

# Nanoelicitores: una alternativa para aumentar la composición fenólica de los vinos de Monastrell

## Nanoelicitors: An alternative to increase the phenolic composition of Monastrell wines

María José Gimenez-Bañón, Diego Fernando Paladines-Quezada, Juan Daniel Moreno-Olivares, Ana Cebrián-Pérez, Juan Antonio Bleda-Sánchez, José Ignacio Fernández-Fernandez, y Rocío Gil-Muñoz

Imida Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental

**Resumen.** Este estudio observa el impacto en la composición fenólica de las uvas y los vinos de Monastrell que han sido tratados con metil jasmonato (MeJ) y nanopartículas de metil jasmonato (Nano-MeJ). El primer objetivo fue comparar el efecto de estos tratamientos para determinar si aumentaba la composición fenólica de sus uvas y vinos. El segundo objetivo fue determinar si los tratamientos con nanopartículas mostraban efectos similares a los tratamientos con MeJ. Los experimentos se realizaron durante tres añadas consecutivas (2019-2021) en las que se aplicaron dos tratamientos foliares en forma de suspensión acuosa de MeJ (10 mM) o de Nano-MeJ (1 mM) en el envero. Los vinos se elaboraron de acuerdo con una metodología tradicional y antocianos, taninos y estilbenos se analizaron cuando la fermentación alcohólica finalizó. Un incremento en la composición fenólica en uvas y vinos tratadas con MeJ y Nano-MeJ fue evidenciado. Este incremento fue diferente en función del tratamiento, tipo de compuesto así como de la añada. Por tanto, a la vista de los resultados, las nanopartículas podrían ser utilizadas como una opción más sostenible para la mejora de la calidad de las uvas y vinos de la variedad Monastrell.

**Abstract.** This study looks at the impact on the phenolic composition of Monastrell grapes and wines that have been treated with methyl jasmonate (MeJ) or and methyl jasmonate nanoparticles (Nano-MeJ). The first objective was to compare the effect of these treatments to determine if it increases the phenolic composition of their grapes and wines. The second objective was to determine if the nanoparticle treatments showed similar effects to the MeJ treatments. The experiments were carried out during three consecutive seasons (2019-2021) in which two foliar treatments were applied in the form of a transparent suspension of MeJ (10 mM) or Nano-MeJ (1 mM) at veraison. The wines were made according to a traditional methodology and anthocyanins, tannins and stilbenes were analyzed when the alcoholic fermentation finished. An increase in the phenolic composition in grapes and wines treated with MeJ and Nano-MeJ was evidenced. This increase was influenced by the type of treatment, as well as compound and. Therefore, in view of the results, nanoparticles could be used as a more sustainable option for improving the quality of Monastrell grapes and wines.

## 1 Introducción

El cambio climático es un proceso global, cuya incidencia es más acusada en zonas áridas y semiáridas como es el sureste español, así en estas áreas, durante todo el período de maduración las vides se ven sometidas a unas temperaturas elevadas, que inciden en el desarrollo de los distintos componentes de las uvas, provocando un desfase entre la madurez tecnológica y fenólica.

El desacoplamiento que ocurre en la baya referente a su madurez. Es por tanto necesario, el desarrollo de nuevas estrategias que permitan adaptarnos a esta nueva situación y que a la vez nos ayuden a mantener una calidad, así como la tipicidad en los vinos de nuestra zona, que en su mayoría están elaborados con la variedad Monastrell.

Entre las nuevas medidas de adaptación está el uso de elicitors, que son sustancias que provocan una respuesta similar a la producida por algún estímulo externo, bien biótico o abiótico y desencadenan la síntesis de compuestos del metabolismo secundario de la planta, tales como los compuestos fenólicos, importantes desde el punto de vista tecnológico y nutricional en los vinos. Entre estos posibles elicitors se encuentra el metil jasmonato (MeJ),

cuya aplicación en la vid ha dado lugar a un incremento en la composición fenólica de uvas. Así, Gómez-Plaza et al. [1] estudió el incremento que se produce de compuestos fenólicos al aplicando MeJ en Monastrell, Merlot y Syrah en el envero o Portu et al. [2] lo estudió en Tempranillo. A pesar de las ventajas obtenidas con su uso, este compuesto también tiene inconvenientes como es su alto precio y su volatilidad. Ante esta situación, debemos buscar otras alternativas que nos permitan seguir realizando una agricultura sostenible. Como alternativa podemos usar la nanotecnología, que es una ciencia que ya se está utilizando en la aplicación de nanofertilizantes en la agricultura, [3,4], pero no así en la viticultura. Por tanto, se trataría de utilizar nanopartículas cuyo pequeño tamaño proporciona una gran relación superficie/volumen que permite doparlas con sustancias de interés como el MeJ, produciéndose una liberación gradual del mismo consiguiendo un mayor aprovechamiento y evitándose pérdidas por lixiviación.

Por tanto el objetivo de este trabajo fue realizar un estudio comparativo en la composición fenólica de uvas y vinos de la variedad Monastrell, cuyas uvas habían sido

tratadas con dos formas de MeJ, una en forma convencional y otra en forma de nanopartículas.

## 2 Materiales y métodos

### Material vegetal

Los tratamientos se llevaron a cabo durante tres años consecutivos (2019-2021) en vides de Monastrell, cultivadas en secano y localizadas en una finca experimental ubicada en Murcia (España). Los viñedos, con una orientación este-oeste, tenían una edad de 17 años y estaban injertados sobre un patrón R110. La densidad de plantación era de 2222 plantas/ha.

Los tratamientos se aplicaron por triplicado (10 cepas por réplica) y fueron los siguientes: i) Control (agua) ii) MeJ (10mM) y iii) Nano-MeJ (1 mM). Todos los tratamientos fueron aplicados usando Tween 80 (Sigma Aldrich) como agente humectante. Cada planta fue pulverizada foliarmente con 200 ml con el tratamiento correspondiente en el envero y una semana después.

### Vinificaciones

La uva vendimiada manualmente en cajas fue transportada inmediatamente a la Bodega Experimental, situada en la Estación Enológica de Jumilla. Seguidamente, los vinos fueron elaborados de acuerdo a un protocolo tradicional de vinificación en tanques de acero inoxidable de 100 L. Durante el despalillado y estrujado de la uva, se sulfitó con 50 mg metabisulfito potásico/Kg de me uva. Posteriormente, se adicionaron levaduras comerciales (Zymaflore FX10 *Sacharomyces cerevisiae*, 20 g/100 Kg). A continuación, se llevaron a cabo las correcciones de acidez con ácido tartárico hasta alcanzar valores de 5.5 g/L. Durante la fermentación alcohólica (realizada a 25 °C), se controló la temperatura y densidad del depósito durante dos veces al día, realizándose remontados con aireación. El proceso de maceración duró aproximadamente 10-15 días. A continuación, se produjo el sangrado del vino y prensado de los orujos en una prensa neumática. Luego, los vinos se trasegaron y se estabilizaron por frío. Los análisis se llevaron a cabo por triplicado al finalizar la fermentación alcohólica.

### Análisis de compuestos fenólicos por HPLC en la uva y en vinos

Se analizaron antocianos y flavonoles siguiendo la metodología propuesta por Moreno-Perez et al. [4]. Los análisis se llevaron a cabo con el hollejo de 20 bayas, que fueron previamente liofilizados y triturados. Dos gramos del triturado obtenido junto con 40 mL de metanol fueron agitados durante cuatro horas en un agitador orbital a 150 rpm y 25 °C. Finalmente, el extracto metanólico obtenido fue filtrado y analizado cromatográficamente siguiendo el protocolo descrito por Gil-Muñoz et al. [5]. En los vinos, la muestra fue inyectada directamente en el cromatógrafo.

Con respecto al análisis de taninos, las muestras se prepararon con una optimización del método descrito por Pastor del Rio y Kennedy [6] y los análisis de HPLC

fueron realizados según el método descrito por Moreno-Pérez et al [7].

Finalmente se llevó a cabo un análisis de estilbenos siguiendo la metodología de Gil-Muñoz et al. [5] Al hollejo procedente de 40 bayas se le adicionó 10 mL de carbonato de sodio (5%) y 10 mL de acetato de etilo, para llevar a cabo una extracción líquido-líquido. Tras su trituración y agitación (200 rpm durante 20 minutos), las muestras fueron centrifugadas (5000 rpm, durante 5 minutos a 4°C). El sobrenadante fue concentrado y redisoluto en 2 mL con MeOH. Una vez filtradas las muestras fueron inyectadas en el cromatógrafo líquido. La identificación y cuantificación de los estilbenos se llevó a cabo de acuerdo a Guerrero et al. [8].

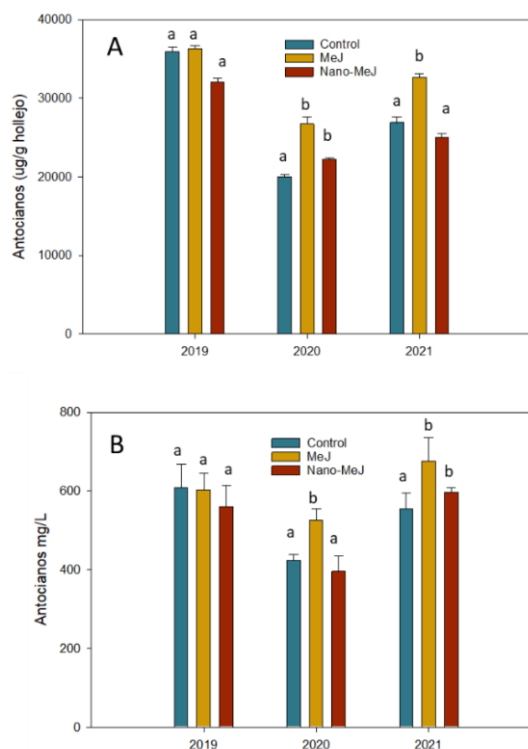
### Análisis estadístico

Se llevó a cabo un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre las medias de los diferentes parámetros evaluados. La separación de medias se realizó utilizando el test Duncan ( $p < 0,05$ ).

## 3 Resultados y Discusión

### Análisis de antocianos en uvas y vinos

En cuanto al análisis de antocianos en uvas (Fig. 1A) se puede observar como las uvas tratadas con MeJ obtuvieron una mayor concentración de estos compuestos durante el año 2020 y 2021. En cambio cuando las uvas fueron tratadas con Nano-MeJ, este incremento solo se evidenció en el año 2020.



**Figura 1.** Antocianos en uvas en el momento de vendimia (A) y vinos (B) al final de fermentación alcohólica. Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

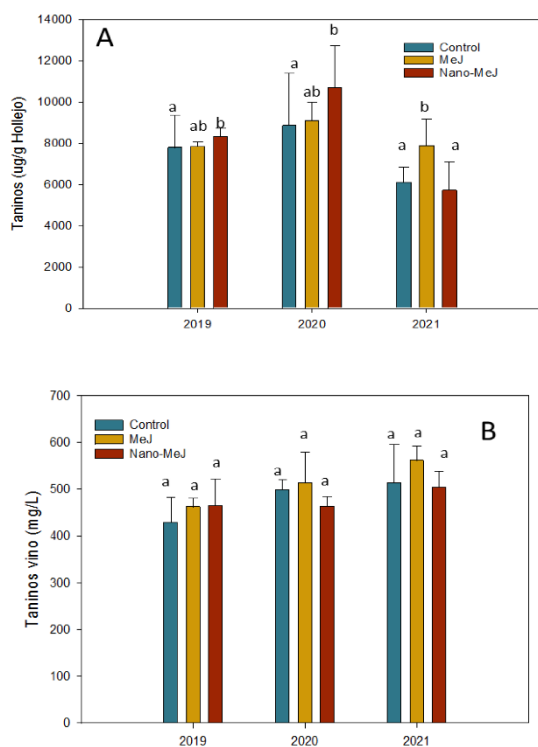
En cuanto al análisis de los vinos (Fig. 1B), de nuevo los incrementos se vieron reflejados en el año 2020 y 2021 en aquellos elaborados con uvas tratadas con MeJ. Sin embargo, en los vinos de uvas tratadas con Nano-MeJ, este incremento se evidenció en el año 2021 y no en el año 2020 al contrario de como había ocurrido en las uvas. Este hecho pudo ser debido a una mayor extractabilidad de estos compuestos durante este año en el que tendría una gran importancia por la composición de la pared celular, ya que ésta se podría haber modificado debido a los tratamientos. Así, Paladines-Quezada et al. [9] observaron cambios en la composición de la pared celular en uvas de Monastrell tratadas con MeJ.

### Análisis de taninos en uvas y vinos

En cuanto al análisis de taninos en las uvas (Fig. 2A), obtuvimos diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el control, aunque estas diferencias fueron más evidentes durante unas añadas que otras.

Así, el tratamiento MeJ, aunque durante los tres años de estudio dieron lugar a incrementos en las concentraciones totales de taninos, estos incrementos solo fueron estadísticamente significativos en la última añada cuando lo comparamos con los valores obtenidos en la variedad Monastrell.

En cuanto a las uvas tratadas con Nano-MeJ, pudimos observar este incremento tanto en el primer año como en el segundo, pero no en el último año de estudio. Esto es remarcable, dado el hecho de que cuando se están aplicando nanopartículas, estamos aplicando una concentración diez veces inferior a cuando utilizamos el MeJ en forma convencional.



**Figura 2.** Taninos en uvas en el momento de vendimia (A) y vinos (B) al final de fermentación alcohólica. Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

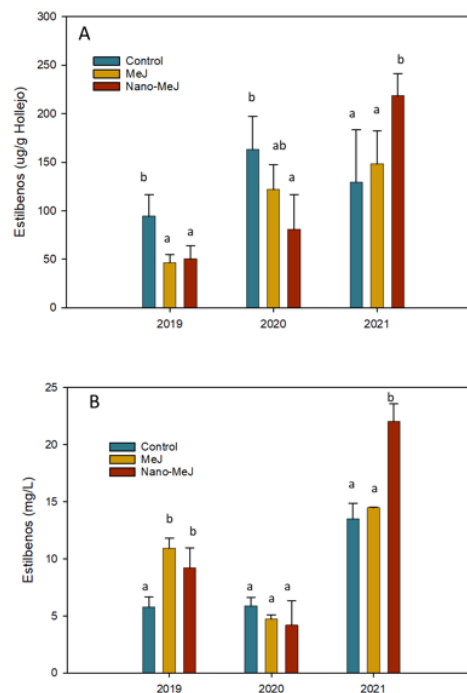
En cuanto a los vinos elaborados (Fig. 2B), todas las diferencias que fueron observadas en las uvas, no pudieron observarse en los vinos, aunque mayores concentraciones de taninos se obtuvieron en los vinos elaborados con MeJ durante las tres añadas y con Nano-MeJ durante el primer año, pero estas no fueron estadísticamente significativas.

De nuevo, una modificación en la composición de la pared celular podría haber sido la causa de las diferentes extractabilidades observadas en los vinos. Por otro lado, autores como Bautista-Ortín et al. [11] estipularon que la difusión de taninos de la uva al vino depende también de la competencia que tienen estos compuestos con los antocianos presentes en las paredes celulares de la uva.

### Análisis de estilbenos en las uvas y en los vinos

Finalmente, en cuanto a la concentración de estilbenos en uvas (Fig. 3A), solo pudimos observar un incremento en su concentración, cuando las uvas fueron tratadas con Nano-MeJ en el último año de estudio, siendo este incremento muy significativo, pues los resultados mostraron valores superiores a los 200  $\mu\text{g/g}$  de Hollejo en las uvas tratadas en comparación a los mostrados en uvas de Monastrell (valores cercanos a 100  $\mu\text{g/g}$  de Hollejo).

En cuanto a los vinos (Fig. 3B), contrariamente a lo obtenido en las uvas, durante el primer año de elaboración, los vinos procedentes de las uvas tratadas con MeJ fueron las que obtuvieron los valores más altos de estilbenos, pero este incremento también fue observado en los vinos elaborados con las uvas tratadas con las nanopartículas. Sin embargo, en el año 2021 los vinos procedentes de las uvas tratadas con Nano-MeJ, fueron los únicos que incrementaron de manera notoria su contenido en estilbenos, tal como habíamos observado en sus uvas.



**Figura 3.** Estilbenos en uvas en el momento de vendimia (A) y vinos (B) al final de fermentación alcohólica. Diferentes letras indican diferencias significativas según el test de Duncan ( $p < 0.05$ ).

De nuevo, es necesario remarcar, que la concentración aplicada mediante el uso de nanopartículas es 10 veces inferior a la aplicada en modo convencional. Además, según los resultados obtenidos, sobre todo en este último año, habríamos duplicado las concentraciones de estilbenos obtenidas en los vinos de Monastrell, duplicando así también el valor nutricional de estos vinos. Autores como Gil-Muñoz et al. (2017), en un estudio llevado a cabo en Monastrell y Tempranillo a las que se había aplicado MeJ, obtuvieron también un incremento en estilbenos, siendo este más evidente en sus vinos que en sus uvas.

## 4 Conclusiones

Un incremento en la composición fenólica en uvas y vinos tratadas con MeJ y Nano-MeJ fue evidenciado. Este incremento se vio influenciado por el tipo de compuesto así como por la añada, siendo más evidente en general en uvas que en vinos.

Es necesario remarcar que la concentración de Nano-MeJ usada fue diez veces inferior a la que se aplica cuando utilizamos el MeJ en forma convencional. Por tanto, si logramos un incremento de los compuestos fenólicos utilizando la nanotecnología, estaríamos ante una manera más sostenible y eficiente de cultivar la vid, además de realizar prácticas agrícolas más respetuosas con el medio ambiente. Por otro lado contribuiríamos a obtener uvas y vinos de mayor calidad.

## Referencias

1. E. Gómez-Plaza, A.B. Bautista-Ortín, Y. Ruiz-García, J.I. Fernández-Fernández, R. Gil-Muñoz, J. Sci. Food Agric. **97**, 977 (2017)
2. J. Portu, R. López, E. Baroja, P. Santamaría, T. Garde-Cerdán. Food Chem. **201**, 213 (2016)
3. M. Usman, M. Farooq, A. Wakeel, A. Nawaz, S.A. Cheema, H. Rehman, I. Ashraf, M. Sanaullah, Sci. Total Environ. **721**, 137778 (2020)
4. C. Bartolucci, A. Antonacci, F. Arduini, D. Moscone, L. Fraceto, E. Campos, R. Attaallah, A. Amine, C. Zanardi, L.M. Cubillana-Aguilera, L.M. et al. Trends Anal. Chem. **125**, 115840 (2020)
5. R. Gil-Muñoz, J.I. Fernández-Fernández, O. Crespo-Villegas, T. Garde-Cerdán. Food Res. Int. **98**, 34 (2017)
6. J.L. Pastor del Rio, J.A. Kennedy, J.A., Am. J. Enol. Vitic. **57**, 125 (2006)
7. A.A. Moreno-Pérez. Tesis Doctoral. Universidad de Murcia (2013)
8. R.F. Guerrero, B. Puertas, M.I. Fernández, M. Palma, E. Cantos. Inn. Food Sci. Em. Techn. **11**, 231 (2010)
9. D.F. Paladines-Quezada, J.D. Moreno-Olivares, J.I. Fernández-Fernández, J.A. Bleda-Sánchez, R. Gil-Muñoz, Chem. **4**, 98 (2022)
10. A.B. Bautista-Ortín, N. Busse-Valverde, J.I. Fernández-Fernández, E. Gómez-Plaza, R. Gil-Muñoz, J. Int. des Sci. la Vigne du Vin **50**, 91– (2016)