,49 <math>\pm</math> 1,52c</b>	<b>92,98 <math>\pm</math> 6,00b</b>
<b>TOTAL COMPUESTOS AROMÁTICOS (mg/L)</b>		<b>383,80 <math>\pm</math> 18,71a</b>	<b>394,98 <math>\pm</math> 24,41a</b>	<b>423,31 <math>\pm</math> 57,59b</b>	<b>333,55 <math>\pm</math> 0,35b</b>	<b>277,26 <math>\pm</math> 3,94a</b>

UPO: umbral de percepción olfativa; C2 y C3: vinos control (procedentes de cepas sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: vinos de cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: vinos de cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio ( $n=2$ ) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b ( $p \leq 0,05$ ). Referencias del umbral aromático se muestran entre paréntesis para cada compuesto: (a) Guth (1997), (b) Ferreira et al. (2000), (c) López et al. (2002), (d) Eltiévant (1991), (e) Franco et al. (2004). En negrita se han marcado los compuestos que superan el UPO.



En el grupo de los alcoholes, el 2-feniletanol se vio influido por los tratamientos, ya que su contenido aumentó cuando el agua ozonizada fue aplicada por riego (T2) y combinando riego y aéreo (T3), pero disminuyó cuando fue aplicada por endoterapia (T4). Cabe señalar que este compuesto tiene un aroma agradable que recuerda a las rosas y a la miel, y que en todos los vinos supera el UPO (Tabla 39). El contenido del 1-hexanol estuvo condicionado por la añada, ya que fue aproximadamente un 80% más alto en 2016 que en 2017, lo que está relacionado con las condiciones climáticas. Se sabe que una deficiencia de agua en la etapa de maduración de la vid, como sucedió en la cosecha de 2017, disminuye el contenido de compuestos C6 (Alem *et al.*, 2018). El contenido del 1-hexanol también se vio influido por el tratamiento T3, ya que lo disminuyó con respecto al vino control.

Los ésteres constituyen el principal grupo responsable del aroma de los vinos, especialmente los ésteres etílicos de los ácidos grasos y los acetatos de los alcoholes superiores (Flanzy, 2000). Las levaduras sintetizan enzimáticamente los ésteres más importantes durante la etapa de fermentación alcohólica a partir de ácidos y alcoholes, y solo una pequeña fracción proviene de la uva. El éster más abundante en todos los vinos fue el acetato de etilo, y en todos ellos excedió su UPO, pero su contenido fue inferior a 80 mg/L, que es el límite a partir del cual se puede percibir su olor desagradable, que recuerda a la laca de uñas (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1982). El contenido de acetato de etilo disminuyó significativamente por efecto de los tratamientos.

Los ésteres etílicos fueron los predominantes en el grupo de los ésteres, y excluyendo al acetato de etilo, el más abundante fue el octanoato de etilo, que posee un característico aroma afrutado.



Este compuesto excedió su UPO solo en los vinos de la cosecha 2016, especialmente en los procedentes de los tratamientos T2 y T3, donde su contenido aumentó significativamente en relación con el control. Se observó que los vinos con mayor contenido de ácido octanoico también tuvieron altos contenidos de octanoato de etilo. En este grupo de ésteres, el hexanoato de etilo, que excedió su UPO en todos los vinos, también aumentó en los vinos de los tratamientos, y como en el caso anterior, también fue más abundante en los vinos que tuvieron mayor contenido de ácido hexanoico. Teniendo en cuenta el valor de aroma (VA), que es la relación entre la concentración de cada compuesto y su UPO (Francis and Newton, 2005), los vinos de los tratamientos con agua ozonizada tuvieron un VA más alto para el octanoato de etilo y hexanoato de etilo que sus respectivos vinos control.

Los ésteres butirato de etilo y decanoato de etilo no fueron influidos por los tratamientos sino por el año de cosecha, ya que el butirato de etilo excedió su UPO en los vinos de 2107 pero no en los de 2016, y el decanoato de etilo excedió su UPO en los vinos de 2016, pero no en los de 2017. El dihidrocinamato de etilo y el vainillato de etilo no excedieron su UPO correspondiente y no mostraron un comportamiento claro en función de los tratamientos.

En general, se observó un aumento en el contenido total de ésteres etílicos en los vinos procedentes de uvas cuyas cepas fueron tratadas con agua ozonizada, destacando los vinos de 2016 con contenidos más altos que los de 2017.

Excluyendo al acetato de etilo, el acetato de isoamilo fue el único compuesto del grupo de los acetatos que excedió su UPO en todos los vinos. El acetato de 2-feniletilo fue influido por los tratamientos de manera similar al 2-feniletanol, es decir, los



contenidos más altos se alcanzaron en los vinos derivados de los tratamientos T2 y T3 y los más bajos en los vinos del tratamiento T4.

Los terpenoides constituyen la parte de la fracción del aroma del vino que proviene de las uvas, por lo que son los compuestos responsables de su tipicidad varietal. Su contenido total disminuyó con respecto al control en todos los vinos de los tratamientos con agua ozonizada. Ninguno de los terpenoides analizados excedió su correspondiente UPO, aunque se sabe que, entre los compuestos que componen esta familia química, existen sinergias que pueden mejorar el aroma que proporcionan al vino (Francis and Newton, 2005). La  $\beta$ -ionona y el nerol no se vieron afectados por los tratamientos, pero los demás terpenoides variaron según los tratamientos y el año de cosecha. El farnesol destacó por ser el más abundante, pero se observó una clara disminución de su contenido por efecto de los tratamientos con agua ozonizada, independientemente de la estrategia de aplicación. Se apreció el efecto de la añada en el nerolidol, porque su contenido en los vinos de 2016 casi duplicó los de 2017. Este compuesto no varió por efecto de los tratamientos en la cosecha de 2016, pero en 2017 aumentó con respecto al control, especialmente en los vinos procedentes del tratamiento T4. El citronelol no se vio influido por los tratamientos en los vinos de 2016, pero disminuyó en 2017. El geraniol fue el único terpenoide analizado que aumentó claramente su contenido por efecto de los tratamientos, independientemente de la estrategia de aplicación, y la geranil acetona en cambio, disminuyó.

El conjunto del aroma varietal de los vinos está formado, además de por la fracción libre, que consiste en compuestos volátiles, especialmente C6 (1-hexanol) y terpenoides, por otra fracción no volátil de naturaleza glucosídica cuyas agliconas son compuestos





volátiles. La fracción no volátil mencionada anteriormente, forma parte de los precursores aromáticos y ha sido determinada globalmente en este trabajo mediante el parámetro IPAv (Tabla 36). En general, se observa que los tratamientos produjeron una disminución en los vinos del conjunto de aromas varietales, tanto libres como en forma de precursores.

A la vista de los resultados discutidos anteriormente, se ha puesto de manifiesto que la composición química y el color de los vinos se ve influida tanto por el año de cosecha como por los tratamientos con agua ozonizada. En el último caso, los resultados apuntan a una diferenciación de acuerdo con el número de aplicaciones realizadas (o intensidad de la aplicación), independientemente de la estrategia utilizada.

#### **6.2.1.5. Análisis discriminante de los vinos Cabernet Sauvignon**

Al igual que en el caso de las uvas, para minimizar el efecto del año de cosecha y comprender mejor cuales fueron los metabolitos más afectados por los tratamientos con ozono, se realizó un análisis discriminante agrupando los vinos en tres grupos: **grupo C** (vinos control C2 y C3), **grupo BI** (vinos de los tratamientos T2 y T4, de baja intensidad de aplicación) y **grupo AI** (vinos de los tratamientos T3 y T5, de alta intensidad de aplicación).

Se realizaron varios análisis discriminantes utilizando los parámetros de mayor influencia en la calidad del vino, agrupados por compuestos procedentes del metabolismo secundario de la vid (fenólicos y aromas varietales), del metabolismo fermentativo (alcoholes, ésteres y ácidos) y parámetros enológicos clásicos de los que se suelen medir en bodega, incluyendo los colorimétricos. Se observó que la separación completa de las muestras se logró



cuando se realizaron cuatro análisis discriminantes: en el primero usando parámetros enológicos y colorimétricos como variables diferenciadoras, en el segundo utilizando todos los compuestos fenólicos, en el tercero usando los aromas varietales (compuestos C6 y terpenoides) y en el cuarto usando los compuestos fermentativos (alcoholes incluyendo el glicerol, ésteres y ácidos).

En el primer caso, se obtuvieron dos funciones discriminantes (F), de las cuales F1 explicó el 84% de la varianza, mientras que F2 explicó el 16% de la misma (Tabla 40).

**Tabla 40.** Funciones discriminantes obtenidas cuando se emplearon los parámetros enológicos y colorimétricos de vinos Cabernet Sauvignon.

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	212,244a	<b>84,3</b>	84,3	0,998
2	40,351a	<b>15,7</b>	100,0	0,988

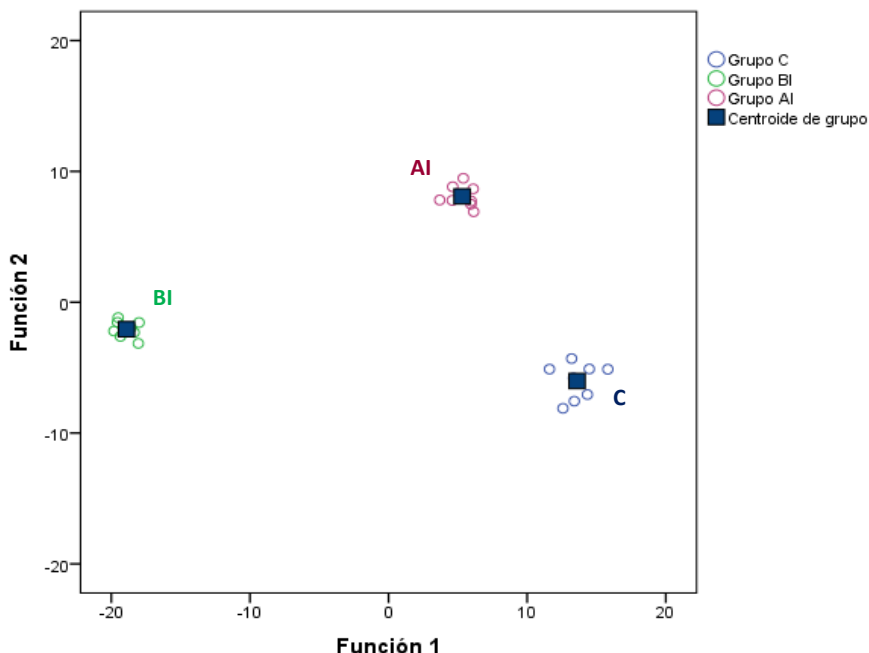
En la Tabla 41 se muestran los parámetros con los valores absolutos más altos de los coeficientes discriminantes.

**Tabla 41.** Coeficientes de las funciones discriminantes.

	Función	
	1	2
Grado alcohólico	8,492	-9,397
pH	1,159	6,012
A420	16,841	-10,439
A620	-24,250	13,379

Las variables con la mayor contribución en F1 y F2 fueron las absorbancias a 620 y 420 nm, el grado alcohólico y el pH.

En la Figura 40 se observa la separación de las muestras con el análisis discriminante.



**Figura 40.** Gráfico en el que se muestra la separación de grupos resultante del análisis discriminante usando los parámetros enológicos y colorimétricos de vinos Cabernet Sauvignon. C: grupo control; BI: grupo de tratamientos de baja intensidad; AI: grupo de tratamientos de alta intensidad.

En el segundo caso, se obtuvieron dos funciones discriminantes, de las cuales F1 explicó el 80% de la varianza, mientras que F2 explicó el 20% de la misma (Tabla 42).

**Tabla 42.** Funciones discriminantes obtenidas cuando se emplearon los compuestos fenólicos de vinos Cabernet Sauvignon.

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	683,635a	<b>80,2</b>	80,2	0,999
2	168,473a	<b>19,8</b>	100,0	0,997

En la Tabla 43 se muestran los parámetros con los valores absolutos más altos de los coeficientes discriminantes.

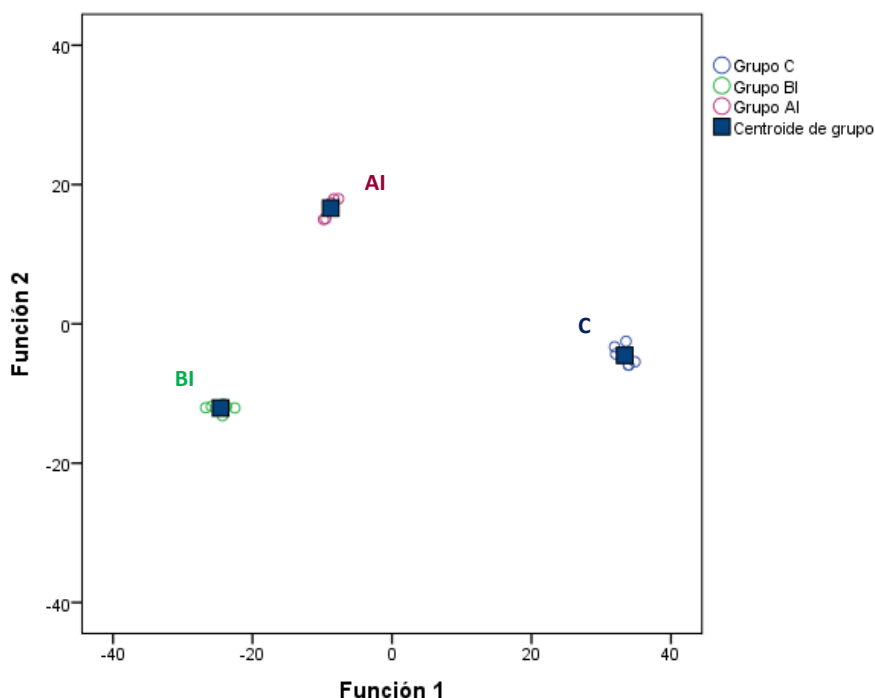


**Tabla 43.** Coeficientes de las funciones discriminantes.

	Función	
	1	2
Ácido gálico	23,196	15,903
(-) Epicatequina	-22,583	-11,883
Malvidina 3-O-glucósido	-6,206	3,524
Malvidina 3-(6'- <i>t</i> -cafeoil)-glucósido	11,357	-4,246

Las variables con la mayor contribución en los coeficientes discriminantes fueron ácido gálico, (-) epicatequina, malvidina 3-O-glucósido y malvidina 3-(6'-*t*-cafeoil)-glucósido.

En la Figura 41 se muestra la separación de las muestras con el anterior análisis discriminante.



**Figura 41.** Gráfico en el que se muestra la separación de grupos resultante del análisis discriminante usando los compuestos fenólicos de vinos Cabernet Sauvignon. C: grupo control; BI: grupo de tratamientos de baja intensidad; AI: grupo de tratamientos de alta intensidad.



Cuando se usaron los aromas varietales como variables de discriminación, se explicó el 100% de la varianza con dos funciones, la F1 contribuyó con el 92% y F2 con el 8%. Las variables más importantes fueron farnesol, nerolidol, geranil acetona y citronelol (Tablas 44 y 45).

**Tabla 44.** Funciones discriminantes obtenidas cuando se emplearon los aromas varietales de vinos Cabernet Sauvignon.

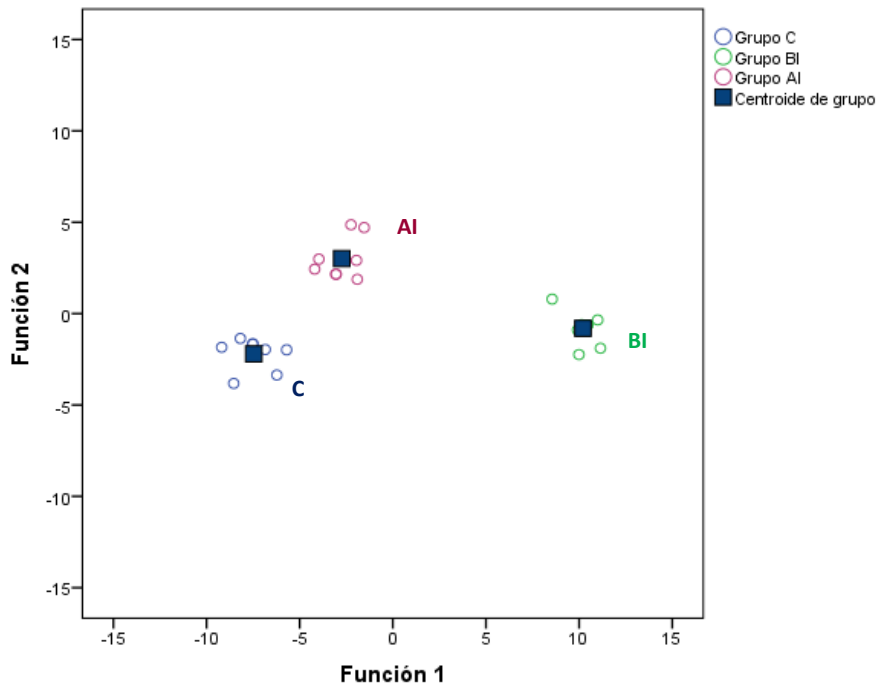
Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	63,782a	<b>92,0</b>	92,0	0,992
2	5,555a	<b>8,0</b>	100,0	0,921

**Tabla 45.** Coeficientes de las funciones discriminantes.

	Función	
	1	2
Farnesol	-10,596	0,892
Nerolidol	5,925	-0,668
Geranil acetona	3,355	0,620
Citronelol	2,546	-1,768

En la Figura 42 se observa la separación de las muestras con el anterior análisis discriminante.





**Figura 42.** Gráfico en el que se muestra la separación de grupos resultante del análisis discriminante usando los aromas varietales de vinos Cabernet Sauvignon. C: grupo control; BI: grupo de tratamientos de baja intensidad; AI: grupo de tratamientos de alta intensidad.

Finalmente, cuando en el análisis discriminante se utilizaron los compuestos fermentativos (alcoholes incluyendo el glicerol, ésteres y ácidos) como variables discriminantes, se obtuvieron dos funciones, F1 y F2, que explicaron el 81% y el 19% de la varianza, respectivamente (Tabla 46). Las variables que más contribuyeron a la diferenciación fueron 2-feniletanol, glicerol, acetato de isoamilo y decanoato de etilo en la función F1, y en la función F2 fueron 2-feniletanol, decanoato de etilo, acetato de isoamilo y glicerol (Tabla 47).



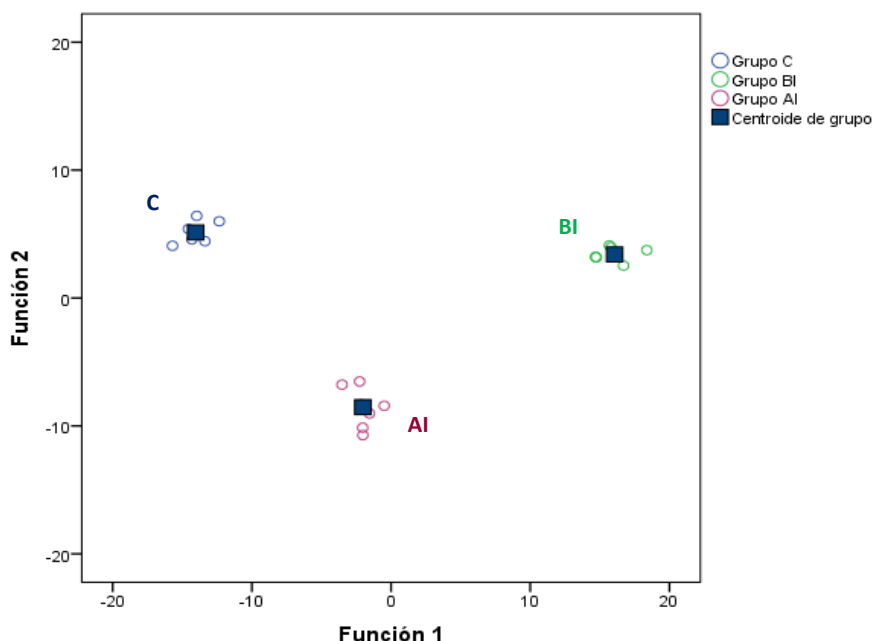
**Tabla 46.** Funciones discriminantes obtenidas cuando se emplearon los compuestos fermentativos de vinos Cabernet Sauvignon.

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	174,901a	<b>80,6</b>	80,6	0,997
2	42,156a	<b>19,4</b>	100,0	0,988

**Tabla 47.** Coeficientes de las funciones discriminantes.

	Función	
	1	2
Glicerol	-11,484	-4,862
2-feniletanol	-13,269	-13,170
Decanoato de etilo	6,150	9,425
Acetato de isoamilo	9,929	8,093

En la Figura 43 se muestra la separación de las muestras con el anterior análisis discriminante.



**Figura 43.** Gráfico en el que se muestra la separación de grupos resultante del análisis discriminante usando los compuestos fermentativos de vinos Cabernet Sauvignon. C: grupo control; BI: grupo de tratamientos de baja intensidad; AI: grupo de tratamientos de alta intensidad.



Por lo tanto, entre todos los metabolitos analizados, los mencionados anteriormente por su mayor participación en las funciones discriminantes, son los más afectados por la intensidad de las aplicaciones con agua ozonizada. Entre ellos, destacó el ácido gálico, ya que es el ácido fenólico más abundante y uno de los antioxidantes más potentes que se encuentran en los vinos, y la (-) epicatequina. Ambos compuestos se encontraron en concentraciones más altas en los vinos del **grupo A1** que en los del **grupo B1** (Tabla 38) y, solo la (-) epicatequina, se encontró en concentraciones más altas en los vinos de los tratamientos que en los del **grupo C**.

Los aromas varietales farnesol y nerolidol son sesquiterpenos acíclicos con un precursor común, el farnesil pirofosfato, que resulta de la condensación de dos moléculas de isopentenil difosfato y una de dimetilalil difosfato, proceso que es catalizado por la enzima farnesil pirofosfato sintasa (McGarvey and Croteau, 1995). Por su parte, la geranil acetona está relacionada con el nerolidol enzimáticamente o por fermentación de acuerdo con Yang *et al.*, (2019). Por lo tanto, parece que la intensidad de los tratamientos con agua ozonizada influye de forma importante en el metabolismo de los sesquiterpenos. El hecho de que los aromas fermentativos también participen en la discriminación de los vinos en respuesta a la intensidad de los tratamientos con agua ozonizada, indica que el metabolismo de las levaduras también se ve afectado por el número de aplicaciones.





#### **6.2.1.6. Resultados más concluyentes en los vinos Cabernet Sauvignon**

Los tratamientos con agua ozonizada influyeron en la composición química de los vinos. Todos los tratamientos disminuyeron el grado alcohólico y el contenido de glicerol y de acetato de etilo en los vinos. Los tratamientos por riego (T2) y endoterapia (T4) disminuyeron el pH, el IPT y el IPAv, y produjeron vinos con parámetros de calidad cromática más bajos, menores contenidos en ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles y antocianinas que los vinos control correspondientes.

El tratamiento combinado de riego y aéreo (T3) destacó por dar lugar a vinos con los mejores parámetros cromáticos, y con los contenidos más altos en antocianinas aciladas y no aciladas entre todos los vinos estudiados. Además, también destacaron estos vinos por un aumento del contenido en compuestos aromáticos, que fue debido a la mayor concentración de ésteres afrutados, ya que tuvieron menores valores de IPAv y de contenido en terpenoides que el vino control. El tratamiento combinado de endoterapia y aéreo (T5) dio lugar a vinos con peor color, contenidos más altos en flavanoles y antocianinas aciladas, pero similar en volátiles totales que el vino control.

Por lo tanto, los vinos de cepas sometidas a los tratamientos más intensivos con agua ozonizada (T3 y T5) tuvieron mejores características que los de los tratamientos menos intensivos (T2 y T4), lo que sugiere que el efecto del agua ozonizada en la calidad del vino depende más de la intensidad de la aplicación que de la estrategia utilizada.



## **6.2.2. Macabeo**

Al igual que se hizo en los vinos Cabernet Sauvignon, la discusión de resultados se hará de los vinos obtenidos en las cosechas de 2016 y 2017, ya que las uvas de la cosecha de 2015 se vinificaron de forma diferente y, por lo tanto, los resultados entre vinos no son comparables.

### **6.2.2.1. Parámetros enológicos**

En la Tabla 48 se muestran los parámetros enológicos que estiman las características químicas globales de los vinos. Todos los vinos mostraron una similar cinética de la fermentación alcohólica y los valores de los parámetros analizados se encuentran dentro de los rangos normales para vinos blancos de la zona de estudio (García *et al.*, 2003).





**Tabla 48.** Parámetros enológicos de vinos Macabeo procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

	2016			2017		
	C2	T2	T3	C3	T4	T5
<i>Parámetros enológicos convencionales e IPT</i>						
Grado alcohólico (%vol)	11,95 ± 0,02b	12,05 ± 0,02c	11,37 ± 0,01a	11,64 ± 0,01c	11,27 ± 0,03b	11,03 ± 0,01a
pH	3,42 ± 0,01c	3,35 ± 0,01a	3,40 ± 0,00b	3,37 ± 0,01a	3,45 ± 0,01c	3,42 ± 0,01b
AT	3,45 ± 0,01a	3,74 ± 0,04b	3,41 ± 0,04a	3,50 ± 0,04c	3,03 ± 0,03a	3,11 ± 0,03b
AV	0,15 ± 0,01a	0,14 ± 0,01a	0,14 ± 0,01a	0,14 ± 0,01a	0,12 ± 0,01a	0,14 ± 0,02a
IPT	7,03 ± 0,22b	6,28 ± 0,17a	6,28 ± 0,18a	6,81 ± 0,01b	5,89 ± 0,01a	7,00 ± 0,01c
<i>Ácidos, azúcares y glicerol</i>						
Ácido láctico (g/L)	0,46 ± 0,01b	0,46 ± 0,01b	0,43 ± 0,01a	0,37 ± 0,01a	0,38 ± 0,01a	0,37 ± 0,01a
Ácido tartárico (g/L)	2,25 ± 0,06b	2,47 ± 0,04c	2,16 ± 0,03a	2,67 ± 0,02c	2,13 ± 0,01a	2,23 ± 0,03b
Glucosa (g/L)	1,21 ± 0,04b	1,05 ± 0,03a	1,27 ± 0,03c	0,93 ± 0,02a	1,02 ± 0,03a	0,93 ± 0,04a
Fructosa (g/L)	0,35 ± 0,02a	0,39 ± 0,01b	0,42 ± 0,01c	0,48 ± 0,01a	0,42 ± 0,02a	0,39 ± 0,03a
Glucosa/Fructosa	3,49 ± 0,22b	2,74 ± 0,16a	3,02 ± 0,07a	1,94 ± 0,06a	2,43 ± 0,20a	2,39 ± 0,28a
Glicerol (g/L)	7,52 ± 0,19a	7,33 ± 0,08a	7,27 ± 0,14a	7,27 ± 0,02c	6,95 ± 0,01b	6,68 ± 0,05a
<i>IPAV</i>						
IPAV	6,08 ± 0,40a	5,61 ± 0,18a	5,45 ± 0,24a	7,33 ± 0,21a	7,00 ± 0,11a	6,98 ± 0,22a

AT: acidez total (g/L de ácido tartárico); AV: acidez volátil (g/L de ácido acético); IPT: índice de polifenoles totales; IPAV: índice de potencial aromático varietal; C2 y C3: vinos control (procedentes de cepas sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: vinos de cepas tratadas por riego; T3: vinos de cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: vinos de cepas tratadas por endoterapia; T5: vinos de cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=2) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p≤0,05).



Se apreció un significativo descenso del grado alcohólico en todos los vinos procedentes de los tratamientos, excepto en los vinos del tratamiento T2. Esto puede deberse a un retraso en la maduración de las bayas procedentes de los tratamientos en relación con el control ya que tuvieron un menor °Bé, excepto las uvas de T2 (Tabla 31). Los demás parámetros también se vieron influenciados por los tratamientos dependiendo de la cosecha y de la estrategia de aplicación con la disolución acuosa de ozono.

En los vinos de los tratamientos T2 y T3 se observó un descenso significativo del pH y por tanto tuvo lugar un aumento de la acidez total (AT) aunque este sólo fue significativo en los vinos T2. En cambio, los tratamientos T4 y T5 aumentaron significativamente el pH de los vinos y consecuentemente tuvo lugar una disminución de su AT.

Sólo el tratamiento combinado T5 aumentó el IPT, y el resto de los tratamientos lo disminuyeron, especialmente T4.

El contenido en ácido láctico permaneció dentro del intervalo habitual de vinos blancos que no han hecho la fermentación maloláctica, como es el caso.

Se observó un descenso del contenido de ácido tartárico en todos los vinos, excepto en T2 en donde aumentó un 10%, lo cual está de acuerdo con los resultados de AT encontrados en sus uvas (Tabla 31).

Todos los vinos tuvieron un contenido similar de azúcares reductores (glucosa y fructosa), por debajo de 2 g/L tras la fermentación alcohólica.

El contenido de fructosa fue mayor en los vinos de los tratamientos T2 y T3 con respecto al control, y el de glucosa sólo en



los vinos T3 fue mayor que en el control. En general se observa que el contenido medio de glucosa siempre fue mayor al de fructosa en las dos cosechas, aunque algo mayor en todos los vinos de 2016 (en torno a 1,18 g/L en 2016 y de 0,96 g/L en 2017). Como consecuencia, se obtuvo una ratio glucosa/fructosa superior a 1 en todos los vinos, por lo que tal como se observó en los vinos de Cabernet Sauvignon, se pone de manifiesto la preferencia de las levaduras por la fructosa.

Los niveles de glicerol, que fue uno de los compuestos más abundantes de los vinos, se situaron entre 6,68 y 7,52 g/L. Su contenido no estuvo influido por los tratamientos de 2016, mientras que todos los tratamientos con agua ozonizada de la cosecha de 2017 lo disminuyeron en relación con su correspondiente control, en especial en los vinos T5. No obstante, el contenido presente en todos los vinos, controles y procedentes de los tratamientos, fue en torno a 7, que es lo habitual (Zhao *et al.*, 2015).

En cuanto al IPA<sub>v</sub>, no hubo diferencias significativas por efecto de los tratamientos en los vinos de cada añada, si bien se aprecian mayores valores de IPA<sub>v</sub> en los vinos de 2017, lo cual puede deberse a que también estos valores fueron mayores en las uvas (Tabla 31). Esto indica que los vinos de 2017 poseen más precursores aromáticos que los vinos de 2016, y por tanto poseen una mayor reserva de compuestos no olorosos, ya que permanecen intactos, es decir, sin liberar sus agliconas volátiles durante la vinificación. Por el contrario, los vinos de 2016 tienen menos precursores aromáticos que los vinos de 2017, lo cual puede deberse tanto a que sus uvas tenían un menor IPA<sub>v</sub>, como también a que se han podido liberar parte de las agliconas volátiles durante la vinificación, en una mayor proporción que en el caso de las uvas de 2017.



Además, aunque los tratamientos de agua ozonizada disminuyeron el IPA<sub>v</sub> de las uvas en relación con sus controles correspondientes (Tabla 31), el proceso de vinificación igualó la presencia de precursores aromáticos en todos los vinos. Estos resultados sugieren que los tratamientos en viña con agua ozonizada pueden facilitar la extracción de los precursores aromáticos durante la vinificación, o bien pueden aumentar la liberación de las agliconas volátiles de los precursores en dicho proceso. Estos hechos están de acuerdo con otros trabajos realizados por Mencarelli and Bellincontro (2018), en los que se vio como el ozono puede cambiar el perfil aromático de las uvas de vinificación y afectar la extractabilidad de compuestos, lo que significa que el ozono podría modificar la pared y membrana celular, aumentando su permeabilidad, y por tanto facilitar la extracción de compuestos aromáticos.

#### **6.2.2.2. Parámetros cromáticos**

En la Tabla 49 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a los parámetros cromáticos de los vinos Macabeo.



**Tabla 49.** Parámetros cromáticos de vinos Macabeo procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

	2016			2017		
	C2	T2	T3	C3	T4	T5
A420	0,13 ± 0,01b	0,12 ± 0,00a	0,13 ± 0,01b	0,20 ± 0,01c	0,10 ± 0,01a	0,16 ± 0,01b
a*	0,36 ± 0,04a	0,45 ± 0,04a	0,68 ± 0,08b	1,20 ± 0,13c	-0,21 ± 0,04b	-0,45 ± 0,01a
b*	17,79 ± 0,09b	15,99 ± 0,05a	16,51 ± 0,85a	10,74 ± 0,09c	6,44 ± 0,01a	9,30 ± 0,02b
L*	90,92 ± 0,08a	90,76 ± 0,07a	90,95 ± 0,69a	89,96 ± 0,10a	97,27 ± 0,04c	96,25 ± 0,02b
C*	17,80 ± 0,10b	16,00 ± 0,04a	16,54 ± 0,83a	10,81 ± 0,11c	6,44 ± 0,01a	9,31 ± 0,02b
H*	88,86 ± 0,12c	88,41 ± 0,15b	87,66 ± 0,16a	83,62 ± 0,63a	91,88 ± 0,30b	92,76 ± 0,03c
ΔEab*	0,01 ± 0,01a	1,87 ± 0,05b	1,90 ± 0,53b	0,01 ± 0,01a	11,87 ± 0,27c	11,21 ± 0,47b

A420: absorbancia a 420 nm; parámetros CIELAB: a\* coordenada rojo-verde, b\* coordenada amarillo-azul, L\* claridad, C\* croma, H\* tonalidad y ΔEab\* diferencias cromáticas entre los vinos control y los tratamientos; C2 y C3: vinos control (procedentes de cepas sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: vinos de cepas tratadas por riego; T3: vinos de cepas tratadas combinando riego y déreo; T4: vinos de cepas tratadas por endoterapia; T5: vinos de cepas tratadas combinando endoterapia y déreo. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=2) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p≤0,05).



Como se sabe, la absorbancia a 420 nm también expresa la IC y la T de los vinos blancos. Los tratamientos con agua ozonizada disminuyeron o no afectaron la A420 nm de los vinos, tal como sugieren las A420 de las uvas.

En cuanto a los parámetros CIELAB, los vinos de la cosecha 2016 tuvieron valores más altos de  $b^*$ ,  $C^*$  y tonalidad que los vinos de 2017, lo que significa que fueron más amarillos y puros que los de 2017. Además, los tratamientos disminuyeron  $b^*$  respecto al vino control, así como  $H^*$  sólo en los de 2016, mientras que lo aumentaron en los de 2017. Además,  $L^*$  no varió por efecto de los tratamientos durante 2016 pero aumentó en 2017, lo cual sugiere vinos más claros en este segundo año. Con respecto a la percepción del color por parte del consumidor, en comparación con los vinos control correspondientes, solo los vinos T4 y T5 podrían distinguirse por el ojo humano ya que tuvieron un  $\Delta E_{ab^*} > 3$  (Alcalde-Eón *et al.*, 2019). Es decir, el consumidor apreciaría vinos menos amarillos y más claros en los procedentes de los tratamientos T4 y T5 que en todos los demás vinos.

### 6.2.2.3. Composición fenólica

La Tabla 50 muestra el contenido de los principales compuestos fenólicos de bajo peso molecular determinados en los vinos procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada y en los vinos control.







**Tabla 50.** Compuestos fenólicos de bajo peso molecular de vinos Macabeo procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

	2016			2017		
	C2	T2	T3	C3	T4	T5
<b>Ácidos (mg/L)</b>						
Ácido t-caféico	0,06 ± 0,01b	0,07 ± 0,00c	0,04 ± 0,00a	0,08 ± 0,01a	0,06 ± 0,01a	0,08 ± 0,01a
Ácido vanílico	0,41 ± 0,03a	0,36 ± 0,04a	0,36 ± 0,02a	0,56 ± 0,01b	0,47 ± 0,01a	0,58 ± 0,01b
Ácido siríngico	1,74 ± 0,05a	1,76 ± 0,02a	1,75 ± 0,05a	1,38 ± 0,01a	1,55 ± 0,05b	1,56 ± 0,03b
Ácido t-p-cutárico	0,47 ± 0,02a	0,51 ± 0,01b	0,48 ± 0,01a	2,31 ± 0,01a	2,37 ± 0,01a	2,36 ± 0,03a
<b>Total ácidos</b>	<b>2,67 ± 0,05ab</b>	<b>2,71 ± 0,03b</b>	<b>2,63 ± 0,04a</b>	<b>4,32 ± 0,02a</b>	<b>4,46 ± 0,05b</b>	<b>4,58 ± 0,01b</b>
<b>Flavonoles (mg/L)</b>						
(+) Catequina	2,51 ± 0,21b	2,43 ± 0,15b	2,13 ± 0,12a	4,32 ± 0,03c	4,08 ± 0,02b	3,95 ± 0,02a
(-) Epicatequina	3,49 ± 0,55a	3,18 ± 0,08a	3,05 ± 0,09a	2,37 ± 0,04a	2,78 ± 0,08b	2,66 ± 0,06b
<b>Total flavanoles</b>	<b>6,00 ± 0,69ab</b>	<b>5,61 ± 0,11b</b>	<b>5,18 ± 0,15a</b>	<b>6,69 ± 0,01a</b>	<b>6,87 ± 0,10a</b>	<b>6,62 ± 0,03a</b>
<b>Flavonoles (mg/L)</b>						
Quercetina 3-O-(glucurónido+glucósido) <sup>a</sup>	0,84 ± 0,01a	0,84 ± 0,01a	0,86 ± 0,01b	1,60 ± 0,01c	1,39 ± 0,01b	1,33 ± 0,01a
Kaempferol 3-O-glucósido	1,04 ± 0,01a	1,05 ± 0,01a	1,07 ± 0,01b	0,99 ± 0,01c	0,90 ± 0,01a	0,93 ± 0,01b
<b>Total flavonoles</b>	<b>1,88 ± 0,01a</b>	<b>1,89 ± 0,01a</b>	<b>1,92 ± 0,01b</b>	<b>2,59 ± 0,01c</b>	<b>2,30 ± 0,01b</b>	<b>2,27 ± 0,01a</b>
<b>TOTAL COMPUESTOS FENÓLICOS (mg/L)</b>	<b>10,55 ± 0,57b</b>	<b>10,21 ± 0,13ab</b>	<b>9,73 ± 0,12a</b>	<b>13,61 ± 0,02a</b>	<b>13,63 ± 0,16a</b>	<b>13,46 ± 0,02a</b>

C2 y C3: vinos control (procedentes de cepas sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: vinos de cepas tratadas por riego; T3: vinos de cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: vinos de cepas tratadas por endoterapia; T5: vinos de cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo; <sup>a</sup> Quercetina 3-O-glucurónido y Quercetina 3-O-glucósido, compuestos coeluidos. Cada parámetro está representado por su valor medio (n=2) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b (p≤0,05).

Se observa que los tratamientos no afectaron al contenido total de compuestos fenólicos, ya que sólo en el vino del tratamiento T3 se produjo un ligero descenso. Sin embargo, sí que se vio un claro efecto de la añada, ya que los vinos control de 2017 tuvieron un contenido notablemente más alto que los de 2016. Si tenemos en cuenta que en las uvas no encontramos diferencias significativas entre los compuestos fenólicos, es posible considerar que los tratamientos con agua ozonizada tampoco influyeron en su extracción durante la vinificación, salvo en el caso de T3 que disminuye.

Si profundizamos en la diversidad de los compuestos fenólicos analizados, y tenemos en cuenta los diferentes grupos de compuestos estudiados, vemos que predominaron los flavanoles, seguidos por los ácidos y flavonoles. Se observó una influencia de la añada en el total de ácidos fenólicos ya que éste fue un 60% mayor en todos los vinos de 2017 que en los de 2016, destacando el ácido *t-p*-cutárico como el compuesto más influido. En los vinos de 2016 el compuesto más abundante del grupo de ácidos fenólicos fue el siríntrico seguido por el *t-p*-cutárico. El tratamiento T2 aumentó significativamente los contenidos de ácido *t*-caféico y *t-p*-cutárico, en un 17% y 9% respectivamente con respecto a los vinos control. Por su parte los tratamientos T4 y T5 aumentaron el total de ácidos fenólicos con respecto al control, debido al aumento significativo en el contenido de ácido siríntrico.

Es importante indicar que los flavanoles encontrados en las uvas estuvieron por debajo del límite de detección del método analítico, y por ello no figuran en la correspondiente tabla (Tabla 32). El hecho de que en todos los vinos los flavanoles sean los compuestos más abundantes, sugiere que la vinificación ha sido de gran eficacia



para su extracción. En el grupo de los flavanoles, la (-) epicatequina fue el compuesto más abundante en los vinos de 2016 y la (+) catequina lo fue en los vinos de 2017, siendo casi el doble que en la anterior cosecha. Por lo que el efecto añada también estuvo presente especialmente en el grupo de los flavanoles, aunque no fuera percibido en el total del grupo. La (+) catequina se vio afectada por los tratamientos con agua ozonizada, disminuyendo en todos los vinos excepto en los del tratamiento T2. La mayor disminución se observó en los vinos del tratamiento T3, con un descenso del 15%. La (-) epicatequina no se vio afectada por los tratamientos T2 y T3 pero los tratamientos T4 y T5 la aumentaron considerablemente, sobre todo T4. Por tanto, en este grupo de compuestos se aprecia un efecto añada y un claro efecto de los tratamientos en donde ha estado implicada la endoterapia combinada o no.

También el efecto de la añada se observó en el contenido total de flavonoles de los vinos, ya que los contenidos en todos los de 2017 fueron notablemente superiores a los de 2016. Es de destacar que mientras que la quercetina 3-O-(glucurónido+glucósido) fue el flavonol más abundante en los vinos de 2017, el kaempferol 3-O-glucósido lo fue en los vinos de 2016.

Los tratamientos T4 y T5 disminuyeron el contenido de todos los flavonoles, el tratamiento T2 no influyó, mientras que el vino procedente del tratamiento T3 mostró contenidos de flavonoles significativamente mayores que el control, alrededor de un 3%.

#### **6.2.2.4. Composición aromática**

La Tabla 51 muestra los compuestos volátiles más importantes encontrados en los vinos agrupados por familias, así como el umbral



de percepción olfativa (UPO) y los descriptores aromáticos de cada compuesto.





**Tabla 51.** Compuestos aromáticos de vinos Macabeo procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

UPO	Descriptor aromático	2016			2017		
		C2	T2	T3	C3	T4	T5
<b>Ácidos (mg/L)</b>							
Ácido decanoico	1 mg/L (a)	0,26 ± 0,04a	0,29 ± 0,03a	0,29 ± 0,01a	0,91 ± 0,02a	0,91 ± 0,16a	0,99 ± 0,05a
Ácido hexanoico	0,42 mg/L (a)	<b>3,16 ± 0,71a</b>	<b>3,42 ± 0,27a</b>	<b>3,34 ± 0,22a</b>	<b>2,75 ± 0,03a</b>	<b>2,65 ± 0,19a</b>	<b>2,58 ± 0,21a</b>
Ácido octanoico	0,50 mg/L (a)	<b>2,55 ± 0,88a</b>	<b>2,60 ± 0,34a</b>	<b>2,31 ± 0,17a</b>	<b>2,63 ± 0,00a</b>	<b>2,66 ± 0,22a</b>	<b>2,46 ± 0,11a</b>
<b>Total ácidos</b>		<b>5,97 ± 0,08a</b>	<b>6,51 ± 0,95a</b>	<b>5,94 ± 0,20a</b>	<b>6,30 ± 0,02a</b>	<b>6,22 ± 0,04a</b>	<b>6,03 ± 0,32a</b>
<b>Alcoholes (mg/L)</b>							
Alcoholes amilicos	30 mg/L (a)	<b>189,90 ± 36,85a</b>	<b>209,55 ± 4,05a</b>	<b>196,53 ± 27,32a</b>	<b>114,42 ± 1,20b</b>	<b>97,78 ± 2,68a</b>	<b>109,32 ± 2,80b</b>
2-feniletanol	10 mg/L (a)	9,27 ± 1,54a	8,29 ± 0,20a	<b>14,52 ± 0,96b</b>	<b>14,96 ± 0,31b</b>	9,36 ± 0,35a	<b>15,48 ± 0,13b</b>
1-hexanol	8 mg/L (b)	0,46 ± 0,07a	0,61 ± 0,02b	0,60 ± 0,08b	0,36 ± 0,03a	0,40 ± 0,09b	0,47 ± 0,07c
<b>Total alcoholes</b>		<b>199,63 ± 38,44a</b>	<b>218,45 ± 3,97a</b>	<b>211,65 ± 28,33a</b>	<b>129,74 ± 0,87c</b>	<b>107,54 ± 1,35a</b>	<b>125,27 ± 1,70b</b>
<b>Ésteres de etilo y acetatos (µg/L)</b>							
Dihidrocinnamato de etilo	1,6 µg/L (b)	0,27 ± 0,02a	0,25 ± 0,02a	0,38 ± 0,03b	0,36 ± 0,01a	0,35 ± 0,01a	0,38 ± 0,03a
Butirato de etilo	125 µg/L (d)	12,02 ± 0,92a	12,96 ± 0,08a	12,15 ± 1,24a	11,84 ± 0,10ab	12,50 ± 0,02b	10,94 ± 0,45a
Hexanoato de etilo	62 µg/L (d)	<b>721,60 ± 4,21a</b>	<b>730,43 ± 64,25a</b>	<b>755,69 ± 22,63a</b>	<b>669,83 ± 6,32a</b>	<b>772,95 ± 6,21b</b>	<b>641,54 ± 22,98a</b>
Octanoato de etilo	580 µg/L (d)	<b>1119,48 ± 114,70a</b>	<b>989,80 ± 163,76a</b>	<b>1175,07 ± 24,30a</b>	<b>674,84 ± 39,84a</b>	<b>902,32 ± 140,06a</b>	<b>636,85 ± 17,92a</b>
Decanoato de etilo	200 µg/L (d)	<b>242,36 ± 8,42b</b>	152,64 ± 25,41a	<b>237,78 ± 2,31b</b>	137,40 ± 14,07a	144,76 ± 36,69a	124,64 ± 3,75a
<b>Total ésteres de etilo</b>		<b>2095,73 ± 206,75a</b>	<b>1886,07 ± 149,39a</b>	<b>2181,06 ± 53,33a</b>	<b>1494,27 ± 60,32a</b>	<b>1832,88 ± 170,52b</b>	<b>1414,36 ± 45,10a</b>
Acetato de hexilo	1500 µg/L (d)	19,68 ± 2,33a	15,99 ± 2,29a	17,42 ± 4,43a	19,31 ± 0,16b	34,70 ± 0,01c	18,11 ± 0,52a
Acetato de isoamilio	30 µg/L (a)	<b>785,09 ± 57,26b</b>	<b>846,04 ± 69,72b</b>	<b>561,91 ± 104,98a</b>	<b>708,73 ± 8,07b</b>	<b>987,74 ± 20,43c</b>	<b>553,65 ± 16,84a</b>
Acetato de 2-feniletilo	250 µg/L (a)	29,72 ± 5,91a	29,19 ± 3,89a	30,82 ± 5,57a	65,07 ± 1,24b	65,01 ± 3,92b	45,53 ± 1,32a
<b>Total acetatos</b>		<b>834,49 ± 14,12b</b>	<b>891,22 ± 49,13b</b>	<b>610,15 ± 7,80a</b>	<b>793,11 ± 8,07b</b>	<b>1087,45 ± 20,43c</b>	<b>617,29 ± 16,84a</b>
Acetato de etilo (mg/L)	7,5 mg/L (a)	<b>65,56 ± 1,91b</b>	<b>61,61 ± 1,89b</b>	<b>52,36 ± 3,07a</b>	<b>41,44 ± 1,13a</b>	<b>43,37 ± 4,46a</b>	<b>35,61 ± 0,33a</b>
<b>Total ésteres (sin acetato de etilo)</b>		<b>2930,22 ± 192,62a</b>	<b>2777,29 ± 198,52a</b>	<b>2791,22 ± 45,54a</b>	<b>2287,37 ± 68,40b</b>	<b>2920,34 ± 150,09c</b>	<b>2031,64 ± 61,94a</b>

(Continúa la tabla en la página siguiente)





**Tabla 51 (continuación).** Compuestos aromáticos de vinos Macabeo procedentes de cepas tratadas con agua ozonizada bajo diferentes estrategias de aplicación.

UPO	Descriptor aromático	2016			2017		
		C2	T2	T3	C3	T4	T5
<b>Terpenoides (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>							
$\beta$ -ionona	violetas	0,02 $\pm$ 0,00a	0,02 $\pm$ 0,00a	0,02 $\pm$ 0,00a	0,01 $\pm$ 0,00a	0,01 $\pm$ 0,00a	0,01 $\pm$ 0,00a
Farnesol	floral	40,24 $\pm$ 7,21ab	33,54 $\pm$ 2,22a	45,57 $\pm$ 4,31b	41,38 $\pm$ 4,35a	34,93 $\pm$ 5,74a	46,88 $\pm$ 1,41a
Nerolidol	floral	0,46 $\pm$ 0,05a	0,46 $\pm$ 0,03a	0,48 $\pm$ 0,04a	0,31 $\pm$ 0,02a	0,25 $\pm$ 0,01a	0,28 $\pm$ 0,02a
Citronelol	cítrico	4,77 $\pm$ 1,03a	4,96 $\pm$ 0,14a	5,91 $\pm$ 0,30a	4,21 $\pm$ 0,22a	5,00 $\pm$ 0,38ab	5,89 $\pm$ 0,09b
Geraniol acetona	floral	0,31 $\pm$ 0,12a	0,32 $\pm$ 0,04a	0,34 $\pm$ 0,02a	0,11 $\pm$ 0,01a	0,14 $\pm$ 0,01a	0,12 $\pm$ 0,01a
Geraniol	floral	14,78 $\pm$ 2,81a	16,22 $\pm$ 0,68a	14,47 $\pm$ 1,26a	9,79 $\pm$ 0,75a	12,06 $\pm$ 0,72a	12,23 $\pm$ 0,01a
Nerol	rosas	4,05 $\pm$ 0,45a	4,12 $\pm$ 0,39a	3,70 $\pm$ 0,34a	2,38 $\pm$ 0,07a	2,87 $\pm$ 0,06b	2,59 $\pm$ 0,05a
<b>Total terpenoides</b>		<b>64,63 <math>\pm</math> 6,91ab</b>	<b>59,64 <math>\pm</math> 3,28a</b>	<b>70,49 <math>\pm</math> 3,13b</b>	<b>58,19 <math>\pm</math> 1,71a</b>	<b>55,26 <math>\pm</math> 1,74a</b>	<b>68,00 <math>\pm</math> 2,67b</b>
<b>TOTAL COMPUESTOS AROMÁTICOS (mg/L)</b>		<b>274,15 <math>\pm</math> 3,48a</b>	<b>289,41 <math>\pm</math> 5,77b</b>	<b>272,81 <math>\pm</math> 6,51a</b>	<b>179,83 <math>\pm</math> 1,20c</b>	<b>160,11 <math>\pm</math> 4,72a</b>	<b>169,01 <math>\pm</math> 0,77b</b>

UPO: umbral de percepción olfativa; C2 y C3: vinos control (procedentes de cepas sin tratar) en las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente; T2: vinos de cepas tratadas por riego; T3: vinos de cepas tratadas combinando riego y aéreo; T4: vinos de cepas tratadas por endoterapia; T5: vinos de cepas tratadas combinando endoterapia y aéreo. Cada parámetro está representado por su valor medio ( $n=2$ ) y su desviación estándar. Letras diferentes en la misma fila y cosecha, indican diferencias significativas de acuerdo con la prueba Tukey-b ( $p \leq 0,05$ ). Referencias del umbral aromático se muestran entre paréntesis para cada compuesto: (a) Guth (1997), (b) Ferreira et al. (2000), (c) López et al. (2002), (d) Eliévant (1991), (e) Franco et al. (2004). En negrita se han marcado los compuestos que superan el UPO.



El contenido total de compuestos aromáticos estuvo afectado por la cosecha, ya que todos los vinos de 2016 mostraron contenidos superiores a los de 2017. Pero además, se observó un importante efecto de los tratamientos con agua ozonizada ya que el tratamiento por riego (T2) aumentó el contenido total volátil de los vinos, sin embargo, los tratamientos de la segunda cosecha (T4 y T5) lo disminuyeron significativamente.

Si tenemos en cuenta los distintos grupos de volátiles analizados, los generados durante la fermentación fueron los más abundantes, destacando entre ellos los alcoholes, seguidos por los ésteres y los ácidos. Los compuestos varietales, tales como los terpenoides, fueron los que se encontraron en menor concentración, tal como era de esperar ya que los vinos de Macabeo, en especial los elaborados de forma tradicional, poseen bajos contenidos de aromas varietales, destacando en ellos los aromas fermentativos (Piñeiro *et al.*, 2006).

A nivel individual, el comportamiento difiere mucho de un compuesto a otro ya que depende de la añada y del tratamiento con agua ozonizada utilizado en las cepas.

En el grupo de los ácidos, no se observó un efecto significativo de los tratamientos, y sólo los ácidos hexanoico y octanoico excedieron su UPO correspondiente. No obstante, se aprecia un significativo efecto de la añada en el contenido en ácido decanoico ya que llegó a triplicarse en los vinos de 2017. La añada también influyó en el ácido hexanoico, ya que se redujo aproximadamente un 13% en los vinos de 2017. Sin embargo, el contenido total de ácidos se mantuvo dentro de la normalidad en vinos blancos.



En el grupo de los alcoholes, los amílicos estuvieron muy condicionados por la cosecha, ya que fueron aproximadamente un 40% más altos en 2016 que en 2017, lo que está relacionado con las condiciones climáticas, ya que hubo una deficiencia de agua en la etapa de maduración de la vid en 2017. Con respecto a los tratamientos, los alcoholes amílicos disminuyeron en los vinos T4 alrededor de un 15% respecto al control. Por otro lado, los tratamientos T3 y T4 influyeron en el contenido del 2-feniletanol ya que su contenido aumentó cuando el agua ozonizada fue aplicada combinando riego y aéreo (T3) y disminuyó cuando fue aplicada por endoterapia (T4). Cabe señalar que los vinos de los tratamientos con el mayor número de aplicaciones (T3 y T5) superaron el UPO de dicho compuesto cuyo aroma recuerda a las rosas y a la miel. El 1-hexanol es el único alcohol cuyo origen es principalmente varietal. Sus mayores contenidos se encontraron en las uvas de los tratamientos T2 y T3 (Tabla 33), y a ello se debe que los contenidos mayores de este compuesto C6 se encontraran en los vinos T2 y T3. El 1-hexanol proporciona un aroma negativo a los vinos, que recuerda a la hierba cortada, sin embargo sus concentraciones son muy inferiores a su UPO, por lo que no será percibido en ninguno de los vinos.

El éster más abundante en todos los vinos fue el acetato de etilo, y en todos ellos excedió su UPO. Posee un aroma afrutado cuando se encuentra en los vinos por debajo de 80 mg/L, pero por encima de este valor comunica un aroma negativo que recuerda al pegamento (Piggott and Findlay, 1984). Por tanto, los contenidos encontrados de acetato de etilo en todos los vinos de este estudio contribuyen al aroma positivo afrutado del vino. Sólo el tratamiento T3 lo disminuyó significativamente con respecto al control, pero los demás tratamientos no le influyeron.





Los ésteres etílicos fueron los predominantes en el grupo de los ésteres, y excluyendo el acetato de etilo, el más abundante fue el octanoato de etilo, que excedió su UPO en todos los vinos, por lo que participó en su aroma afrutado, pero no estuvo influido por los tratamientos con agua ozonizada. Sólo cabe destacar que, en comparación con sus respectivos vinos control, el tratamiento T3 produjo vinos con un 40% más de dihidrocinamato de etilo, T4 aumentó un 15% el hexanoato de etilo y T2 disminuyó un 37% el contenido de decanoato de etilo.

Excluyendo el acetato de etilo, el acetato de isoamilo fue el único compuesto del grupo de los acetatos que excedió su UPO en todos los vinos, por lo que participó en el aroma con su característica nota afrutada a plátano. No se vio influido por la añada, pero se observó una tendencia a aumentar en los vinos procedentes de cepas tratadas con un menor número de aplicaciones de agua ozonizada (T2 y T4), y a disminuir en los de cepas tratadas con un mayor número de aplicaciones (T3 y T5). En concreto, el tratamiento T4 aumentó alrededor de un 39% el contenido de acetato de isoamilo.

El acetato de hexilo no sufrió el efecto añada, pero aumentó significativamente (80%) en el vino T4, aunque no superó el UPO. El acetato de 2-feniletilo estuvo influenciado por la añada, ya que los vinos control de 2017 duplicaron su contenido en comparación con los de la cosecha de 2016 aunque no lo suficiente para que su aroma participara en el del vino.

Los terpenoides contribuyen al aroma varietal de los vinos, y aunque no superen sus correspondientes UPOs, interaccionan entre ellos produciendo un efecto sinérgico, por lo que pueden contribuir positivamente al aroma del vino con aromas florales. Parece



observarse un efecto de la añada a nivel general, ya que los contenidos de muchos de los terpenoides analizados son inferiores en los vinos control de 2017 que en los de 2016. Posiblemente la escasez de lluvias en 2017 tenga que ver en el mencionado efecto.

En la cosecha de 2016 los vinos del tratamiento T3 tuvieron el mayor contenido total de terpenoides, debido principalmente al farnesol. En los vinos de la cosecha de 2017, el procedente del tratamiento T5 tuvo el mayor contenido en terpenoides totales debido al farnesol y geraniol. La ratio IPAv uvas/terpenoides fue en los vinos de 2016: 0,094 (C2), 0,091 (T2) y 0,067 (T3), mientras que para los vinos de la cosecha de 2017 fue: 0,165 (C3), 0,154 (T4) y 0,114 (T5).

Por tanto, los tratamientos más intensivos (T3 y T5) con agua ozonizada en las viñas, aumentaron la liberación de terpenoides en los vinos en relación con sus correspondientes controles.

Entre los volátiles analizados en los vinos, tal como se ha indicado anteriormente, también el 1-hexanol tiene un origen varietal. La ratio IPAv uvas/1-hexanol también muestra un comportamiento paralelo al de los terpenoides, destacando los tratamientos T3 y T5 en los vinos de las cosechas de 2016 y 2017 respectivamente. A diferencia de los terpenoides, el 1-hexanol tiene un elevado UPO que no es superado en los vinos, por lo que no participa en la percepción del aroma.

En consecuencia, los tratamientos en donde fue mayor la aplicación de agua ozonizada, también fue mayor la presencia de aromas varietales, lo que sugiere que en ellos será más fácilmente percibida la tipicidad varietal.



### 6.2.2.5. Análisis discriminante de los vinos Macabeo

Al igual que en los vinos Cabernet Sauvignon, se realizó un análisis discriminante agrupando los vinos en tres grupos según el número de aplicaciones de agua ozonizada: **grupo C** (vinos control C2 y C3), **grupo BI** (vinos de los tratamientos T2 y T4, o aplicaciones de baja intensidad) y **grupo AI** (vinos de los tratamientos T3 y T5, o aplicaciones de alta intensidad).

Se realizaron varios análisis discriminantes utilizando todos los parámetros analizados, los que se suelen medir en bodega y los derivados del metabolismo fermentativo. Se logró la completa separación de las muestras cuando se realizaron dos análisis discriminantes. El primero usando los convencionales, colorimétricos y azúcares (parámetros enológicos), y el segundo utilizando los volátiles fermentativos (incluyendo el glicerol).

En el primer caso, se obtuvieron dos funciones discriminantes, de las cuales F1 explicó el 81% de la varianza, mientras que F2 explicó el 19% de la misma (Tabla 52).

**Tabla 52.** Funciones discriminantes obtenidas cuando se emplearon los parámetros enológicos de vinos Macabeo.

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	184,954a	<b>80,9</b>	80,9	0,997
2	43,781a	<b>19,1</b>	100,0	0,989

En la Tabla 53 se muestran los parámetros con los valores absolutos más altos de los coeficientes discriminantes.

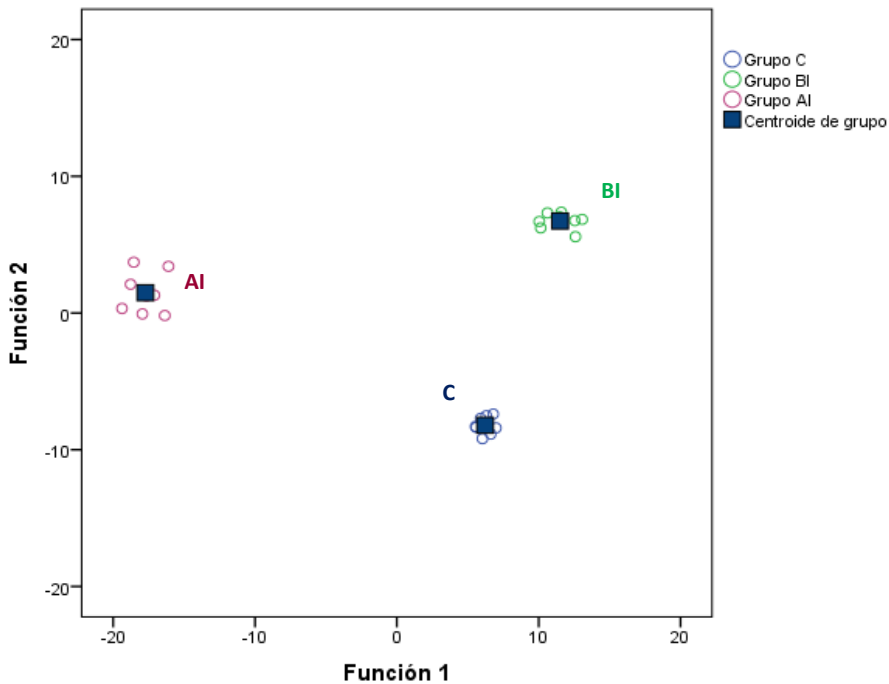


**Tabla 53.** Coeficientes de las funciones discriminantes.

	Función	
	1	2
Grado alcohólico	16,126	1,058
Acidez total	-2,801	6,353
Glucosa	2,794	6,270
b*	-13,620	-4,484

Las variables con el mayor peso en F1 fueron el grado alcohólico, la coordenada b\*, la acidez total y la glucosa, y en F2 la acidez total, la glucosa, la coordenada b\* y el grado alcohólico.

En la Figura 44 se muestra la separación de las muestras proporcionada por el anterior análisis discriminante.



**Figura 44.** Gráfico en el que se muestra la separación de grupos resultante del análisis discriminante usando los parámetros enológicos de vinos Macabeo. C: grupo control; BI: grupo de tratamientos de baja intensidad; AI: grupo de tratamientos de alta intensidad.

La aplicación del análisis discriminante empleando los compuestos fermentativos permitió la separación de las muestras mediante dos funciones discriminantes, de las cuales F1 explicó el 84% de la varianza y F2 el 16% (Tabla 54).

**Tabla 54.** Funciones discriminantes obtenidas cuando se emplearon los compuestos fermentativos de vinos Macabeo.

Función	Autovalor	% de varianza	% acumulado	Correlación canónica
1	250,915a	<b>84,0</b>	84,0	0,998
2	47,741a	<b>16,0</b>	100,0	0,990

En la Tabla 55 se muestran los parámetros con los valores absolutos más altos de los coeficientes discriminantes.

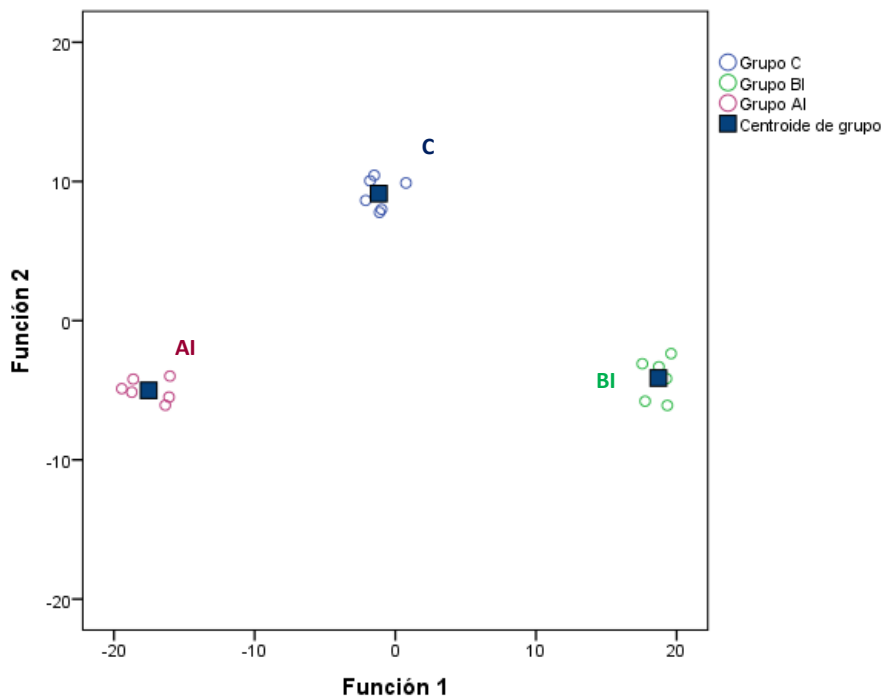
**Tabla 55.** Coeficientes de las funciones discriminantes.

	Función	
	1	2
Ácido decanoico	13,140	6,044
Dihidrocínammato de etilo	-8,533	-2,839
Octanoato de etilo	-14,243	-5,582
Acetato de etilo	-5,554	9,155

Las variables con los valores absolutos más altos de los coeficientes discriminantes en F1 fueron el octanoato de etilo, el ácido decanoico, el dihidrocínammato de etilo y el acetato de etilo, y en F2 el acetato de etilo, el ácido decanoico, el octanoato de etilo y el dihidrocínammato de etilo.

En la Figura 45 se observa la separación de las muestras proporcionada por el anterior análisis discriminante.





**Figura 45.** Gráfico en el que se muestra la separación de grupos resultante del análisis discriminante usando los compuestos fermentativos de vinos Macabeo. C: grupo control; BI: grupo de tratamientos de baja intensidad; AI: grupo de tratamientos de alta intensidad.

Por lo tanto, la intensidad de las aplicaciones con agua ozonizada tiene un efecto relevante sobre los parámetros seleccionados en los anteriores análisis discriminantes. Entre ellos destacaron el grado alcohólico y la coordenada  $b^*$ , para los cuales anteriormente ya habíamos observado que el grado alcohólico presentaba un valor mayor en los vinos del **grupo BI** que en los del **grupo AI** (Tabla 48), y el parámetro  $b^*$  un mayor valor en los vinos del **grupo AI** (Tabla 49). Es decir, los vinos de los tratamientos T3 y T5 (alta intensidad de aplicación) además de poseer menor grado alcohólico que los demás vinos, también se diferencian por tener coloraciones más claras, aunque, este cambio de color por efecto de los tratamientos sólo sería perceptible para el consumidor en el caso del vino T5, tal como se observó anteriormente (Tabla 49).



En cuanto a los metabolitos fermentativos que separaron los tres grupos de vinos, destacan el ácido decanoico, que triplicó su contenido por efecto de la añada, y tres ésteres etílicos, entre los cuales sólo se observaron diferencias entre tratamientos en el caso de dihidrocinamato de etilo y de acetato de etilo. El primero de ellos se encontró en mayores concentraciones en los vinos del **grupo A1**, mientras que, por el contrario, acetato de etilo alcanzó sus menores concentraciones también en los vinos del **grupo A1** (Tabla 51).

#### **6.2.2.6. Resultados más concluyentes en los vinos Macabeo**

Al igual que en los vinos Cabernet Sauvignon, los tratamientos con agua ozonizada influyeron en la composición química de los vinos, y los efectos observados están relacionados en mayor medida con la intensidad de la aplicación que con la estrategia utilizada.

Entre los resultados obtenidos, los vinos procedentes de los tratamientos de mayor intensidad de aplicación (T3 y T5), destacaron por poseer el menor grado alcohólico. También disminuyeron el contenido en ácido tartárico y dieron lugar a vinos con coloraciones más claras (menos amarillas), aunque este cambio de color sólo sería perceptible para el consumidor en el caso del vino T5.

La comparación del IPA<sub>v</sub> de los vinos con sus correspondientes uvas, sugiere que los tratamientos pueden facilitar la extracción de los precursores aromáticos durante la vinificación, o bien aumentar la liberación de las agliconas volátiles de los precursores. En concreto, los tratamientos más intensivos (T3 y T5) con agua ozonizada en las viñas, aumentaron la liberación de terpenoides en los vinos en relación con sus correspondientes controles, lo que



sugiere que en ellos será más fácilmente percibida la tipicidad varietal.





## 7. CONCLUSIONES

---



De los trabajos realizados en esta Tesis Doctoral, se derivan las siguientes conclusiones:

1. Los parámetros enológicos analizados en la uva y en el vino dependen de la estrategia de aplicación de agua ozonizada y difieren según la variedad estudiada.

**En relación con las uvas, hemos observado que:**

2. La mayor repercusión de los tratamientos tiene lugar en el equilibrio azúcar/acidez de las uvas, lo que sugiere que la aplicación de agua ozonizada produce un retraso en la maduración de las mismas.
3. La aplicación de agua ozonizada a la parte aérea de la vid mejora el potencial aromático y color de las uvas Cabernet Sauvignon.
4. Los mejores resultados en los parámetros de calidad de la uva Cabernet Sauvignon, tanto a nivel fenólico y aromático como en el color, se obtienen cuando se aplica el agua ozonizada combinando el tratamiento de riego por goteo con la aplicación aérea.
5. La endoterapia produce un efecto supresor en la calidad de la uva Cabernet Sauvignon, pero éste es menos negativo cuando se combina la endoterapia con la aplicación aérea.
6. Los tratamientos de baja intensidad (riego por goteo y endoterapia) aumentan el contenido de precursores aromáticos glicosilados de las uvas Macabeo con respecto a



los tratamientos de alta intensidad (tratamientos combinados de riego por goteo y aéreo y de endoterapia y aéreo), lo que indica una mejora de la calidad aromática.

**En relación con los vinos, hemos observado que:**

7. Todos los tratamientos con agua ozonizada disminuyen el grado alcohólico y el contenido de glicerol y de acetato de etilo en los vinos Cabernet Sauvignon.
8. En los vinos Cabernet Sauvignon, los tratamientos de baja intensidad disminuyen el pH, el contenido polifenólico, el potencial aromático varietal, y producen vinos con baja calidad cromática.
9. El tratamiento combinado de riego por goteo y aéreo da lugar a vinos con los mejores parámetros cromáticos y con los contenidos más altos en antocianinas pormenorizadas en la variedad Cabernet Sauvignon. Además, este tratamiento también produce un aumento del contenido aromático en dichos vinos.
10. Los vinos Macabeo resultantes de los tratamientos de mayor intensidad de aplicación, poseen el menor grado alcohólico, bajos contenidos en ácido tartárico y las coloraciones más claras.
11. La comparación del potencial aromático varietal de los vinos Macabeo con sus correspondientes uvas sugiere que los tratamientos pueden facilitar la extracción de los precursores



aromáticos durante la vinificación, o bien aumentar la liberación de las agliconas volátiles de los precursores.

- 12.** En general observamos que los vinos de cepas sometidas a los tratamientos más intensivos con agua ozonizada tienen mejores características que los de los tratamientos menos intensivos, lo que sugiere que el efecto del agua ozonizada en la calidad del vino depende más de la intensidad de la aplicación que de la estrategia utilizada.
  
- 13.** En definitiva, los resultados de esta Tesis demuestran que los tratamientos del viñedo con agua ozonizada podrían constituir una forma prometedora para mejorar la calidad de la uva y del vino y al mismo tiempo reducir el uso de fitoquímicos.





## 8. BIBLIOGRAFÍA

---





## A

---

- Acimovic, S. G., VanWoerkom, A. H., Reeb, P. D., Vandervoort, C., Garavaglia, T., Cregg, B. M. and Wise, J. C. (2014) Spatial and temporal distribution of trunk-injected imidacloprid in apple tree canopies. *Pest Management Science* 70, 1751–1760.
- Acimovic, S. G., Zeng, Q., McGhee, G. C., Sundin, G. W. and Wise, J. C. (2015) Control of fire blight (*Erwinia amylovora*) on apple trees with trunk-injected plant resistance inducers and antibiotics and assessment of induction of pathogenesis-related protein genes. *Frontiers in Plant Science* 6, 16.
- Agustí-Brisach, C. and Armengol, J. (2013) Black-foot disease of grapevine: An update on taxonomy, epidemiology and management strategies. *Phytopathologia Mediterranea* 52(2), 245-261.
- Alcalde-Eón, C., Pérez-Mestre, C., Ferreras-Charro, R., Rivero, F. J., Heredia, F. J. and Escribano-Bailón, M. T. (2019) Addition of mannoproteins and/or seeds during winemaking and their effects on pigment composition and color stability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 67, 4031-4042.
- Alem, H., Rigou, P., Schneider, R., Ojeda, H. and Torregrosa, L. (2018) Impact of agronomic practices on grape aroma composition: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 99, 975–985.
- Almeida, N. R., Beatriz, A., Micheletti, A. C. and Arruda, E. J. D. (2013) Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: A review. *Orbital-The Electronic Journal of Chemistry* 4(4), 313-326.
- Arias-Gil, M., Garde-Cerdán, T. and 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.



Arozarena, I., Ayestaran, B., Cantalejo, M. J., Navarro, M., Vera, M., Abril, I. and Casp, A. (2002) Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years. *European Food Research and Technology* 214: 303-309.

Arroyo-López, F. N., Pérez-Torrado, R., Querol, A. and Barrio, E. (2010) Modulation of the glycerol and ethanol syntheses in the yeast *Saccharomyces kudriavzevii* differs from that exhibited by *Saccharomyces cerevisiae* and their hybrid. *Food Microbiology* 27, 628-637.

Asproudi, A., Ferrandino, A., Bonello, F., Vaudano, E., Pollon, M. and Petrozziello, M. (2018) Key norisoprenoid compounds in wines early-harvested in view of climate change. *Food Chemistry* 268, 143–152.

## B

---

Barceló, A. R., Calderón, A. A., Zapata, J. M. and Muñoz, R. (1994) The histochemical localization of anthocyanins in seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera*). *Scientia Horticulturae* 57, 265-268.

Baumes, R. (2009) Wine Aroma Precursors. In *Wine Chemistry and Biochemistry*. Moreno-Arribas, M.; Polo, M. Eds. Springer, New York, Chapter 8, 251-274.

Baumes, R., Wirth, J., Bureau, S. and Gunata, Y. (2002) Biogeneration of C-13-norisoprenoid compounds: experiments supportive for an apocarotenoid pathway in grapevines. *Analytica Chimica Acta* 458, 3.

Baur, J. A., and Sinclair, D. A. (2006) Therapeutic Potential of Resveratrol: The In Vivo Evidence. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 493-506.



- Bayonove, C. (2003) El aroma varietal: El potencial aromático de la uva. En C. Flanzy (Ed.), *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*, 137-146. Mundi-Prensa: Madrid, Spain.
- Belda, I., Ruiz, J., Esteban-Fernández, A., Navascués, E., Marquina, D., Santos, A. and Moreno-Arribas, M. V. (2017) Microbial contribution to wine aroma and its intended use for wine quality improvement. *Molecules* 22(2), 189.
- Bellincontro, A., Catelli, C., Cotarella, R. and Mencarelli, F. (2017) Postharvest ozone fumigation of Petit Verdot grapes to prevent the use of sulfites and to increase anthocyanin in wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 23, 200–206.
- Berger, C. and Laurent, F. (2019) Trunk injection of plant protection products to protect trees from pests and diseases. *Crop Protection* 124.
- Bernardo, S., Dinis, L. T., Machado, N. and Moutinho-Pereira, J. (2018) Grapevine abiotic stress assessment and search for sustainable adaptation strategies in Mediterranean-like climates: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 38(6), 1–20.
- Blanco, P., Mirás-Avalos, J. M., Pereira, E. and Orriols, I. (2013) Fermentative aroma compounds and sensory profiles of godello and albariño wines as influenced by *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93(11), 2849–2857.
- Blouin, J. and Guimberteau, G. (2004) *Maduración y madurez de la uva*. Mundi-Prensa: Madrid, Spain.
- Bonicelli, B., Naud, O., Rousset, S., Sinfort, C., Rudnicki, V., Lescot, J. M., Ruelle, L., Scheyer, L. and Cotteux, E. (2010) The challenge for precision spraying. In *AgEng 2010: International Conference on Agricultural Engineering*; Clermont-Ferrand, France; p 11.



Bowers, J. E. and Meredith C. P. (1997) The parentage of a classic wine grape, Cabernet Sauvignon. *Nature Genetics* 16, 84-87.

Bruneton, J. (1993) *Farmacognosia: Fitoquímica y Plantas Medicinales*. 2nd ed. (A. Villar del Fresno, E. Carretero Accame, and M. Rebuelta Lizabe, Trads.). ACRIBIA S.A.: Madrid, Spain.

Buesa, I., Martínez, A., Yeves, A., Sanz, F., Chirivella, C., Gil, R. and Intrigliolo, D. S. (2018) Forzar la brotación de las yemas: ¿una técnica vitícola sostenible a escala comercial? *Jornadas de Viticultura de la Sociedad Española de Ciencias Hortícolas*, 28-29 de noviembre; Palma de Mallorca, Spain.

## C

---

Cabrita, M. J., Costas Freitas, A., Laureano, O. and Di Stefano, R. (2006) Glycosidic aroma compounds of some Portuguese grape cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 86, 922–931.

Campayo, A., Serrano de la Hoz, K., García-Martínez, M. M., Sánchez-Martínez, J. F., Salinas, M. R. and Alonso, G. L. (2019) Spraying ozonated water on Bobal grapevines: effect on grape quality. *Food Research International* 125, 108540.

Campayo, A., Serrano de la Hoz, K., García-Martínez, M. M., Salinas, M. R. and Alonso, G. L. (2020) Spraying ozonated water on Bobal grapevines: effect on wine quality. *Biomolecules* 10(2), 213.

Carbonell, P and Martínez, J. M. (2013) Estructura y composición de la uva y su contribución al vino. *Revista de enología* 139.

Castia, T., Franco, M. A., Mattivi, F., Muggiolu, G., Sferlazzo, G. and Versini, G. (1992) Characterization of grapes cultivated in Sardinia: chemometric methods applied to the anthocyanic fraction. *Sciences des Aliments* 12, 239-255.



- Castillo-Muñoz, N., Fernández-González, M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E. and Hermosín-Gutiérrez, I. (2009) Red-color related phenolic composition of Garnacha tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 57, 7883-7891.
- Cheyrier, V. and Rigaud J. (1986) HPLC Separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture* 37, 248-252.
- Chirivella, C., Méndez, J. V. and Haba, M. (1995) Ecología vitícola varietal. Aptitudes enológicas. Generalitat Valenciana. Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació. Valencia, España.
- Coelho, C. C. S., Freitas-Silva, O., Da S. Campos, R., Bezerra, V. S. and Cabral, L. M. C. (2015) Ozonation as post-harvest technology in conservation os fruits and vegetables: A review. *Revista Brasileira de Engenharia Agricola e Ambiental* 19, 369-375.
- Coseomazono (2020). Desinfección en Agricultura. [Consulta: 01/05/2020].[https://www.cosemarozono.com/soluciones/desinfeccion-agricultura-ozono/como-eliminar-plaguicidas humeda/](https://www.cosemarozono.com/soluciones/desinfeccion-agricultura-ozono/como-eliminar-plaguicidas-humeda/)
- Criegee, R. (1975) Mechanism of ozonolysis. *Angewandte Chemie International Edition in English* 14(11), 745-752.
- Culleré, L., Escudero, A., Campo, E., Cacho, J. and Ferreira, V. (2009) Multidimensional gas chromatography–mass spectrometry determination of 3-alkyl-2-methoxypyrazines in wine and must. A comparison of solid-phase extraction and headspace solid-phase extraction methods. *Journal of Chromatography A* 1216, 4040–4045.



## D

---

- De la Hera, M. L., Martínez-Cutillas, A., López Roca, J. M., Pérez-Prieto, L. J. and Gómez-Plaza, E. (2005) Effect of deficit irrigation on anthocyanin content of Monastrell grapes and wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 39, 1-9.
- De Sanctis, F., Ceccantoni, B., Bellincontro, A., Botondi, R., Mencarelli, F., D'Onofrio, C., Ducci, E. and Catelli, C. (2015) Ozone fumigation postharvest treatment for the quality of wine grape. *Acta Horticulturae* 1071, 795–800.
- Del Frari, G., Costa, J., Oliveira, H. and Boavida Ferreira, R. (2018) Endotherapy of infected grapevine cuttings for the control of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium minimum*. *Phytopathology Mediterranean* 57(3), 439–448.
- Di Stefano, R. (1995) Extraction of phenolics from grape solids during fermentation. *Acta Horticulturae* 388, 163-170.
- Düker, A. and Kubiak, R. (2009) Stem application of metalaxyl for the protection of *Vitis vinifera* L. ("Riesling") leaves and grapes against downy mildew (*Plasmopora viticola*). *Vitis* 48, 43–48.

## E

---

- Esteban, M. A., Villanueva, M. J. and 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, 409-420.
- Etiévant, P. X. (1991) Wine. In H. Maarse Eds., *Volatile compounds in foods and beverages* (pp. 483-546). New York: Marcel Dekker.
- Etiévant, P.X., Issanchou, S. N., Marie, S., Ducruet, V. and Flanzky, C. (1989) Sensory impact of volatile phenols on red wine aroma: Influence of carbonic maceration and time of storage. *Sciences des Aliments* 9, 19-33.



E.V. (1987) Enciclopedia del vino. Ediciones Orbis, S.A., Barcelona.

## F

---

Fairbairn, S., McKinnon, A., Musarurwa, H. T., Ferreira, A. C. and Bauer, F. F. (2017) The impact of single amino acids on growth and volatile aroma production by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Frontiers in Microbiology* 8, 2554.

FDA (2001) Secondary direct food additives permitted in food for human consumption, final rule. Federal register. 66, 33829–33830.

Fernández de Simón, B., Cadahía, E., Sanz, M., Poveda, P., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M. and González-Huerta, C. (2008) Volatile compounds and sensorial characterization of wines from four Spanish denominations of origin, aged in Spanish rebollo (*Quercus pyrenaiza* Wild.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9046-9055.

Ferreira, V. (2007) La base química del aroma del vino: Un viaje analítico desde las moléculas hasta las sensaciones olfato-gustativas. *Real Academia de Ciencias* 62, 7-36.

Ferreira, V., López, R. and Cacho, J. F. (2000) Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1659–1667.

Flanzy, C. (2000) *Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Mundi-Prensa: Madrid, Spain.

Florence, F., Gramaje, D., Armengol, J., Smart, R., Nagy, Z. A., Borgo, M., Rego, C. and Corio-costet, M. F. (2016) *Grapevine Trunk Diseases. A Review*, 1st ed. OIV Publications: Paris, France.



Fragasso, M., Antonacci, D., Pati, S., Tufariello, M., Baiano, A., Forleo, L. R. and La Notte, E. (2012) Influence of training system on volatile and sensory profiles of primitive grapes and wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 63, 477-486.

Franco, M., Peinado, R. A., Medina, M. and Moreno, J. (2004) Off-vine grape drying effect on volatile compounds and aromatic series in must from Pedro Ximénez grape variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(12), 3905–3910.

## G

---

García, E., Chacón, J. L., Martínez, J. and 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-Esparza, M. J., Abrisqueta, I., Escriche, I., Intrigliolo, D. S., Alvarez, I. and Lizama, V. (2018) Volatile compounds and phenolic composition of skins and seeds of 'Cabernet Sauvignon' grapes under different deficit irrigation regimes. *Vitis* 57, 83–91.

García-Jiménez J., Raposo R. and Armengol J. (2010) Enfermedades fúngicas de la madera de la vid. Pgs.161-173 en: R. F. Jiménez Díaz y E. Montesinos Seguí Eds. *Enfermedades de las plantas causadas por hongos y oomicetos. Naturaleza y control integrado*. SEF-PHYTOMA, Valencia (Spain).

Garde-Cerdán, T. and Ancín-Azpilicueta, C. (2008) Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology* 41(3), 501–510.





- Garrido, J. and Borges, F. (2013) Wine and grape polyphenols. A chemical perspective. *Food Research International* 54, 1844-1858.
- Gil, E., Barrufet, J. M., Cluet, M. and Teruel, J. A. (1998) Improvement of the pesticide applications in vineyard. Relationship between methodology of application and quality parameters. *Proceedings of the International Conference on Agricultural Engineering AgEng-98, Oslo, Norway.*
- Gil, M., Quirós, M., Fort, F., Morales, P., González, R., Canals, J. M. and Zamora, F. (2015) Influence of Grape Maturity and Maceration Length on Polysaccharide Composition of Cabernet Sauvignon Red Wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 66(3), 393.
- Glories, Y. (1984) La couleur des vins rouges. Les equilibres des anthocyanes et des tanins. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 18, 197-217.
- Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Escribano-Bailón, M. T., Heredia, F. J. and Santos-Buelga, C. (2006) Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 5422-5429.
- Gonzaga, L. S., Capone, D. L., Bastian, S. E. P., Danner, L. and Jeffery, D. W. (2019) Using content analysis to characterise the sensory typicity and quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon wines. *Foods* 8, 691.
- González-Manzano, S., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T. and Santos-Buelga C. (2009) Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chemistry* 114, 649-656.



- González-Neves, G., Franco, J., Barreiro, L., Gil, G., Moutounet, M. and Carbonneau, A. (2007) Varietal differentiation of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and wines according to their anthocyanic composition. *European Food Research and Technology* 225, 111–117.
- González-Rodríguez, R. M., Noguerol-Pato, R., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B. and Simal-Gándara, J. (2011) Application of new fungicides under good agricultural practices and their effects on the volatile profile of white wines. *Food Research International* 44, 397-403.
- González-San José, M. L., Santa-María, G. and Díez, C. (1990) Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region, and wine-making methods. *Journal of Food Composition and Analysis* 3, 54-66.
- Graham, D. M. (1997) Use of ozone for food processing. *Food Technology* 51(6), 72–75.
- Gramaje, D. and Armengol, J. (2011) Fungal Trunk Pathogens in the Grapevine Propagation Process: Potential Inoculum Sources, Detection, Identification, and Management Strategies. *Plant Disease* 95(9).
- Guth, H. (1997) Quantitation and sensory studies of character impact odorants of different white wine varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45(8), 3027–3032.
- Guzel-Seydim, Greene, A. K. and Seydim, A. C. (2004) Use of ozone in the food industry. *Food Science and Technology* 37(4), 453-460.



## H

---

He, F., Liang, N. N., Mu, L., Pan, Q. H., Wang, J., Reeves, M. J. and Duan, C. Q. (2012) Anthocyanins and their variation in red wines II. Anthocyanin derived pigments and their color evolution. *Molecules* 17(2), 1483–1519.

Hermosín-Gutiérrez, I., Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S. and García-Romero, E. (2011) Flavonol profiles for grape and wine authentication. In *Progress in Authentication of Food and Wine*. Journal of the American Chemical Society 1081, 113-129.

Hidalgo, L. (2011) *Tratado de enología*. 2d ed. Madrid-Vicente: Madrid, Spain.

Hidalgo, L. (1993) *Tratado de viticultura*. 1st ed. Mundi Prensa: Madrid, Spain.

Hjelmeland, A. K. and Ebeler, S. E. (2015) Glycosidically bound volatile aroma compounds in grapes and wine: a review. *American Journal of Enology and Viticulture* 66, 1–11.

Hu, J., Jiang, J. and Wang, N. (2017) Control of citrus huanglongbing via trunk injection of plant defense activators and antibiotics. *Phytopathology* 108, 186–195.

Hu, J. and Wang, N. (2016) Evaluation of the spatiotemporal dynamics of oxytetracycline and its control effect against Citrus Huanglongbing via trunk injection. *Phytopathology* 106, 1495–1503.

## I

---



## J

---

Staehelin, J. and Hoigné, J. (1982) Decomposition of Ozone in Water: Rate of Initiation by Hydroxide Ions and Hydrogen Peroxide. *Environmental Science and Technology* 16, 676-681.

## K

---

Kalua, C. M. and Boss, P. K. (2010) Comparison of major volatile compounds from Riesling and Cabernet Sauvignon grapes (*Vitis vinifera* L.) from fruit set to harvest. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 16, 337-348.

Keller, M. and Hrazdina, G. (1998) Interaction of nitrogen availability during bloom and light intensity during veraison. II. Effects on anthocyanin and phenolic development during grape ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 341-349.

Kennedy, J. A., Matthews, M. A. and Waterhouse, A. L. (2002) Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture* 53, 268-274.

Kim, K., Kim, K. H., Storey, M. K., Voelker, D. R. and Carman, G. M. (1999) Isolation and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* EK11 gene encoding ethanolamine kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 14857-14866.

Kim, J. G. and Youself, A. E. (2000) Inactivation kinetics of foodborne spoilage and pathogenic bacteria by ozone. *Journal Food Science* 65, 521-528.

Koch, A., Ebeler, S. E., Williams, L. E. and Matthews, A. (2012) Fruit ripening in *Vitis vinifera*: light intensity before and not during ripening determines the concentration of 2-methoxy3-



isobutylpyrazine in Cabernet Sauvignon berries. *Physiologia Plantarum* 145, 275–285.

Kontoudakis, N., Esteruekas, M., Fort, M. F., Canals, J. M. and Zamora, F. (2010) Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes: Correlation between predicted and obtained parameters. *Analytica Chimica Acta* 660, 127-133.

## L

---

Lambrechts, M. G. and Pretorius, I. S. (2000) Yeast and its importance to wine aroma. A review. *South African Journal of Enology and Viticulture* 21, 97-129.

Langlais, B., Reckhow, D. A. and Brink, D. R. (1991) *Ozone in wáter treatment--application and engineering.*, 1st edn. (American Water Works Association Research Foundation: Denver, CO, EE. UU.).

Larice, J. L., Archier, P., Rocheville-Divorne, C., Coen, S. and Roggero, J. P. (1989) Composition anthocyanique des cepages. II. Essai de classification sur trois ans par analyse en composantes principales et étude des variations annuelles de cépages de meme provenance. *Revue Française d'Oenologie* 121, 7-12.

Liangji, X. (2008). Uso de ozono para mejorar la seguridad de frutas y vegetales frescos. *Mundo alimentario*. Noviembre/Diciembre de 2008, 7-13.

López, R., Aznar, M., Cacho, J. and Ferreira, V. (2002) Determination of minor and trace volatile compounds in wine by solid-phase extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 966(1–2), 167–177.

Lopez-Tamames, E., Carro-Mariño, N., Günata, Y. Z., Sapis, C., Baumes, R. and Bayonove, C. (1997) Potential Aroma in Several



Varieties of Spanish Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1729-1735.

Lorenzo, C., Pardo, F., Zalacain, A., Alonso, G. L. and Salinas, M. R. (2008) Differentiation of co-winemaking wines by their aroma composition. *European Food Research and Technology* 227, 777-787.

Losada, M. M., López, J. F., Añón, A., Andrés, J. and Revilla, E. (2012) Influence of some oenological practices on the aromatic and sensorial characteristics of white verdejo wines. *International Journal of Food Science and Technology* 47, 1826-1834.

## M

---

Martínez de Toda, F. (2019) Técnicas vitícolas frente al cambio climático. Técnicas de manejo de la vegetación del viñedo para mitigar los efectos de las altas temperaturas y del calentamiento climático. Mundi-Prensa: Madrid, Spain.

Martínez-Gil, A. M., Garde-Cerdán, T., Martínez, L., Alonso, G. L. and Salinas, M. R. (2011) Effect of oak extract application to Verdejo grapevines on grape and wine aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 3253–3263.

Martínez-Gil, A. M., Pardo-García A. I., Zalacain A., Alonso G. L. and Salinas M. R. (2013) Lavandin hydrolat applications to Petit Verdot vineyards and their impact on their wine aroma compounds. *Food Research International* 53, 391-402.

Mateo, J. J. and Jiménez, M. (2000) Review: Monoterpenes in grape juice and wines. *Journal of Chromatography A* 881, 557-567.

Matsui, K. (2006) Green leaves volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Current Opinion in Plant Biology* 9, 274–280.



- Maturano, Y. P., Mestre, M. V., Kuchena, B., Toroa, M. E., Mercado, L. A., Vazquez, F. and Combina, M. (2019) Optimization of fermentation-relevant factors: A strategy to reduce ethanol in red wine by sequential culture of native yeasts. *International Journal of Food Microbiology* 289, 40-48.
- Mazza, G. (1995) Anthocyanins in grapes and grape products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 35, 341–371.
- Mc Garvey, D. J. and Croteau, R. (1995) Terpenoid metabolism. *Plant Cell*, 1015-1026.
- Mehlhorn, H., Tabner, B. J. and Wellburn, A. R. (1990) Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone. *Physiologia Plantarum* 79, 377–383.
- Mencarelli, F. and Bellincontro, A. (2018) Recent advances in postharvest technology of the wine grape to improve the wine aroma. *Journal of the Science of Food and Agriculture* <https://doi.org/10.1002/jsfa.8910>.
- Michimayr, H., Nauer, S., Brandes, W., Schümann, C., Kulbe, K. D., Del Hierro, A. M. and Eder, R. (2012) Release of wine monoterpenes from natural precursors by glycosidases from *Oenococcus oeni*. *Food Chemistry* 135, 80-87.
- Mira de Orduña, R. (2010) Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International* 43, 1844–1855.
- Modesti, M., Baccelloni, S., Brizzolara, S., Aleandri, M. P., Bellincontro, A., Mencarelli, F. and Tonutti, P. (2019) Effects of treatments with ozonated water in the vineyard (cv Vermentino) on microbial population and fruit quality parameters, 7th ed. CONAVI; 9–11 July 2018; Piacenza, Italia (Società di Ortiflorofrutticoltura Italiana: Firenze, Italy).



Molina, A. M., Swiegers, J. H., Varela, C., Pretorius, I. S. and Agosin, E. (2007) Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77(3), 675–687.

Monagas, M., Bartolomé, B. and Gómez-Cordovés, C. (2005) Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle. *European Food Research and Technology* 220, 331–340.

Montecchio, L. (2013) A venturi effect can help cure our trees. *Journal of Visualized Experiments*, 80(80).

Mugnai, L., Graniti, A. and Surico, G. (1999) “Esca (Black Measles) and Brown Wood-Streaking: Two Old and Elusive Diseases of Grapevines. *Plant Disease* 83 (5), 404-418.

## N

---

Neveu, V., Pérez-Jiménez, J., Vos, F., Crespy, V., Du Chaffaut, L., Mennen, L., Knox, C., Eisner, R., Cruz, J., Wishart, D. and Scalbert, A. (2010) Phenol-Explorer: An Online Database on Polyphenol Contents in Foods.

Noguerol-Pato, R., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Santiago, J. L., Martínez, M. C. and Simal-Gándara, J. (2012) Aroma potential of Brancellao grapes from different cluster positions. *Food Chemistry* 132, 112-124.

## O

---

OIV (2014) International Organisation of Vine and Wine. *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis*. Paris, France.





OIV (2019) International Organisation of Vine and Wine. Guide of the OIV for a sustainable vitiviniculture: production, transformation and conditioning of the products.

Olmeda, M. and Bernabéu, R. (2002) Estrategias del sector vinícola en Castilla-La Mancha. Universidad de Castilla-La Mancha.

Orta de Velásquez, M. T., Rojas, N. and Ayala, A. (2008) Wastewater disinfection using ozone to remove free-living, highly pathogenic bacteria and amoebae. *Ozone Science and Engineering* 30, 367–375.

## P

---

Paissoni, M. A., Río-Segade, S., Giacosa, S., Torchio, F., Cravero, F., Englezos, V., Rantsiou, K., Carboni, C., Gerbi, V., Teissedre, P. L. and Rolle, L. (2017) Impact of post-harvest ozone treatments on the skin phenolic extractability of red winegrapes cv Barbera and Nebbiolo (*Vitis vinifera* L.). *Food Research International* 98, 68–78.

Palou, L. L., Smilanick, J. L. and Crisosto, C. H. (2004) Conservación frigorífica de cítricos en atmósferas ozonizadas: efecto sobre las enfermedades de postcosecha. *Levante Agrícola. Especial postcosecha*.

Pardo-García, A. I., Martínez-Gil, A. M., Cadahia, E., Pardo, F., Alonso, G. L. and Salinas, M. R. (2014) Oak extract application to grapevines as a plant biostimulant to increase wine polyphenols. *Food Research International* 55, 150–160.

Pell, E. J. and Dann, M. S. (1991) Multiple stress and plant senescence. Mooney, H.A., Winner, W.E. and Pell, E.J. Eds. *Response of plants to multiple stresses* (Academic Press: San Diego, CA, EE. UU.) pp. 189–204.



- Pereira, G., Gaudillere, J., Pieri, P., Hilbert, G., Maucourt, M. and Deborde, C. (2006) Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 54, 6765-6775.
- Pérez, A. G., Sanz, C., Ríos, J. J., Olías, R. and Olías, J. (1999) Effects of Ozone Treatment on Postharvest Strawberry Quality. *Journal of Agricultura lof Food Chemistry* 47, 1652-1656.
- Pérez-Magariño, S. and González-San José, M. L. (2001) Influence of commercial pectolytic preparations on the composition and storage evolution of Albillo white wines. *International Journal of Food Science and Technology* 36, 789-796.
- Perry, T.O., Santamour, F. S., Stipes, R. J. and Shear, T. (1991) Exploring Alternatives to Tree Injection 17, 217–226.
- Pierron, R. J., Pages, M., Couderc, C., Compant, S., Jacques, A. and Violleau, F. (2015) In vitro and in planta fungicide properties of ozonated water against the esca-associated fungus *Phaeoacremonium aleophilum*. *Scientia Horticulturae* 189, 184–191.
- Piggott, J. R. and Findlay, A. J. F. (1984) Detection thresholds of ester mixtures. In *Proceedings of the Alko Symposium on Flavour Research of Alcoholic Beverages*. Helsinki 1984 (L. Nykanen and P. Lehtonen Eds.). *Foundation Biotech. Indust. Ferm.* 3, 189–197.
- Piñeiro, Z., Natera, R., Castro, R., Palma, M., Puertas, B. and Barroso, C. G. (2006) Characterisation of volatile fraction of monovarietal wines: influence of winemaking practices. *Analytica Chimica Acta* 563, 165–172.
- Puertas, B., Jiménez-Hierro, M. J., Cantos-Villar, E., Marrufo-Curtido, A., Carbú, M., Cuevas, F. J., Moreno-Rojas, J. M., González-Rodríguez, V.E., Cantoral, J. M. and Ruiz-Moreno, M. J. (2018)



The influence of yeast on chemical composition and sensory properties of dry white wines. *Food Chemistry* 253, 227–235.

Puissant, A. and Léon, H. (1967) La matière colorante des grains de raisins de certains cépages cultivés en Anjou en 1965. *Annales de Technologie Agricole* 16, 217–225.

Puttamuk, T., Zhang, S., Duan, Y., Jantasorn, A. and Thaveechai, N. (2014) Effect of chemical treatments on “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” infected pomelo (*Citrus maxima*). *Crop Protect* 65, 114–121.

## Q

---

## R

---

Raio, A., Feliciani, A., Ferri, V. and Carboni, C. (2016) Integrated vineyard management trials using ozonated and electrolized water. *Infowine: Internet Journal of Enology and Viticulture* 2(6), 1–6.

Ribéreau-Gayon, J., Peynaud, E., Sudraud, P. and RibéreauGayon, P. (1982) *Analyse et contrôle des vins. Traité d'oenologie, Sciences et techniques du vin. Tome I* (Dunod: Paris, France).

Ribéreau-Gayon, P. (1964) *Les composés phénoliques du raisin et de vin*. Institut National de la Recherche Agronomique.

Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. and Dubourdiou, D. (2006) *Handbook of enology, vol 2. The chemistry of wine, stabilization and treatments*. Chichester: John Wiley and Sons, Ltd.

Río Segade, S., Paissoni, M. A., Giacosa, S., Bautista-Ortín, M. B., Gómez-Plaza, E., Gerbi, V. and Rolle, L. (2019) *Winegrapes*



dehydration under ozone-enriched atmosphere: influence on Berry skin phenols release, cell wall composition and mechanical properties. *Food Chemistry* 271, 673–684.

Rodriguez, F. J. (2003) Procesos de potabilización del agua e influencia del tratamiento de ozonización. Díaz de Santos Eds.

Roach, W. A. (1939) Plant injection as a physiological method. *Annals of Botany* 3, 155–226.

Rosillo, L., Salinas, M. R., Garijo, J. and Alonso, G. L. (1999) Study of volatiles in grapes by dynamic headspace analysis. Application to the differentiation of some *Vitis vinifera* varieties. *Journal of Chromatography A* 847, 155–159.

Rubio-Bretón, P., Salinas, M. R., Nevares, I., Pérez-Álvarez, E. P., Del Álamo-Sanza, M., Marín-San Román, S., Alonso, G. L. and Garde-Cerdán, T. (2019) Recent Advances in the Study of Grape and Wine Volatile Composition: Varietal, Fermentative, and Aging Aroma Compounds. *Food Aroma Evolution*, 439–463.

Ryan, J. M. and Revilla, E. (2003) Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 3372–3378.

## S

---

Sabon, I., De Revel, G., Kotseridis, Y. and Bertrand, A. (2002) Determination of volatile compounds in Grenache wines in relation with different terroirs in the Rhone Valley. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6341–6345.

Saint-Cricq de Gaulejac, N., Vivas, N. and Glories, Y. (1998) Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue Française d'Oenologie* 173, 22–25.



- Sala, C., Busto, O., Guasch, J. and Zamora, F. (2004) Influence of vine training and sunlight exposure on the 3-alkyl-2-methoxypyrazines content in musts and wines from the *Vitis vinifera* variety Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3492–3497.
- Salinas, M. R. (2006) Aroma y color del vino. I Jornadas de actualización en Enología. Universidad de Murcia.
- Salinas, M. R. (2013) Potencial aromático de la uva. Jornadas interregionales de Innovación e Investigación Vitivinícola, Cuenca. Cooperativas Agroalimentarias de Castilla-La Mancha.
- Salinas, M. R. and De La Hoz, K. S. (2012a). Análisis de los precursores aromáticos glicosídicos de uvas y mostos de variedades tintas mediante la determinación de la glucosa liberada por hidrólisis ácida. Encuentros técnicos: Fundación para la cultura del vino, Madrid.
- Salinas, M. R., Serrano de la Hoz, K., Zalacain, A., Lara, J. F. and Garde-Cerdán, T. (2012b) Analysis of red grape glycosidic aroma precursors by glycosyl glucose quantification. *Talanta* 89, 396–400.
- Sánchez-Gómez, R., Garde-Cerdán, T., Zalacain, A., García, R., Cabrita, M. J. and Salinas, M. R. (2016) 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., Díaz-Maroto Hidalgo, M. C., González-Viñas, M. A. and Pérez-Coello, M. S. (2005) Aroma enhancement in wines from different grape varieties using exogenous glycosidases. *Food Chemistry* 92, 627-635.
- Sarni-Manchado, P. and Cheymier, V. (2006) Structures phénoliques et arômes. In *Polyphénols en agro-alimentaire*, 55-88.



- Sefton, M. A., Francis, I. L. and Williams, P. J. (1990) Volatile norisoprenoid compounds as constituents of oak woods used in wine and spirit maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38, 2045-2049.
- Serrano de la Hoz, K., Carmona, M., Zalacain, A., Alonso, G. L. and Salinas, M. R. (2014) The varietal aroma potential index (IPAv): a tool to evaluate the quality of grapes and wines, white and red. 37th World congress of vine and wine; 9–14 November 2014; Mendoza, Argentina (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin: Paris, France) p. 529.
- Serrano de la Hoz, K., Campayo, A., García-Martínez, M., Tolosa, V., Sánchez-Martínez, J. F., Muñoz, R., Alonso, G. L. and Salinas, M. R. (2018) Effect on grape and wine quality of the ozonated water used in vineyards to control wood diseases. First international conference on grape and wine sciences; 7–9 November 2018; Logroño, Spain (Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino: Logroño, Spain).
- Shin, K., Ascunce, M. S., Narouei-Khandan, H. A., Sun, X., Jones, D., Kolawole, O. O., Goss, E. M. and Van Bruggen, A. H. (2016) Effects and side effects of penicillin injection in huanglongbing affected grapefruit trees. *Crop Protect* 90, 106–116.
- Sipiora, M. J. and Gutiérrez Granda, M. J. (1998). Effects of pre-veraison irrigation cutoff and skin contact time on the composition, color, and phenolic content of young Cabernet Sauvignon wines in Spain. *American Journal of Enology and Viticulture* 49, 152-162.
- Stoddard, E. M. and Dimond, A. E (1949) The chemotherapy of plant diseases. *The Botanical Review* XV 6, 345–376.
- Souza, S. (2000) *Vinho: Aprenda a Degustar* (p. 304). Sao Paulo: Market Press.
- Styger, G., Prior, B. and Bauer, F. F. (2011) Wine flavor and aroma. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 38(9), 1145–1159.



Sudraud, P. (1958) Interpretation of red wines absorption curves. *Annals of Technology Agriculture* 7, 203-208.

## T

---

Tecnoendoterapia (2020). Endoterapia. [Consulta: 01/05/2020]. <http://www.tecnoendoterapia.com/index.php/es>

Tolosa, V., García-Martínez, M., Sánchez-Martínez, J. F., Campayo, A., Serrano de la Hoz, K., Alonso, G. L., Salinas, M. R. and Muñoz, R. (2018) Influence of the ozonated water used in vineyards to control grapevine trunk diseases and effect on the grape and wine quality. 41st World vine and wine congress; 19–23 November 2018; Punta del Este, Uruguay (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin: Paris, France).

Tolosa, V., Lerma, M. L., Castillo, P., Salinas, M. R., Armengol, J. and Muñoz, R. (2019) Characterization of the Fungi Involved with Grapevine Trunk Diseases in Castilla-La Mancha Region, Spain. *Journal of Agricultural Science and Technology A* 9, 329-337.

## U

---

Úrbez-Torres, J. R. (2011) The status of Botryosphaeriaceae species infecting grapevines. *Phytopathologia Mediterranea* 50, S5-S45.

## V

---

Vanzo, A., Cecotti, R., Vrhovsek, U., Torres, A. M., Mattivi, F. and Passamonti, S. (2007) Defate of Trans-cafftaric Acid Administered into the Rat Stomacht. *Journal of Agricultural of Food and Chemistry* 50(4), 1604-1611.



Vilanova, M., Genisheva, Z., Graña, M. and Oliveira, J. M. (2013) Determination of odorants in varietal wines from international grape cultivars (*Vitis vinifera*) grown in NW Spain. *South African Journal for Enology and Viticulture* 34(2), 212-222.

## W

---

Wang, Y., He, L., Pan, Q., Duan, C. and Wang, J. (2018) Effects of basal defoliation on wine aromas: A meta-analysis. *Molecules* 23(4), 779.

## X

---

Xie, S., Lei, Y., Wang, Y., Wang, X., Ren, R. and Zhang, Z. (2019) Influence of continental climates on the volatile profile of Cabernet Sauvignon grapes from five Chinese viticulture regions. *Plant Growth Regulation* 87(4), 83-92.

## Y

---

Yang, Y., Jin, G. J., Wang, X. J., Kong, C. L., Liu, J. B. and Tao, Y. S. (2019) Chemical profiles and aroma contribution of terpene compounds in Meili (*Vitis vinifera* L.) grape and wine. *Food Chemistry* 284, 155-16.

Yang, Z., Zhang, Y., Zhu, W., Zan, X., Zhang, L. and Liu, Y. (2020) Effective oxidative degradation of coal gasification wastewater by ozonation: A process study. *Chemosphere*, 255.

## Z

---

Zamora, F. (2003) *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. Mundi Prensa: Madrid, Spain.





Zhao, X., Procopio, S. and Becker, T. (2015) Flavor impacts of glicerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. *Journal of Food Science and Technology*.





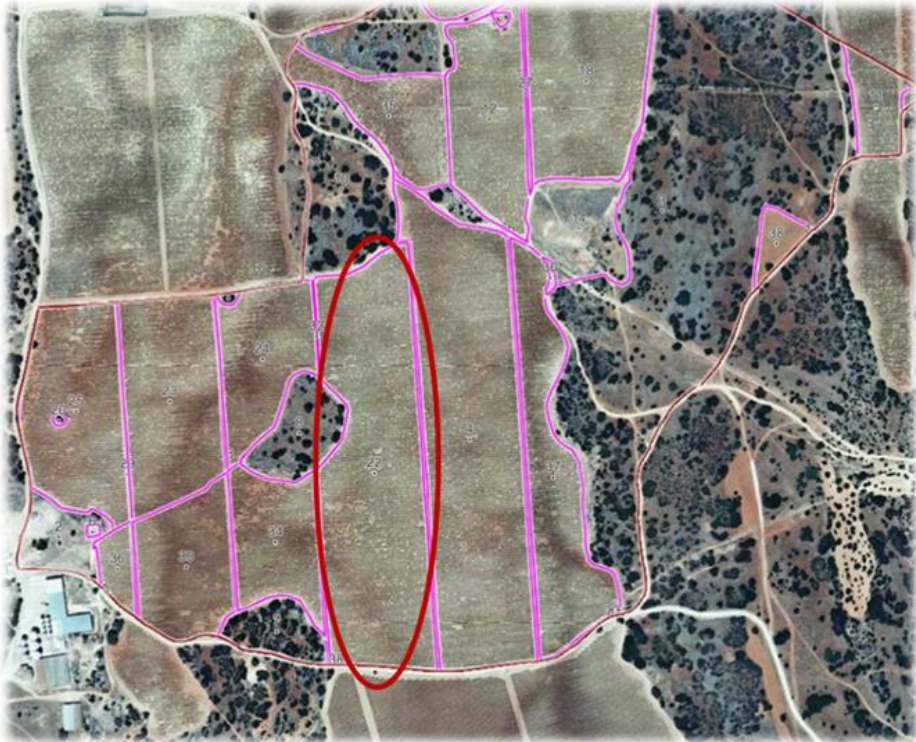
## 9. ANEXO

---





**Figura 1.** Parcela de la variedad Cabernet Sauvignon.



**Figura 2.** Parcela de la variedad Macabeo.





**Figura 3.** Imagen que muestra el marcaje de una cepa sana que va a ser tratada en la variedad Cabernet Sauvignon.



**Figura 4.** Imagen que muestra el marcaje de una cepa sana "control" en la variedad Macabeo.





**Figura 5.** Imagen del código identificativo de una cepa sana que va a ser tratada, de la variedad Cabernet Sauvignon (F: Finca Antigua; C: Cabernet Sauvignon; s: sana; TA: tratamiento aéreo; 05: cepa 5-15).



**Figura 6.** Imagen del código identificativo de una cepa sana "control" de la variedad Cabernet Sauvignon (F: Finca Antigua; C: Cabernet Sauvignon; s: sana; CN: control; 04: cepa 4-15).





**Figura 7.** Imagen que muestra el prototipo de generación de ozono.



**Figura 8.** Imagen del primer tratamiento aéreo realizado sobre cepas de la variedad Cabernet Sauvignon.







**Figura 9.** Detalle de una hoja tras ser pulverizada con la disolución acuosa de ozono.



**Figura 10.** Imagen del segundo tratamiento aéreo realizado sobre cepas de la variedad Macabeo.





**Figura 11.** Imagen de la conexión del prototipo con el sistema de riego.



**Figura 12.** Imagen de la disposición de la tubería principal y los ramales de riego por goteo en la parcela de la variedad Macabeo.





**Figura 13.** Imagen del caudalímetro.



**Figura 14.** Imagen del manómetro para controlar la presión de trabajo.





**Figura 15.** Imagen del tercer tratamiento de riego por goteo con agua ozonizada en Cabernet Sauvignon.



**Figura 16.** Imagen de la microperforación de 1 cm en la planta.





**Figura 17.** Imagen de la colocación de la cánula en la planta.



**Figura 18.** Imagen del adaptador de endoterapia.





**Figura 19.** Imagen del primer tratamiento por endoterapia realizado sobre una cepa de la variedad Cabernet Sauvignon.



**Figura 20.** Imagen del segundo tratamiento por endoterapia realizado sobre una cepa de la variedad Macabeo.



## 10. OTRAS CONTRIBUCIONES

---





## **COMUNICACIONES A CONGRESOS**

1. Congreso Nacional: **XIV Congreso Nacional de Investigación Enológica (GIENOL).**

Autores: *García-Martínez, M. M.*, Sánchez-Martínez, J. F., Campayo, A., Serrano de la Hoz, K., Martínez-Navarro, M. E., Alonso G. L. and Salinas, M. R.

Lugar y fecha: Ciudad Real (España), junio 2018.

Título: **Efecto de la aplicación de agua ozonizada en viñas de Cabernet Sauvignon sobre la calidad de las uvas y de los vinos.**

2. Congreso Internacional: **International Congress on Grapevine and Wine Sciences.**

Autores: Serrano de la Hoz, K., Campayo, A., *García-Martínez, M. M.*, Tolosa, V., Sánchez-Martínez, J. F., Muñoz, R., Alonso G. L. and Salinas, M. R.

Lugar y fecha: Logroño (España), noviembre 2018.

Título: **Effect on grape and wine quality of the ozonated wáter used in vineyards to control Wood diseases.**

3. Congreso Nacional: **XVIII Congreso Nacional de Enólogos y II Encuentro de Enólogos de Iberoamérica.**

Autores: Sánchez-Martínez, J. F., Serrano de la Hoz, K., *García-Martínez, M. M.*, Campayo, A., Alonso G. L. and Salinas, M. R.

Lugar y fecha: Palencia (España), abril 2019.

Título: **La endoterapia como una nueva forma de aplicar agroquímicos en el viñedo. Tratamiento en tempranillo con agua ozonizada.**



4. Congreso Internacional: **Congress Oeno-IVAS.**

Autores: *García-Martínez, M. M.*, Campayo, A., Sánchez-Martínez, J. F., Serrano de la Hoz, K., Alonso G. L. and Salinas, M. R.

Lugar y fecha: Burdeos (Francia), junio 2019.

Título: **The irrigation of Cabernet Sauvignon vines with ozonated water affect the chemical composition of wines.**

**PUBLICACIONES EN REVISTAS NACIONALES**

5. Revista: **Enólogos.**

Autores: Salinas, M. R., Serrano de la Hoz, K., *García-Martínez, M. M.*, Sánchez-Martínez, J. F., Campayo, A., Zalacain, A. and Alonso G. L.

Título: **Influencia de la aplicación de disoluciones acuosas de ozono en viña sobre la calidad de la uva y del vino.**

2017, 110, 46-54. ISSN 1695-7296.

**PUBLICACIONES EN REVISTAS INTERNACIONALES**

6. Revista: **Australian Journal of Grape and Wine Research.**

Autores: *García-Martínez, M. M.*, Campayo, A., Carot J. M., Serrano de la Hoz, K., Salinas, M. R. and Alonso G. L.

Título: **Oenological characteristics of *Vitis vinifera* L. Cabernet Sauvignon grapes from vineyards treated with ozonated water.**

2020, 26(4), 388-398. DOI: 10.1111/ajgw.12454.

7. Revista: **Bajo revisión en revista científica JCR, Q1.**

Autores: *García-Martínez, M. M.*, Campayo, A., Moratalla-López, N., Serrano de la Hoz, K., Alonso G. L. and Salinas, M. R.

Título: **Ozonated water applied in grapevines is a new agronomic practice that affects the chemical quality of wines.**



## **COMUNICACIONES EN JORNADAS DOCTORALES**

8. Jornada Doctoral: **VII Jornadas Doctorales de la UCLM.**

Autores: *García-Martínez, M. M.*, Sánchez-Martínez, J. F., Campayo, A., Serrano de la Hoz, K., Alonso G. L. and Salinas, M. R.

Lugar y fecha: Albacete (España), noviembre 2017.

Título: **Influencia de la aplicación de ozono en viña sobre el potencial aromático de uvas Cabernet Sauvignon y Macabeo.**

9. Jornada Doctoral: **VI Jornadas Doctorales G-9.**

Autores: *García-Martínez, M. M.*, Sánchez-Martínez, J. F., Campayo, A., Serrano de la Hoz, K., Alonso G. L. and Salinas, M. R.

Lugar y fecha: Santander (España), abril 2018.

Título: **Influencia de la aplicación de ozono en viña sobre el potencial aromático de uvas Cabernet Sauvignon y Macabeo.**

10. Jornada Doctoral: **VIII Jornadas Doctorales de la UCLM.**

Autores: *García-Martínez, M. M.*, Sánchez-Martínez, J. F., Campayo, A., Serrano de la Hoz, K., Alonso G. L. and Salinas, M. R.

Lugar y fecha: Cuenca (España), octubre 2018.

Título: **Efecto sobre la calidad de uvas y vinos de la aplicación de agua ozonizada en viñas Cabernet Sauvignon.**

11. Jornada Doctoral: **XI Jornadas Doctorales de la UCLM.**

Autores: *García-Martínez, M. M.*, Sánchez-Martínez, J. F., Campayo, A., Serrano de la Hoz, K., Alonso G. L. and Salinas, M. R.

Lugar y fecha: Ciudad Real (España), noviembre 2019.



**Título: La aplicación de agua ozonizada en viñedos de Macabeo influye en la calidad de los vinos.**





## Efecto de la aplicación de agua ozonizada en viñas de Cabernet Sauvignon sobre la calidad de las uvas y de los vinos



M. GARCÍA-MARTÍNEZ (1), J.F. SÁNCHEZ-MARTÍNEZ (1), A. CAMPAYO (2), K. SERRANO DE LA HOZ (2), M.E. MARTÍNEZ-NAVARRO (1), G.L. ALONSO\* (1), M.R. SALINAS (1).

(1) Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Cátedra de Química Agrícola, Avda. de España s/n, 02071 Alarcón, España.  
(2) BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), Carretera de Las Peñas (CM-3203), Km 3.2, Campo de prácticas, UCLM, 02071 Alarcón, España.

\* Gonzalez.Alonso@uclm.es

### RESUMEN

- El empleo de ozono en el Sector Agroalimentario es cada vez más demandado debido a su importante acción biocida y a su rápida autoconversión en oxígeno, por lo que no deja residuos ni contamina el medioambiente. Por ello, se usa mucho en postcosecha para reducir podredumbres y prolongar el almacenamiento de frutas y verduras.
- El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de diferentes tratamientos con disoluciones acuosas de ozono en cepas de la variedad Cabernet Sauvignon, cultivadas en Castilla-La Mancha a lo largo de las cosechas de 2015, 2016 y 2017, sobre la calidad de la uva y del vino.
- Se usaron diferentes estrategias de aplicación, en la que el ozono fue generado en el propio viñedo. Se consideró tanto el estado fenológico de la vid objeto de los tratamientos, el momento de la aplicación y la parte de la planta tratada (raíces y parte aérea). La vendimia se realizó en el momento óptimo de madurez tecnológica y los vinos fueron elaborados según el sistema tradicional de vinificación en tinto.
- Los tratamientos afectaron a los parámetros enológicos de las uvas y de los vinos de manera diferente según la estrategia de aplicación. Ninguno de los tratamientos influyó en el proceso de fermentación, sin embargo, tuvo lugar una disminución del grado alcohólico de los vinos. El tratamiento conjunto riego y aéreo aumentó la concentración de antocianos totales de las uvas, tanto fácilmente como difícilmente extraíbles. Los tratamientos influyeron en el potencial aromático (IPAv) de las uvas y de los vinos, destacando un importante incremento cuando las aplicaciones se realizaron conjuntamente en la zona aérea y radicular.

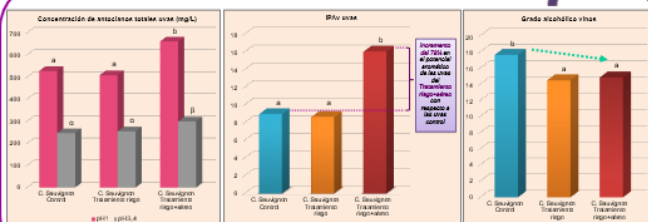
### OBJETIVO

ESTUDIAR EL EFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS CON DISOLUCIONES ACUOSAS DE OZONO EN CEPAS DE LA VARIEDAD CABERNET SAUVIGNON, CULTIVADAS EN CASTILLA-LA MANCHA A LO LARGO DE TRES COSECHAS CONSECUTIVAS, SOBRE LA CALIDAD DE LA UVA Y DEL VINO

### DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN



### RESULTADOS



\* Letras diferentes indican diferencias significativas entre las uvas control y tratamiento.

### CONCLUSIONES

- El tratamiento conjunto de riego y aéreo con agua ozonizada, aumentó la concentración de antocianos totales, tanto fácilmente como difícilmente extraíbles. También aumentó casi el doble el IPAv de las uvas Cabernet Sauvignon.
- Los tratamientos no influyeron en el proceso de fermentación.
- Los tratamientos disminuyeron el grado alcohólico de los vinos.

### AGRADECIMIENTOS



Agradecemos el contrato con cargo al proyecto de investigación INNTER ECOSANVID 2015 (FEDER-CDTI, EXP- 00093467/ITC-20151026), así como la implicación de las empresas del proyecto DCOOP-BAICO, FINCA ANTIGUA, VALCON, NUTRICONTROL y ARTICA+I en este trabajo.





**GIENOL2018**  
XIV CONGRESO NACIONAL DE INVESTIGACION ENOLOGICA  
Castellón de la Plana 2018 (del 26 al 28 de Septiembre)





## EFFECT ON GRAPE AND WINE QUALITY OF THE OZONATED WATER USED IN VINEYARDS TO CONTROL WOOD DISEASES

Serrano de la Hoz, K.<sup>1</sup>; Campayo, A.<sup>1,2</sup>; García-Martínez, M.<sup>2</sup>; Tolosa, V.<sup>2</sup>; Sánchez-Martínez, J.F.<sup>2</sup>; Muñoz, R.<sup>2</sup>; Alonso, G.L.<sup>2</sup>; Salinas, M.R.<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> BetterRiD (Better Research, Innovation and Development S.L.), Ctra. de Las Peñas (CM-3203), Km 3.2, Campo de Prácticas-UCLM 02071, Albalade, Spain  
<sup>2</sup> Cátedra de Química Agrícola, E.T. Agrónomos y Montes, Universidad de Castilla-La Mancha, Avda. de España s/n, 02071, Albalade, Spain  
<sup>3</sup> Servicio de Diagnóstico y Asistencia fitosanitaria (SEDAF), Instituto Tecnológico Agrario Provincial de Albalade (ITAP), Avda. Gregorio Arós s/n, 02006, Albalade, Spain  
 \* Rosario.Salinas@uclm.es

### INTRODUCTION

- Ozone is a powerful oxidant with a high biocidal power and therefore is increasingly used in the vineyard to control the sanitary status of grapevines [1].
- Wood diseases, that are caused by pathogenic fungi, are one of the main problems of vineyards.  
 Ozonated water to combat them? → **INNTER-ECOSANVID 2015 PROJECT**
- For this purpose, from 2015 to 2017, different ozonated water application strategies have been carried out over more than 1700 vines of different varieties of white and red cultivars from Castilla-La Mancha Spanish region, which had different degrees of development of the disease.
- The effect of ozonated water applied to grapevines on grape and wine quality is still unknown and therefore its evaluation has been another main objective of this project [2].


### OBJECTIVES

To evaluate the effect of OZONATED WATER applied to grapevines on:


- THE VISUAL SYMPTOMS OF WOOD DISEASES
- GRAPE AND WINE QUALITY

### MATERIALS AND METHODS (2015-2018)


**1 FORMATION OF THE CONSORTIUM**  
 INNTER-ECOSANVID 2015  
 PIONEER in evaluating the use of OZONE both on the improvement of the SANITARY STATUS OF VINEYARDS, and on the QUALITY OF GRAPE AND WINES



**2 DESIGN AND DEVELOPMENT OF PROTOTYPES FOR OZONATED WATER TREATMENTS**




**3 SELECTION OF PLOTS, VISUAL EVALUATION OF HEALTH STATUS AND LABELLING OF GRAPEVINES**



Tempranillo, Bobal, Cabernet Sauvignon, Alón, Maccabeo


Initial stage (0-25% of symptoms), Medium stage (25-50% of symptoms), Advanced stage (50-75% of symptoms), WITHOUT DISEASE (0% of symptoms)

**4 OZONATED WATER TREATMENTS**



SPRAYING, IRRIGATION, ENDOTHERAPY, COMBINED


**5 VISUAL EVALUATION OF HEALTH STATUS**



**6 GRAPE QUALITY ANALYSIS**

- Ecological parameters
- Phenolic composition
- Aroma composition

**7 WINEMAKING**

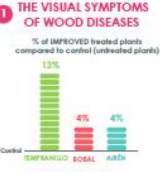


**8 WINE QUALITY ANALYSIS**

- Ecological parameters
- Phenolic composition
- Aroma composition

### RESULTS


**1 THE VISUAL SYMPTOMS OF WOOD DISEASES**




More than 80% of the treated affected plants showed similar appearance to the healthy plants

**2 GRAPE AND WINE QUALITY** (extract of the results of red varieties)

GRAPE



WINE



For each parameter, different letters indicate significant differences among treatments and control grapes or wines (p < 0.05).  
 C: control (grapes or wines from healthy untreated grapevines); S: spraying; I: irrigation; HI: irrigation + spraying; E: endotherapy; EI: endotherapy + irrigation; SI: spraying (I) applications, lower dose; I-I: irrigation; HI-HI: irrigation + spraying; E-E: endotherapy; EI-EI: endotherapy + irrigation

### CONCLUSIONS

THE OZONATED WATER TREATMENTS:

- improved the visual appearance of plants affected by wood diseases.
- did not modify the development of the alcoholic fermentation, but affected the phenolic and aromatic content of the grapes and wines in a different way depending on the application strategy and the variety of grapes.

Based on this project experiences, some commercial systems have been launched, using ozonated water technology.

#### REFERENCES

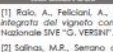


[1] Rallo, A., Feliciano, A., Ferr, V., Carboni, C. (2015). Provea di difesa integrata del vigneto con acque ozonizzate ed elettrostatica. Premio Nazionale SVE "G. VERRINI".

[2] Salinas, M.R., Serrano de la Hoz, K., García-Martínez, M., Sánchez-Martínez, J.F., Campayo, A., Tolosa, V., Alonso, G.L. (2017). *Enólogos*, 91.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank the companies of the INNTER-ECOSANVID 2015 project (PROFR-CO), EXP: 00093487 / IIC-20151026), DCOOP-SAGO, FINCA ANTIGUA, VALCON and NUTRICONTROL, for their involvement in this work.

A. Campayo to her predoctoral contract granted by the Castilla-La Mancha Regional Government (JCCM) and cofinanced by the European Social Fund, the Youth Employment Initiative and the JCCM in the framework of Operational Programme for Youth Employment 2014-2020.

284

**3**



## LA ENDOTERAPIA COMO UNA NUEVA FORMA DE APLICAR AGROQUÍMICOS EN EL VIÑEDO.

### TRATAMIENTO EN TEMPRANILLO CON AGUA OZONIZADA




Sánchez-Martínez, J.F. (1), Serrano De La Hoz, K. (2), García-Martínez, M. (1), Campayo, A. (1, 2), Alonso, G.L. (1), Salinas, M.R. (1).  
 (1) Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S. de Ingenieros Agrónomos y de Montes, Avda. España s/n. 02071, Albacete.  
 (2) BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), Crta. Las Peñas, Km 3.2, Campo de prácticas-UCLM, 02071 Albacete.  
**kortes.serrano@betterrid.es**

### ANTECEDENTES

- La endoterapia es una técnica utilizada para tratamientos fitosanitarios en leñosos pero que no se ha adaptado a la viticultura.
- Consiste en la inyección de agroquímicos directamente en el sistema vascular de la planta.
- Asimismo, el ozono es un poderoso oxidante de acción inmediata que no produce residuos debido a su rápida transformación en oxígeno.
- Recientemente se ha demostrado que sus disoluciones acuosas recuperan vides afectadas por el decaimiento atribuido a las enfermedades de la madera.

### OBJETIVO

**DESARROLLAR UNA METODOLOGÍA PARA LA APLICACIÓN DE AGROQUÍMICOS EN EL VIÑEDO MEDIANTE ENDOTERAPIA Y EVALUAR EL EFECTO DEL TRATAMIENTO CON AGUA OZONIZADA SOBRE LA CALIDAD DE UVAS DE LA VARIEDAD TEMPRANILLO**



#### 1. CEPAS MUERTAS

  
DETERMINACIÓN DE LA PROFUNDIDAD DE INYECCIÓN

  
DESARROLLO DE CANÚLA ESPECIAL TRANSLOCACIÓN PARA LA VID

  
ESTUDIO DE LA TRANSLOCACIÓN EN LA PLANTA

  
OPTIMIZACIÓN DE PARÁMETROS DE OPERACIÓN

#### 2. CEPAS VIVAS



SEGUIMIENTO DE MADURACIÓN  
PUNTO ÓPTIMO DE MADUREZ TECNOLÓGICA

#### VENDIMIA



ANÁLISIS CALIDAD  
PARÁMETROS GENERALES  
MADUREZ FENÓLICA  
MADUREZ AROMÁTICA

#### 3. TRATAMIENTOS CON AGUA OZONIZADA EN ELVIÑEDO

  
ALAMEDA DE CERVERA (CIUDAD REAL)

  
TRATAMIENTOS EN 15 CEPAS  
OZONO GENERADO IN SITU

#### CALIDAD DE LA UVA



↓ IPT  
IPAv

↑ MADUREZ  
PEPITA

#### SISTEMA DE TRATAMIENTO POR ENDOTERAPIA EN EL VIÑEDO



EQUIPO AUTÓNOMO Y MÓVIL

AHORRO DE PRODUCTOS

TRATAMIENTO SOSTENIBLE PARA EL MEDIO AMBIENTE 

#### RESULTADOS



### CONCLUSIÓN

**LA METODOLOGÍA DE ENDOTERAPIA DESARROLLADA EN VIÑEDO SUPONE UNA INTERESANTE ALTERNATIVA A LA APLICACIÓN DE AGROQUÍMICOS, COMO EL AGUA OZONIZADA EN DISOLUCIÓN ACUOSA.**



AGRADECIMIENTOS: A la financiación recibida en el proyecto INNTER ECOSANVID 2015 (FEDER-CDTI, EXP: 00093497/ITC-20151026) en el marco INNTERCONECTA-CDTI.

XVIII CONGRESO NACIONAL DE ENOLOGOS  
Albacete, 4-6 de Julio 2015

285

4



## The irrigation of Cabernet Sauvignon vines with ozonated water affect the chemical composition of wines



<sup>1</sup>García-Martínez, M.; <sup>1,2</sup>Campayo, A.; <sup>1</sup>Sánchez-Martínez, J.F.; <sup>2</sup>Serrano de la Hoz, K.; <sup>1</sup>Alonso, G.L.; <sup>1</sup>Salinas, M.R.\*

<sup>1</sup>Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Cátedra de Química Agrícola, Avda. de España s/n, 02071 Albaladejo, Spain.

<sup>2</sup>BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), Carretera de Las Peñas (CM-3203), Km 3.2, Campo de Prácticas-UCLM, 02071 Albaladejo, Spain.

\*Rosario.Salinas@uclm.es

### INTRODUCTION

- The policy of Sustainability implies developing new strategies and practices to reduce the use of pesticides, as they have a negative impact on the environment and human health.
- Among the products that can replace the pesticides used in viticulture, one of the most interesting is:
  - ozone as an aqueous solution, for its proven efficacy in fungal diseases of the vine, and because it can be considered as ecological since it does not generate residues.
- There is a lack of information on the effect of ozonated water on grapes pre-harvest, and therefore, such effect is unknown on the ability of grapes to make wine. One of the possible ways to use ozone in the vineyard is through the irrigation system, which is a simple way of application since irrigation is implemented in most of the vineyards of warmer climate areas.

### OBJECTIVE

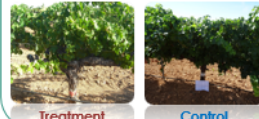
To study the effect of ozonated water applied through the irrigation system on the quality of the wines.

### MATERIALS AND METHODS

**1** Grapes of the Cabernet Sauvignon variety grown in Castilla-La Mancha (Spain) during the harvest of 2016 were used.



**2** 15 vines were used for each treatment and another 15 for the control essay.



**3** Ozonated water treatments:



The ozonated water solution was prepared by a specific prototype which kept the solution always saturated in ozone

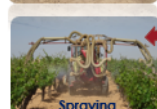
**T1** Irrigation



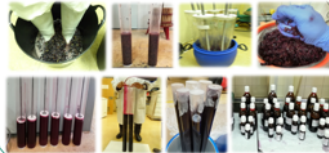
**T2** Combined



Three applications were made in T1 and six applications in T2 (three irrigations and three sprayed)



**4** Wines (control, T1 and T2) were produced in duplicate from harvested grapes at the optimum technological ripening.



**5** Wine quality analysis:

Enological parameters  
Chromatic parameters  
Phenolic compounds  
Free aroma compounds



### RESULTS



For each parameter, different letters indicate significant differences among treatments and control wines. T1: Irrigation; T2: Irrigation + spraying.

### CONCLUSIONS

- Treatments with ozonated water produced a decrease in the alcohol degree and in the fructose and glycerol content.
  - There was an increase in the IPT, the absorbance at 520 nm and in the colour intensity of wines, when the treatment used was T2 and a decrease with T1.
  - An important increase of the anthocyanins was observed in the wines from T2.
  - Both treatments increased the content of free volatiles. The IPA<sub>v</sub> was lowest in wines from treatments, such suggesting a more important release of aglycones in such wines.
- Therefore, treatments with ozonated water where the application is made combining irrigation and spraying, not only would have an effect on the health of the vines, but could also produce wines with lower alcohol content, better colour and a differentiated aromatic profile.

### ACKNOWLEDGEMENTS

Thanks to the Project INNTER ECOSANVID 2015 (FEDER-CDTI, EXP: 00093497/ITC-20151026), financed by the Spanish companies DCOOP-BADO, FINCA ANTIGUA, VIALCON and NUTRICONTROL of Spain.



11th symposium of Enology OEno2019 and the 11th edition of In Vino Analytica Scientia IVAS 2019

25-28 June 2019; University of Bordeaux, Bordeaux, France





## ORIGINAL

## Influencia de la aplicación de disoluciones acuosas de ozono en viña sobre la calidad de la uva y del vino

Salinas, M.R.\*<sup>1</sup>, Serrano de la Hoz, K.<sup>2</sup>, García-Martínez, M.<sup>1</sup>, Sánchez-Martínez, J.F.<sup>1</sup>, Campayo, A.<sup>2</sup>, Zalacain, A.<sup>2</sup>, Alonso G.L.<sup>1</sup>

(1) Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Cátedra de Química Agrícola, Avda. de España s/n, 02071 Albacete. \*Rosario.Salinas@uclm.es

(2) BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), Carretera de Las Peñas (CM-3203), Km 3.2, Campo de prácticas - UCLM, 02071, Albacete.

Recibido 22 de julio de 2017 / Aceptado 14 de septiembre de 2017 / Publicado 1 de noviembre de 2017

## RESUMEN

Los resultados que se muestran son un pequeño avance del efecto de la aplicación de disoluciones acuosas de ozono en viña sobre la calidad de la uva y de sus vinos. Resultan del proyecto INNTER ECOSANVID 2015, cuya principal finalidad es impulsar una nueva estrategia ecológica para mejorar el estado sanitario de las viñas, con especial atención en las enfermedades de madera. Los resultados en relación con la sanidad no serán difundidos hasta finalizar el proyecto, aunque cabe señalar que el estado sanitario de la vid se vio notablemente mejorado por los tratamientos, y que incluso se han recuperado plantas clasificadas con afección extrema de enfermedades de la madera. Además, como han puesto de manifiesto los resultados que se exponen en este trabajo, podemos afirmar que los tratamientos realizados con disoluciones acuosas de ozono no influyen en los parámetros enológicos clásicos de uvas ni de sus vinos. Sin embargo, se observa un incremento importante en determinados polifenoles y aromas varietales, en especial de los que están implicados en una mejor calidad del vino, que es dependiente de la variedad de uva, de la añada y del tipo de tratamiento. Todo ello sugiere que el empleo de ozono no sólo puede ser eficaz para mejorar el estado sanitario del viñedo, sino que también mejoraría la calidad de las uvas y de los vinos.

## INTRODUCCIÓN

En este trabajo se presentan algunos resultados obtenidos sobre el efecto en la calidad de la uva de la aplicación en viñas de disoluciones acuosas de ozono, fruto del proyecto titulado "Intervención ecológica para mejorar el estado sanitario de las viñas y su efecto en la calidad de las uvas y sus vinos", perteneciente al Programa FEDER INNTERCONECTA (CDTI, EXP: 00093497/ITC-20151026), que se está desarrollando

desde julio de 2015 y que finalizará en 2017.

Dicho proyecto es financiado por el consorcio interregional de empresas formado por DCOOP-BACO (coordinador), FINCA ANTIGUA, VIALCON Y NUTRICON-TROL, y cuenta con el apoyo científico-técnico de los grupos de investigación de la Cátedra de Química Agrícola de la E.T.S.I. Agrónomos y Montes de Albacete (Universidad de Castilla-La Mancha, UCLM), del Servicio de Diagnóstico y Asistencia Fitosanitaria del Instituto Técnico Agronómico Provincial de la Diputación de Albacete (ITAP), y con la empresa BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), spin-off de la UCLM.

Tiene como objetivo impulsar una nueva estrategia ecológica que mejore el estado sanitario de las viñas, con especial atención en las enfermedades de madera. Dicha estrategia se basa en la construcción de diferentes prototipos de aplicación de disoluciones acuosas de ozono, evaluando su repercusión en la calidad de las uvas y sus vinos; su acrónimo es INNTER ECOSANVID 2015.

El ozono es una forma natural del oxígeno, y su forma triatómica se genera a partir de tres moléculas de oxígeno mediante una reacción endotérmica y no espontánea en condiciones estándar. Es parcialmente soluble en agua, y cómo ocurre con la mayoría de los gases, aumenta su solubilidad si disminuye la temperatura. Las fuerzas de atracción entre los tres átomos de oxígeno son muy pequeñas, por lo que es muy inestable. Tiene un elevado potencial redox que lo hace un poderoso oxidante químico, de ahí su potente acción germicida y su rápida descomposición en oxígeno. Su principal característica es que se consume inmediatamente en el proceso y no deja residuos tóxicos, propiedad única del ozono denominada autodescomposición (Langlais et al., 1991). Su corta vida media no permite su almacenamiento y distribución como cual-





## Oenological characteristics of *Vitis vinifera* L. Cabernet Sauvignon grapes from vineyards treated with ozonated water

M.M. GARCÍA-MARTÍNEZ<sup>1</sup>, A. CAMPAYO<sup>1,2</sup>, J.M. CAROT<sup>3</sup>, K. SERRANO DE LA HOZ<sup>2</sup>, M.R. SALINAS<sup>1</sup> and G.L. ALONSO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos y Montes, Universidad de Castilla-La Mancha, Albacete 02071, Spain;

<sup>2</sup> BetterRID (Better Research, Innovation and Development), Albacete 02071, Spain; <sup>3</sup> Departamento de Estadística

Aplicada e Investigación y Calidad de Operaciones, Universidad Politécnica de Valencia, Valencia 46022, Spain

Corresponding author: Professor M. Rosario Salinas, email rosario.salinas@uclm.es

### Abstract

**Background and Aims:** Ozonated water has been used in vineyards to reduce the use of pesticides because of its presumed efficacy in the control of fungal diseases and the absence of residues. The aim of this study was to evaluate the effect of ozonated water treatments on the composition of grapes.

**Methods and Results:** Ozonated water was applied to grapevines of *Vitis vinifera* cv. Cabernet Sauvignon throughout the season. Several application strategies were used, namely, spraying, irrigation, irrigation combined with spraying, endotherapy and endotherapy combined with spraying. The effect of the treatments varied with the season and also with the application strategy.

**Conclusions:** The combination of irrigation and spraying of ozonated water produced a significant increase in the colour of grapes and an improved phenolic concentration and aromatic potential. Endotherapy and irrigation had a negative effect on grape composition; however, grape composition improved significantly when these strategies were combined with spraying.

**Significance of the Study:** Ozonated water treatments in vineyards can improve the colour, phenolic concentration and aromatic potential of grapes while at the same time reducing the use of phytochemicals.

**Keywords:** colour, endotherapy, irrigation, phenolic substances, spraying, volatile



**Ozonated water applied in grapevines is a new agronomic practice that affects the chemical quality of wines**

M. Mercedes García-Martínez<sup>a</sup>, Ana Campayo<sup>a,b</sup>, Natalia Moratalla-López<sup>a</sup>, Kortés Serrano de la Hoz<sup>b</sup>, Gonzalo L. Alonso<sup>a</sup>, M. Rosario Salinas<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Universidad de Castilla-La Mancha, E.T.S.I. Agrónomos y Montes, Cátedra de Química Agrícola, Avda. de España s/n, 02071 Albacete, Spain.

<sup>b</sup>BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), Carretera de Las Peñas (CM-3203), Km 3.2, Campo de Prácticas-UCLM, 02071 Albacete, Spain.

\*Corresponding Author: (Tel:+34967599210, Fax:+34967599238, e-mail: [Rosario.Salinas@uclm.es](mailto:Rosario.Salinas@uclm.es)).

**ABSTRACT**

The application of ozonated water in vineyards is recently used to control vine diseases but there are not enough studies on its influence on wine quality. The objective of this work was to evaluate the effect that different ozonated water treatments had on the chemical composition of Cabernet Sauvignon wines. For two consecutive harvest seasons, four types of treatments were used through different application strategies: irrigation (TI), endotherapy (TE), irrigation and spraying (TIS), and endotherapy and spraying (TES). All the treatments decreased the alcoholic degree (7.3%) and the contents of glycerol (11.5%) and ethyl acetate (26.8%). Wines from TI and TE had the lowest polyphenol content and varietal aroma potential index (IPAv). Moreover, TI produced wines with better volatile composition and TE wines had the highest total esters. On the other hand, TIS and TES increased the total polyphenolic compounds in wines by 26.2% and 6.5%, respectively. In short, treatments with ozonated water can be managed at the discretion of the winegrower in order to provide wines of differentiated chemical quality.

**Keywords:** Ozonated water; Cabernet Sauvignon; Colour; Phenolics; Volatiles; Wines.





## Influencia de la aplicación de ozono en viña sobre el potencial aromático de uvas Cabernet Sauvignon y Macabeo



M. GARCÍA-MARTÍNEZ\* [1], J.F. SÁNCHEZ-MARTÍNEZ [1], A. CAMPAYO [2], K. SERRANO DE LA HOZ [2], G.L. ALONSO [3], M.R. SALINAS [3].

[1] Dpto. Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética. E.T.S.I.A.M. de Albacete, UCLM

[2] BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), spin-off, UCLM

\* [MariaMercedes.Garcia@uclm.es](mailto:MariaMercedes.Garcia@uclm.es)

DIRECTORES DE TESIS: M<sup>a</sup> Rosario Salinas Fernández y Gonzalo L. Alonso Díaz-Marta.

### RESUMEN

En la actualidad, se está intentando reducir la aplicación de productos fitosanitarios y se apuesta por la implantación de una estrategia de lucha integral contra enfermedades de la vid, en especial las de madera. El ozono es un biocida que no contamina medioambientalmente y no genera residuos, a diferencia de la mayoría de los productos fitosanitarios actualmente empleados en el viñedo.

En lo que respecta al cultivo de la vid para vinificación, Raio et al. [1], demostraron que los tratamientos con agua ozonizada en hojas y racimos estimularon el sistema inmunitario de la planta y redujeron el impacto del uso de plaguicidas. Los estudios preliminares que se han hecho en viñas indican que los tratamientos con disoluciones acuosas de ozono mejoran el estado sanitario general de la vid, pero no se sabe a qué nivel puede afectar a la calidad de la uva.

Este trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto sobre el potencial aromático de las uvas Cabernet Sauvignon (variedad tinta) y Macabeo (variedad blanca) que han sufrido un tratamiento en las cepas con dicha disolución.

En cada parcela de cada variedad se identificaron plantas con distintos grados de afección sanitaria, en especial de las enfermedades de la madera, y se clasificaron según el avance de dicha enfermedad. Se hicieron diferentes tipos de tratamientos con la disolución de ozono (por riego y combinando riego y aéreo) y se analizó el índice de potencial aromático varietal (IPAV) de las uvas Cabernet Sauvignon y Macabeo en el día de la vendimia.

El IPAV se analizó conforme al método de Serrano de la Hoz et al. [2] y se observó que la aplicación del tratamiento conjunto de riego y aéreo aumentó casi el doble el IPAV de las uvas Cabernet Sauvignon con respecto a las uvas control, aunque por el contrario disminuyó en las uvas Macabeo.

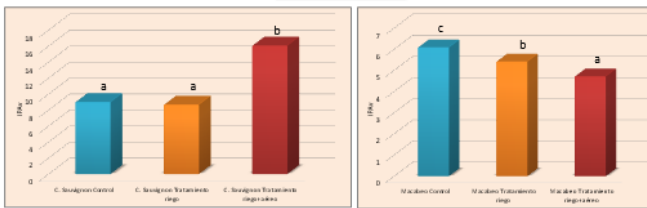
### OBJETIVO

ESTUDIAR EL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE OZONO EN VIÑA SOBRE EL POTENCIAL AROMÁTICO DE LAS UVAS CABERNET SAUVIGNON Y MACABEO.

### DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN



### RESULTADOS



\* Letras diferentes indican diferencias significativas entre las uvas control y tratamiento.

### CONCLUSIONES

> El tratamiento conjunto de riego y aéreo con agua ozonizada, aumentó casi el doble el IPAV de las uvas Cabernet Sauvignon con respecto a las uvas control.

> En las uvas tratadas de la variedad Macabeo, tanto por riego como con el tratamiento conjunto de riego y aéreo, disminuyó el IPAV con respecto a las uvas control.

### REFERENCIAS

- [1] A. Raio, A. Feliciani, V. Fanti, C. Carboni. *Primo di difesa integrato del uliveto con acqua ozonizzata ad elettrolisi*. *Fitopatologia* 2012 "N. VIGNINI" (2012).  
 [2] K. Serrano de la Hoz, R. Carreras, A. Zabala, G.L. Alonso, M.R. Salinas. *The varietal aroma potential index (IPAV): a tool to evaluate the quality of grape and olive*, white and red. 37<sup>th</sup> CIV Congress, (2014).

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el contrato con cargo al proyecto de investigación INHETER ECOSANVID 2015 (FEDER-CDTI, EXP: 00093497/ITE-2015/0205, financiado por las empresas DCOOP-BAJO, FINCA ANTIGUA, VIALCON y NUTRICONTROL).



Premio al mejor Póster en Ciencias





## Influencia de la aplicación de ozono en viña sobre el potencial aromático de uvas Cabernet Sauvignon y Macabeo



M. GARCÍA-MARTÍNEZ\* (1), J.F. SÁNCHEZ-MARTÍNEZ (1), A. CAMPAYO (2), K. SERRANO DE LA HOZ (2), G.L. ALONSO (1), M.R. SALINAS (1).  
 (1) Dpto. Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética. E.T.S.I.A.M. de Albacete, UCLM  
 (2) BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), spin-off, UCLM  
 \* [MariaMercedes.Garcia@uclm.es](mailto:MariaMercedes.Garcia@uclm.es)

DIRECTORES DE TESIS: M<sup>a</sup> Rosario Salinas Fernández y Gonzalo L. Alonso Díaz-Marta.

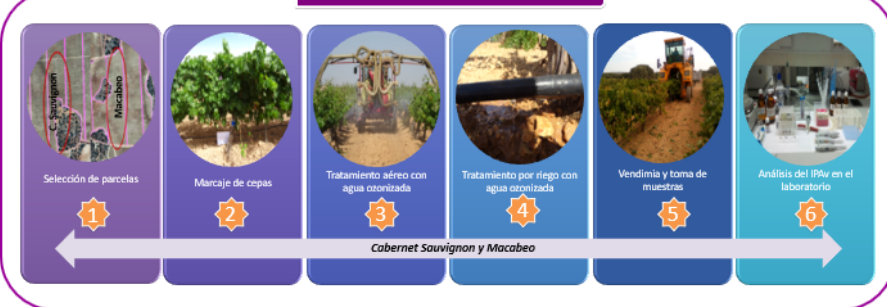
### RESUMEN

- En la actualidad, se está intentando reducir la aplicación de productos fitosanitarios y se apuesta por la implantación de una estrategia de lucha integral contra enfermedades de la vid, en especial las de madera. El ozono es un biocida que no contamina medioambientalmente y no genera residuos, a diferencia de la mayoría de los productos fitosanitarios actualmente empleados en el viñedo.
- En lo que respecta al cultivo de la vid para vinificación, Raio et al. [1], demostraron que los tratamientos con agua ozonizada en hojas y racimos estimularon el sistema inmunitario de la planta y redujeron el impacto del uso de plaguicidas. Los estudios preliminares que se han hecho en viñas indican que los tratamientos con disoluciones acuosas de ozono mejoran el estado sanitario general de la vid, pero no se sabe a qué nivel puede afectar a la calidad de la uva.
- Este trabajo tiene como objetivo estudiar el efecto sobre el potencial aromático de las uvas Cabernet Sauvignon (variedad tinta) y Macabeo (variedad blanca) que han sufrido un tratamiento en las cepas con dicha disolución.
- En cada parcela de cada variedad se identificaron plantas con distintos grados de afección sanitaria, en especial de las enfermedades de la madera, y se clasificaron según el avance de dicha enfermedad. Se hicieron diferentes tipos de tratamientos con la disolución de ozono (por riego y combinando riego y aéreo) y se analizó el Índice de Potencial Aromático varietal (IPAv) de las uvas Cabernet Sauvignon y Macabeo en el día de la vendimia.
- El IPAv se analizó conforme al método de Serrano de la Hoz et al. [2] y se observó que la aplicación del tratamiento conjunto de riego y aéreo aumentó casi el doble el IPAv de las uvas Cabernet Sauvignon con respecto a las uvas control, aunque por el contrario disminuyó en las uvas Macabeo.

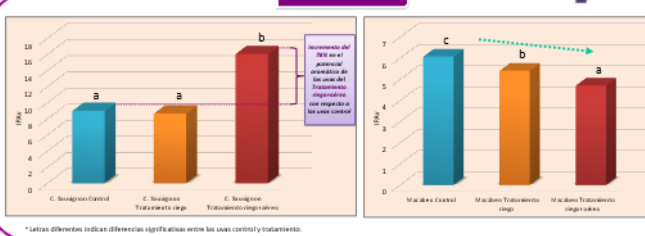
### OBJETIVO

ESTUDIAR EL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE OZONO EN VIÑA SOBRE EL POTENCIAL AROMÁTICO VARIETAL (IPAv) DE LAS UVAS CABERNET SAUVIGNON Y MACABEO.

### DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN



### RESULTADOS



### CONCLUSIONES

- El tratamiento conjunto de riego y aéreo con agua ozonizada, aumentó casi el doble el IPAv de las uvas Cabernet Sauvignon con respecto a las uvas control.
- En las uvas tratadas de la variedad Macabeo, tanto por riego como con el tratamiento conjunto de riego y aéreo, disminuyó el IPAv con respecto a las uvas control.

### REFERENCIAS

- [1] A. Baiš, A. Feliciari, V. Fanti, C. Carboni. *Prove di difesa integrata del vigneto con acqua ozonizzata ed elettrolizzata*. Prevezza Nazionale 2015 "OZONIZING" (2015).  
 [2] K. Serrano de la Hoz, M. Carrasco, A. Zubacáiz, G.L. Alonso, M.R. Salinas. *The varietal aroma potential index (IPAv): a tool to evaluate the quality of grape and wines, while not real 3<sup>rd</sup> OIV Congress* (2014).

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el contrato con cargo al proyecto de investigación INHER ECOSANVID 2015 (FEDER-CDTI, EXP: 00093497/ITC 2015/2026, financiado por las empresas DCOOP-BAJO, FIVCA, ANTIQUA, VIALCON y NUTRICONTROL).

VI Jornadas Doctorales G-9. Abril de 2018, Santander

Premio al mejor Póster en Ciencias por parte del Jurado y Accésit Doctorandos al mejor Póster en Ciencias





## Efecto sobre la calidad de uvas y vinos de la aplicación de agua ozonizada en viñas Cabernet Sauvignon



M. GARCÍA-MARTÍNEZ<sup>1</sup> (1), J.F. SÁNCHEZ-MARTÍNEZ (1), A. CAMPAYO (2), K. SERRANO DE LA HOZ (2), G.L. ALONSO (1), M.R. SALINAS (1).

(1) Dpto. Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética, E.T.S.I.A.M. de Albacete, UCLM

(2) BetterRiD (Better Research, Innovation and Development, S.L.), spin-off, UCLM

\* MariaMercedes.Garcia@uclm.es

DIRECTORES DE TESIS: M<sup>a</sup> Rosario Salinas Fernández y Gonzalo L. Alonso Díaz-Marta.

### ANTECEDENTES

El empleo de ozono en el Sector Agroalimentario es cada vez más demandado debido a su importante acción biocida, por ello se usa mucho en postcosecha para reducir podredumbres y prolongar el almacenamiento de frutas y verduras.

El ozono es un poderoso oxidante químico que actúa rápidamente sin dejar residuos tóxicos, por lo que constituye un interesante plaguicida que podría permitir la reducción de otros fitoquímicos y por tanto de sus residuos [1].

En los últimos años ha sido probado contra diferentes enfermedades de los cultivos, entre las cuales, en la vid, las denominadas enfermedades de la madera tienen un gran protagonismo. Se ha observado que los tratamientos con agua ozonizada en hojas y racimos de vid pueden estimular el sistema inmunitario de la planta y reducir el impacto del uso de plaguicidas [2] pero no se han encontrado estudios que traten de su efecto en la calidad de la uva de vinificación ni en los vinos resultantes.



### OBJETIVO

ESTUDIAR EL EFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS CON DISOLUCIONES ACUOSAS DE OZONO EN CEPAS DE LA VARIEDAD CABERNET SAUVIGNON A LO LARGO DE LAS COSECHAS DE 2015, 2016 Y 2017, SOBRE LA CALIDAD DE LA UVA Y DEL VINO

#### 1. Selección de la parcela



#### DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3. Análisis de la calidad de las uvas



#### 2. Aplicación de la disolución acuosa de ozono, empleando diferentes estrategias



Generación y aplicación del ozono in-situ

#### 4. Vinificaciones



#### 1º Año (Tratamiento aéreo)



#### 2º Año (Tratamiento riego y riego + aéreo)



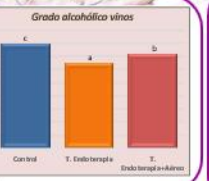
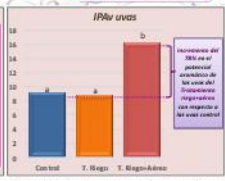
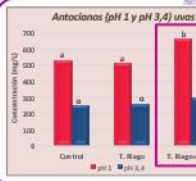
#### 3º Año (Tratamiento endoterapia y endoterapia + aéreo)



#### 5. Análisis de la calidad de los vinos



### RESULTADOS



### CONCLUSIONES

El tratamiento conjunto de riego y aéreo con agua ozonizada, aumentó casi el doble el IPAv de las uvas, la concentración de antocianos totales y mejoró la extractabilidad antocianica con respecto a las uvas control.

Ninguno de los tratamientos influyó en el proceso de fermentación, sin embargo, todos los tratamientos disminuyeron el grado alcohólico de los vinos.

### REFERENCIAS

[1] M.R. Salinas, K. Serrano de la Hoz, M. García-Martínez, J.F. Sánchez-Martínez, A. Campayo, A. Tudaría, G.L. Alonso. Influencia de la aplicación de absolesos acuosa de ozono en vitro sobre la calidad de la uva y del vino. *Enología*, *Peridosis* asociada, 119 (2017), 40-54.

[2] A. Rial, A. Párriz, V. Fan, C. Cabreit. *Prove de difusa integrada del sistema con agua ozonizada en el cultivo de la vid*. *Peridosis* *Nutrición* *STVE* "C. VINO" (2015).

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el contrato con cargo al proyecto de investigación ININTER ECOSANVID 2015 (FEDER-CDTA, EXP. 00093497/ITC-20151026, financiado por las empresas DCOOP-BACO, FINCA ANTIGUA, VIALCON y NUTRICONTROL).



VIII Jornadas Doctorales de la UCLM. Octubre de 2018, Cuenca



## La aplicación de agua ozonizada en viñedos de Macabeo influye en la calidad de los vinos

M. GARCÍA-MARTÍNEZ\* (1), J.F. SÁNCHEZ-MARTÍNEZ (1), A. CAMPAYO (1, 2), K. SERRANO DE LA HOZ (2), G.L. ALONSO (1), M.R. SALINAS (1).

(1) Dpto. Ciencia y Tecnología Agroforestal y Genética, E.T.S.I.A.M. de Alabaete, UCLM

(2) BetterRID (Better Research, Innovation and Development, S.L.), spin-off, UCLM

\* [MaríaMercedes.Garcia@uclm.es](mailto:MaríaMercedes.Garcia@uclm.es)

DIRECTORES DE TESIS: M<sup>a</sup> Rosario Salinas Fernández y Gonzalo L. Alonso Díaz-Marta.

### INTRODUCCIÓN

- El empleo de ozono en el Sector Agroalimentario es cada vez más demandado debido a su importante acción biocida por ello se usa mucho en postosecha para reducir podredumbres y prolongar el almacenamiento de frutas y verduras.
- Entre los productos que pueden reemplazar los pesticidas utilizados en viticultura, uno de los más interesantes es: **el ozono en disolución acuosa**, por su eficacia probada en enfermedades fúngicas de la vid y porque puede considerarse ecológico ya que no genera residuos.
- En diversos trabajos se ha observado que los tratamientos con agua ozonizada en hojas y racimos de vid pueden estimular el sistema inmunitario de la planta, pero no se han encontrado estudios que traten de su efecto en la composición química de los vinos.

### OBJETIVO

Estudiar el efecto de la aplicación de una disolución acuosa de ozono en la calidad de los vinos a lo largo de las cosechas de 2016 y 2017.

### DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

- El estudio se hizo en uvas de la variedad Macabeo, cultivadas en Castilla-La Mancha a lo largo de las cosechas de 2016 y 2017.
 
- Se usaron 15 cepas para cada tratamiento y otras 15 como control.
 
- Tratamientos con agua ozonizada: La disolución acuosa de ozono fue preparada con un prototipo específico, que mantuvo la disolución siempre saturada en ozono.
 
- Con las uvas cosechadas en el momento óptimo de vendimia, se elaboraron los vinos (control, T1, T2, T3 y T4) por duplicado.
 
- Análisis de la calidad de los vinos:
  - Parámetros enológicos clásicos
  - Parámetros cromáticos
  - Compuestos fenólicos
  - Compuestos aromáticos
  - Índice de potencial aromático varietal (IPAv)

T1: Riego; T2: Combinado; T3: Endoterapia; T4: Combinado. Riego + Aéreo; Endoterapia + Aéreo.

### RESULTADOS



Para cada parámetro y cosecha, diferentes letras indican diferencias significativas entre los vinos tratamiento y control. C1, C2: control cosecha 2016 y 2017 respectivamente; T1: riego; T2: riego+aéreo; T3: endoterapia; T4: endoterapia+aéreo.

### CONCLUSIONES

- Los tratamientos afectaron a la calidad de los vinos de manera diferente según la estrategia de aplicación.
  - Ninguno de los tratamientos influyó en el proceso de fermentación, sin embargo, tuvo lugar una disminución del grado alcohólico de los vinos a excepción de los vinos del tratamiento T1.
  - El tratamiento T4 aumentó el índice de polifenoles totales (IPT) y disminuyó los tonos amarillos de los vinos, lo que implica una mejora del color.
- Por lo tanto, los tratamientos con agua ozonizada pueden ser manejados a criterio del viticultor, para que además del buscado efecto sanitario, puedan dar lugar a vinos de una calidad diferenciada.

### REFERENCIAS

T1, M.R. Salinas, K. Serrano de la Hoz, M. García-Martínez, J.F. Sánchez-Martínez, A. Campayo, A. Tejada, G.L. Alonso. Influencia de la aplicación de disoluciones acuosa de ozono en viticultura en la calidad de la uva y del vino. *Industria Agrícola* 110 (2017), 64-68.

T2, A. Roca, A. Melón, V. Peri, C. Salazar. Riego al olivo integrado del viñedo con agua ozonizada en Almería. *Actas Horticultura 2012* (2012), 119-120.

### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos el contrato con cargo al proyecto de investigación INITEC ECOAGRIVIDA 2015 (PROYECTO SIP: 00093497/ITC-20151024, financiado por las empresas DCOOP-BAICO, FINCA ANTIGUA, VIALCON Y NUTRICONTROL).



