

INCREMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE FLAVONOLES EN UVA DE LA VARIEDAD TEMPRANILLO (*Vitis vinifera* L.) DEBIDO AL DESHOJADO PRECOZ

EARLY DEFOLIATION FOR INCREASED FLAVONOL CONCENTRATION IN TEMPRANILLO (*Vitis vinifera* L.) GRAPES.

**Iria Otero¹, Javier Tardaguila², Mar Vilanova¹, Belén Ayestarán², Zenaida
Guadalupe², Maria P. Diago²**

¹Misión Biológica de Galicia (CSIC) 31643. Pontevedra. Spain.

²ICVV (Universidad de La Rioja, CSIC, Gobierno de La Rioja).
26006 Logroño. Spain. maria-paz.diago@unirioja.es

Resumen

El deshojado precoz es una novedosa técnica vitícola capaz de regular el rendimiento productivo del viñedo y reducir la compacidad de los racimos. En este trabajo, se han estudiado los efectos de la época (floración y cuajado) y del modo de ejecución (manual y mecánico) del deshojado precoz sobre la composición de flavonoles en uva de Tempranillo (*Vitis vinifera* L.), determinada mediante HPLC. Los resultados obtenidos mostraron un incremento de la concentración total de flavonoles en uva entre el 32-75 %, respecto al tratamiento control (sin deshojar), así como a nivel individual para algunos flavonoles, especialmente glicósidos de quercetina. La época y el modo de deshojado no afectaron significativamente la acumulación de estos flavonoides en la uva de Tempranillo.

Abstract

Early leaf removal is an innovative viticultural practice aimed to regulate grape yield and reduce cluster compactness. The effects of early leaf removal, manual and mechanically performed, at two different phenological stages, pre-bloom and fruit-set, on the flavonol composition of Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries were studied. The analysis of the flavonol content and profile by HPLC methods revealed a significant increase of 32-75 % of the total flavonol concentration in the berries of defoliated vines as compared to control (non-defoliated). Similar enhancements were also observed for some individual flavonols, especially for quercetin glycosides. Neither the timing nor the method of defoliation significantly affected flavonol accumulation in Tempranillo berries.

Palabras clave: Deshojado precoz, flavonoles, mecanización.

Keywords: Early leaf removal, flavonols, mechanization.

INTRODUCCIÓN

El deshojado precoz es una innovadora y atractiva técnica vitícola desarrollada recientemente en Italia (Poni et al. 2005; Poni et al. 2006). Su principal objetivo es la regulación de la producción de uva y el aumento de la exposición de los racimos (Tardaguila et al. 2010). El deshojado precoz se realiza alrededor de la floración y consiste en la eliminación de hojas basales, que son la principal fuente de carbohidratos. Ello provoca un mayor corrimiento, que se traduce en la reducción de la tasa de cuajado y por tanto, del rendimiento productivo, dando lugar a racimos más pequeños y sueltos, menos sensibles a enfermedades criptogámicas, y de mayor calidad (Poni et al. 2005; Intrieri et al. 2008; Tardaguila et al. 2008). Además, la mecanización del deshojado precoz con el fin de conseguir un control del rendimiento productivo de forma rápida y eficiente, es un aspecto de gran interés para el sector vitivinícola (Diago, 2010).

Los flavonoles son unos compuestos fenólicos del grupo de los flavonoides, sintetizados en las capas más externas de la epidermis de los hollejos, y que en la uva se encuentran principalmente sustituidos por diferentes grupos glicosidos (Price 1994). Entre las muchas funciones biológicas que se les asignan, su actuación como protectores solares naturales de los tejidos de la planta frente a la radiación UV es una de las más importantes y conocidas (Flint et al. 1985). Por ello, su respuesta frente a diferentes condiciones de exposición a la luz solar ha sido estudiada por varios autores (Price et al. 1995; Haselgrove et al. 2000; Spayd et al. 2002; Downey et al. 2003; Cortell y Kennedy 2006; Tarara et al. 2008), que han observado que un incremento de la exposición de los racimos favorece la acumulación de estos flavonoides. Recientemente se ha averiguado que la síntesis de flavonoles tiene lugar fundamentalmente en dos períodos: cuajado y a partir del envero (Downey et al. 2003) por lo que la manipulación de las condiciones del viñedo en cualquiera de estos dos momentos puede tener efectos significativos en la síntesis y acumulación de flavonoles.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la influencia de la época y modo de ejecución del deshojado precoz sobre el contenido y composición de los flavonoles en uva de la variedad Tempranillo (*Vitis vinifera* L.).

MATERIAL Y MÉTODOS

Viñedo experimental. Los ensayos de deshojado precoz se llevaron a cabo, en el año 2008, en un viñedo de la variedad Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) situado en Ollauri (La Rioja). El viñedo, plantado en 1996 (marco de plantación 2.70 x 1.15) en un suelo franco-arcilloso, estaba conducido en espaldera, en doble cordón Royat, con 12 yemas por cepa y orientación noreste-sudoeste. No se regó durante toda la estación vegetativa.

Se realizaron cinco tratamientos de deshojado distintos: Control, sin defoliación alguna; deshojado manual consistente en la eliminación de las 8 primeras hojas basales de cada pámpano, en pre-floración (Man-PreF) y cuajado (Man-Cua); Deshojado mecánico con una máquina deshojadora de impulsión de aire

(Collard, Francia) sobre los primeros 60 cm de la zona basal de la pared vegetativa, en pre-floración (Mec-PreF) y cuajado (Mec-Cua). Se realizó un diseño de bloques al azar, con cinco repeticiones por tratamiento, y 18 cepas por repetición. Antes de floración, en 25 cepas correspondientes a cada tratamiento (5 cepas por repetición), se señaló un pámpano que serviría de unidad muestral por cepa para la determinación de los diferentes parámetros en vendimia.

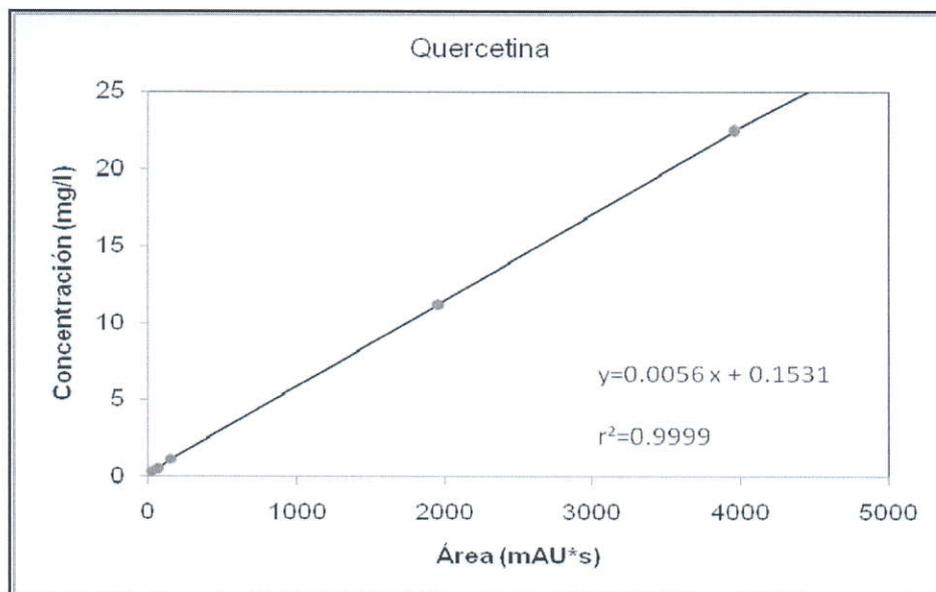
Obtención de extractos de uva. Se vendimió de forma separada la producción de los 25 pámpanos marcados por tratamiento. Para cada punto experimental, en el laboratorio, siguiendo el método de Iland et al. (2004) se tomó una sub-muestra de 50 bayas, que se pesó y homogenizó con un molino Ultra Turrax (IKA, Alemania) a gran velocidad (14000 rpm durante 1 minuto). A continuación se pesó 1 gramo de la pasta homogénea obtenida y se extrajo con 10 ml de una mezcla hidroalcohólica (etanol:agua desionizada, 50/50 v/v a pH=2.0) durante 1 hora con agitación intermitente. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó durante 10 minutos a 4000 rpm. Los extractos de uva obtenidos (25 extractos/tratamiento) se conservaron en viales de plástico de 2 ml y se mantuvieron en congelador a -20 °C hasta su análisis por HPLC.

Análisis de la composición de flavonoles por HPLC. Con anterioridad al análisis por HPLC, se homogenizaron los cinco extractos correspondientes a las cinco cepas de una misma repetición, y se obtuvo un único extracto por cada repetición. Los cinco extractos finales por tratamiento se filtraron con filtros de disco de PTFE (0.45 μ m) y analizaron mediante HPLC-DAD en un cromatógrafo líquido Agilent (Waldbronn, Alemania) modular modelo 1100 con bomba cuaternaria y detector de UV-VIS Diode Array (190-950 nm), equipado con software HP ChemstationTM y una columna LiChrosphere® 100 RP-18 (250mm \times 4mm; 5 μ m tamaño de partícula), sin pre-columna previa. Las condiciones cromatográficas, fases móviles y gradiente de elución empleados fueron descritos por Lamuela-Raventós y Waterhouse (1994) y posteriormente optimizados por Donovan et al. (1998). La cuantificación de los flavonoles se llevó a cabo por medición del área de pico a 365 nm, y se expresó como quercetina a partir de la curva de calibración con patrón externo de quercetina dihidrato (pureza \geq 98% HPLC, Sigma Aldrich), que se muestra en la figura 1.

La identificación de los flavonoles se realizó a partir del tiempo de retención, los espectros UV-Visible de cada compuesto así como por comparación con la información existente en la bibliografía (Lamuela-Raventós y Waterhouse, 1994; Tsao y Yang, 2003; Monagas et al. 2005; Gómez-Alonso et al. 2007).

Análisis estadístico. Los datos obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza utilizando el paquete estadístico Infostat (Infostat Professional 2007 edition, Córdoba, Argentina), y mediante contrastes *a priori* ($p < 0.05$) para establecer los efectos de la época y modo de ejecución del deshojado precoz. Asimismo, se utilizó el test de Dunnett (Dunnett 1955) con $\alpha = 0.05$, para evaluar las diferencias significativas entre cada tratamiento de deshojado precoz y el control (SPSS, versión 15.0, Chicago, EEUU).

Figura 1. Curva de calibración con patrón externo de quercetina dihidrato para la cuantificación de los flavonoles en extractos de uva por HPLC.

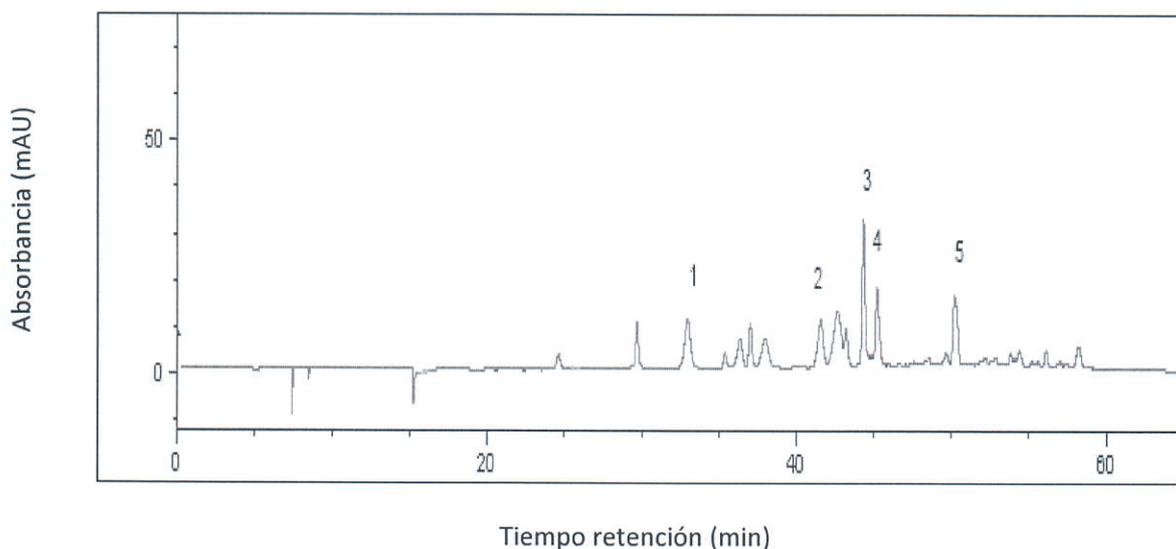


RESULTADOS

En los extractos de uva analizados se identificaron y cuantificaron cuatro compuestos fenólicos pertenecientes al grupo de los flavonoles: Miricetina-O-glucósido, quercetina-O-galactósido y la mezcla de quercetina-O-glucurónido + quercetina-O-glucósido. Los compuestos Polifenol I y II también se cuantificaron a 365 nm por presentar la máxima absorción a dicha longitud de onda, aunque su identidad no pudo elucidarse de forma clara. La figura 2 muestra un cromatograma representativo de los extractos de uva a 365 nm.

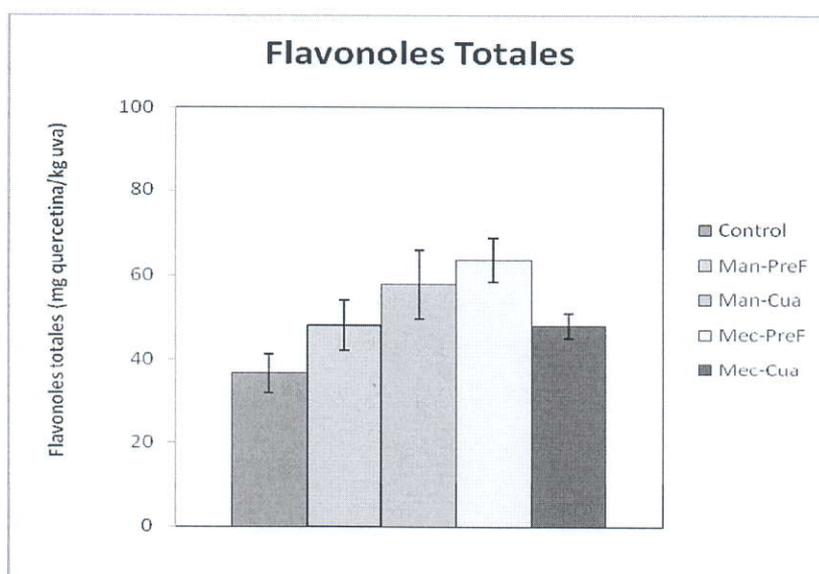
La concentración total de flavonoles en uva (expresada como mg de quercetina/kg uva) para el control y los diferentes tratamientos de deshojado precoz estudiados se muestra en la figura 3.

Figura 2. Cromatograma de un extracto de uva de Tempranillo a 365 nm.



Identificación de los fenoles: (1) Polifenol I, (2) Polifenol II, (3) Miricetina-O-glucósido, (4) Quercetina-O-galactósido, (5) Quercetina-O-glucurónido + quercetina-O-glucósido.

Figura 3. Concentración de flavonoles totales en extractos de uva de Tempranillo (expresada como mg quercetina/kg uva) para los tratamientos de deshojado precoz estudiados (las barras verticales indican el error estándar).



Las concentraciones de cada flavonol en extractos uva así como los valores de probabilidad de los contrastes establecidos se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Influencia del deshojado precoz en la concentración de flavonoles en extractos de uva de Tempranillo (valores expresados como mg quercetina/kg uva) del año 2008. Valores promedio y errores estándar (entre paréntesis), análisis de varianza y significación de los contrastes.

Tratamiento	Polifenol I	Polifenol II	Miricetina-O-glucósido	Quercetina-O-galactósido	Quercetina-O-glucurónido + quercetina-O-glucósido
Control	4.6 (0.84)	4.1 (0.62)	11.1 (1.19)	9.9 (2.52)	11.1 (1.69)
Man-PreF	4.9 (0.63)	4.4 (0.71)	12.5 (2.04)	12.0 (1.39)	18.2 (3.26)
Man-Cua	5.3 (1.33)	5.5 (1.13)	15.9 (3.56)	14.0 (1.25)	20.7 (1.74)
Mec-PreF	5.4 (0.96)	4.7 (0.96)	14.2 (2.55)	17.7 (1.26)	25.3 (2.20)
Mec-Cua	3.5 (0.09)	3.2 (0.24)	9.9 (0.31)	13.8 (0.26)	21.9 (3.20)
Valores de probabilidad (p) de los contrastes					
Control vs Deshojado	0.846	0.745	0.517	0.022	0.001
Control vs Deshojado pre-floración	0.613	0.692	0.492	0.016	0.002
Control vs Deshojado cuajado	0.902	0.838	0.618	0.069	0.005
Pre-floración vs Cuajado	0.472	0.846	0.875	0.568	0.871
Manual vs Mecánico	0.520	0.343	0.448	0.115	0.119
Análisis de varianza-Valores de probabilidad (p)					
Tratamiento	0.859	0.647	0.528	0.024	0.005

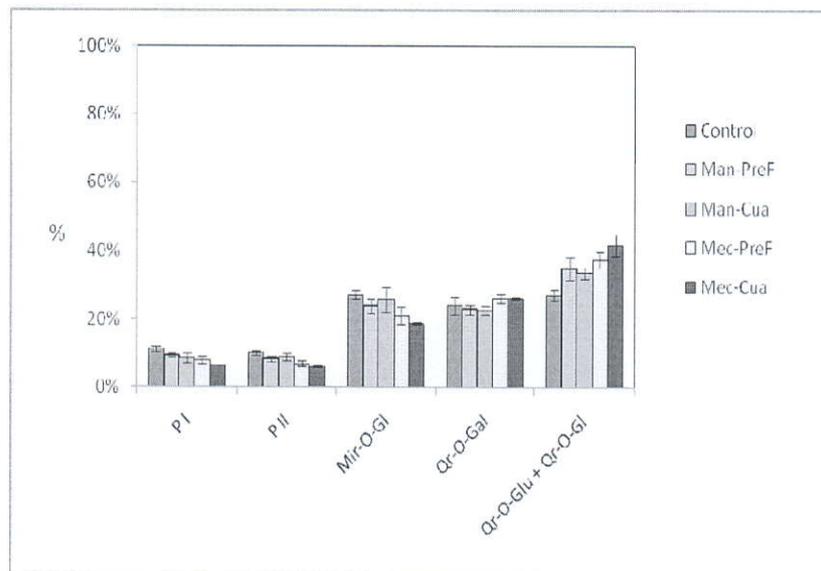
*Las medias resaltadas en negrita son significativamente diferentes del control para $p \leq 0.05$, según el test de Dunnett.

El deshojado precoz indujo un incremento significativo de la concentración de flavonoles totales respecto al control, debido fundamentalmente al aumento de las concentraciones de los glicósidos de quercetina. Los mayores incrementos se observaron para el deshojado mecánico en pre-floración cuyas uvas contenían el doble de glicósidos de quercetina que el control y un 75% más de flavonoles totales. Las mayores diferencias entre el control y los distintos tratamientos de deshojado precoz se observaron para la mezcla de quercetina-O-glucurónido y quercetina-O-glicósido.

De forma general, ni la época ni el modo de ejecución del deshojado precoz afectaron de forma significativa a la síntesis y acumulación de flavonoles en uva de Tempranillo.

Respecto a la proporción de los diferentes flavonoles, en la figura 4 se presenta la distribución de los distintos compuestos fenólicos identificados a 365 nm en los extractos de uva analizados (datos expresados como %).

Figura 4. Distribución de los Polifenoles I y II y de los flavonoles individuales en los extractos de uva de Tempranillo (expresada como %) para los tratamientos de deshojado precoz estudiados (las barras verticales indican el error estándar).



Abreviaturas utilizadas: Polifenol I (P I); Polifenol II (P II); Miricetina-O-glicósido (Mir-O-Gl); Quercetina-O-galactósido (Qr-O-Gal); Quercetina-O-glucurónido + quercetina-O-glicósido (Qr-O-Glu + Qr-O-Gl).

DISCUSIÓN

El deshojado precoz indujo un incremento significativo de la concentración de los glicósidos de quercetina y de los flavonoles totales en la uva de cepas deshojadas respecto al control. La mejora del microclima de los racimos causada por la defoliación temprana, observada en otros trabajos (Tardaguila et al. 2010), podría explicar la mayor acumulación de estos flavonoides en la uva. De forma análoga, varios autores han observado aumentos en la concentración de glicósidos de quercetina y de otros flavonoles como el kaempferol y la miricetina en diferentes variedades tintas a medida que aumentaba la exposición a la luz solar (Price et al. 1995; Haselgrove et al. 2000; Spayd et al. 2002; Tarara et al. 2008). El incremento de la exposición a la luz del sol suele ir acompañado de un aumento de la temperatura. Sin embargo, varios estudios realizados para intentar separar y establecer los efectos de ambos factores de forma individual indican que la respuesta de los flavonoles a la exposición solar parece ser más específica para la luz y no tanto para el incremento de temperatura (Spayd et al. 2002; Tarara et al. 2008).

Los valores de flavonoles totales en las bayas de Tempranillo en este trabajo fueron similares a los descritos en Shiraz por Haselgrove et al. (2000), quienes obtuvieron concentraciones de 0.065 mg/g de baya, y por Downey et al. (2003) en Shiraz y Chardonnay (0.034 ± 0.001 mg/g baya y 0.031 ± 0.001 mg/g baya, respectivamente).

Del conjunto de flavonoles existentes en la naturaleza, los glicósidos de quercetina, principalmente la quercetina-O-glicósido y la quercetina-O-glucurónido suelen ser los mayoritarios en un buen número de variedades de uva (Cheynier y Rigaud, 1986; Price et al. 1995; Downey et al. 2003). Además, estos dos glicósidos de quercetina pueden aparecer co-eluidos en ciertas condiciones cromatográficas de separación, como han descrito Haselgrove et al. (2000) y como también ha sucedido en el presente trabajo. A diferencia de otras variedades, el flavonol mayoritario en la variedad Tempranillo, parece ser la miricetina-O-glicósido, seguida de la quercetina-O-glicósido y la quercetina-O-glucurónido (Hermosín-Gutiérrez et al. 2005; Gómez-Alonso et al. 2007). En los extractos de uva de Tempranillo analizados en este trabajo, la miricetina-O-glicósido se mantuvo en niveles similares al resto de glicósidos de quercetina.

Aparte de los compuestos denominados polifenol I y II, cuya naturaleza no está clara, solamente se han encontrado flavonoles sustituidos con grupos glicosídicos en los extractos de uva de Tempranillo. Este resultado es coherente con la ausencia de flavonoles agliconas en bayas de Shiraz y Chardonnay (Downey et al. 2003) y de Tempranillo (Gómez-Alonso et al. 2007). Cheynier et al. (1998) postularon que en la uva, los flavonoles solamente se encuentran en forma de glicósidos.

La época y el modo de ejecución del deshojado precoz no afectaron de forma significativa la concentración a nivel individual ni en conjunto de los flavonoles en las bayas de Tempranillo. Posiblemente las condiciones de exposición de los racimos en los distintos tratamientos de deshojado hayan sido suficientes y

no limitantes como para no inducir diferencias en la concentración de flavonoles.

La concentración de antocianos y otros polifenoles, como los flavonoles, en uva se correlaciona estrechamente con la concentración de estos compuestos en el vino, siendo importantes indicadores de la calidad del vino final (Francis et al. 1998). En este sentido, el incremento de la concentración de flavonoles en la uva como respuesta al deshojado precoz es un resultado positivo y muy deseable, dado el papel fundamental de este grupo de compuestos en el fenómeno de copigmentación y la estabilización del color en los vinos tintos (Boulton 2001; Downey et al. 2003; Diago 2003). El color de los vinos jóvenes se debe a los antocianos extraídos de los hollejos, pero estos compuestos son inestables y buena parte del color inicial se pierde durante la fermentación y el envejecimiento (Somers y Evans, 1979; Somers y Verette, 1988). El color de los vinos de crianza es el resultado de asociaciones estables entre antocianos y otros compuestos del grupo de los flavonoides, formando pigmentos poliméricos (Nagel y Wulf, 1979; McCloskey y Yengoyan, 1981; Somers y Verette, 1988; Mateus et al. 2002). Los pigmentos poliméricos se forman lentamente en el vino y los complejos antociano-copigmento se consideran estructuras intermedias que no sólo mantienen a los antocianos en el medio, sino también los alinean en orientaciones favorables para la formación de asociaciones más estables (Brouillard y Dangles, 1994; Boulton 2001). Las asociaciones antociano-copigmento más estables tienen lugar entre los principales antocianos del vino, como la malvidina-3-glucósido y los flavonoles quercetina y quercetina-O-glucósido (Baranac et al. 1997; Lambert 2002). Por ello, cualquier proceso o práctica vitícola, como el deshojado precoz, que altere el contenido de flavonoles en la uva puede influir de forma importante en la calidad del vino.

CONCLUSIONES

El deshojado precoz mejoró significativamente la composición de flavonoles en la uva de Tempranillo, induciendo un incremento medio del 49 % de la concentración total de estos compuestos respecto al control. La mejora del microclima de las hojas y frutos, descrita en estudios anteriores de deshojado precoz podría explicar la mayor acumulación de estos flavonoides en la uva. En general ni la época ni el modo de ejecución afectaron de forma notable la composición de flavonoles en la uva. Dada la importancia de los flavonoles en la calidad de la uva, actuando como excelentes cofactores de copigmentación en el vino tinto, favoreciendo su estabilidad, el deshojado precoz puede considerarse una técnica vitícola eficaz para mejorar la calidad de la uva de Tempranillo, que además ofrece excelentes posibilidades de mecanización.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos ADER-2006-I-ID-00157 de la Agencia de Desarrollo Económico de La Rioja y AGL2007-60378, del Ministerio de Ciencia e Innovación. Asimismo, se agradece a la Agrupación de Bodegas Centenarias y Tradicionales de Rioja (ABC), que engloba a las siguientes bodegas: Bodegas Muga, Bodegas La Rioja Alta, Bodegas Bilbainas, CVNE y Viña Salceda, y al grupo multinacional de maquinaria agrícola, New Holland, por su apoyo y financiación económica.

BIBLIOGRAFÍA

- BARANAC, J.M.; PETRANOVIC, N.A. Y DIMITRIC-MARKOVIC, J.M. (1997). "Spectroscopic study of anthocyanin copigmentation reactions. 2. Malvin and the nonglycosidized flavone quercetin". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 45, pgs. 1694–1697
- BOULTON R.B. (2001) "The Copigmentation of Anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review". *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 52, pgs. 67-87.
- BROUILLARD, R. Y DANGLES, O. (1994). "Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging?". *Food Chemistry*, Vol. 51, pgs. 365– 371.
- CHEYNIER, V. Y RIGAUD, J. (1986) "HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault". *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 37, pgs. 248-252.
- CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Y SARNI-MANCHADO, P. (1998) "Les composés phénoliques". In: Flanzy, C. (Ed.), *Oenologie: fondements scientifiques et technologiques*. Lavoisier Tec & Doc, Paris, pgs. 124-164.
- CORTELL, J.M. Y KENNEDY, J.A. (2006). "Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot Noir fruit and extraction in a model system". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 54, pgs. 8510-8520.
- DIAGO, M.P. (2003). *Effect of Co-fermentation of Red Grapes with Different Amounts of White Skins in the Color of Young Red Wines*. M.S. Thesis, University of California, Davis.
- DIAGO, M.P. (2010). *Estudio y desarrollo del deshojado precoz como técnica para el control del rendimiento productivo de la vid (*Vitis vinifera* L.). Efectos sobre el desarrollo vegetativo, los componentes de la producción, así como sobre la composición y la calidad de la uva y del vino*. Universidad de La Rioja. Tesis Doctoral. 2010
- DONOVAN J.L.; MEYER A.S. Y WATERHOUSE A.L. (1998). "Phenolic composition and Antioxidant Activity of Prunes and Prune Juice (*Prunus Domestica*)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 46, pgs. 1247-1252.
- DOWNEY, M.O.; HARVEY, J.S. Y ROBINSON, S.P. (2003). "Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.)" *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol. 9, pgs. 110-121.
- DUNNETT, C.W. (1955). "A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control". *Journal of the American Statistical Association*, Vol. 50, pgs. 1096-1121.

FLINT, S.D.; JORDAN, P.W. Y CALDEWELL, M.M. (1985). "Plant protective response to enhanced UV-B radiation under field conditions: leaf optical properties and photosynthesis". *Photochem. Photobiol.*, vol. 41, pgs. 95-99.

FRANCIS, I.L.; ILAND, P.G.; CYNKAR, W.U.; KWIATKOWSKI, M.; WILLIAMS, P.J.; ARMSTRONG, H.; BOTTING, D.G.; GAWEL, R. Y RYAN, C. (1998). "Assessing wine quality with the G-G assay". In: *Proceedings of the Tenth Australian Wine Industry Technical Conference*. Australian Wine Research Institute: Adelaide, Australia, pgs. 104-108.

GÓMEZ-ALONSO, S.; GARCÍA-ROMERO, E. Y HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. (2007). "HPLC analysis of diverse grape and wine phenolics using direct injection and multidetection by DAD and fluorescence". *Journal of Food Composition and Analysis*, Vol. 20, pgs. 618-626.

GUBLER, W.D.; BETTIGA, L.J. Y HEIL, D. (1991). "Comparisons of hand and machine leaf removal for the control of botrytis bunch rot". *Am. J. Enol. Vitic.*, Vol. 42, pgs. 233-236.

HASELGROVE, L.; BOTTING, D.; VAN HEESWIJCK R.; HOJ, P.B.; DRY, P.R.; FORD, C. Y ILAND, P.G. (2000). "Canopy microclimate and berry composition: the effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz grape berries". *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol. 6, pgs. 141-149.

HERMOSÍN-GUTIÉRREZ, I. Y GARCÍA-ROMERO, E. (2004). "Antocianos de variedades tintas cultivadas en La Mancha: perfiles varietales característicos de la uva y de los vinos monovarietales, y evolución durante la maduración de la baya". *Alimentaria*, Vol. 352, pgs. 127-139.

ILAND, P.; BRUER, N.; EDWARDS, G.; WEEKS, S. Y WILKES, E. (2004). *Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts*. Patrick Iland wine promotions. Campbelltown, Australia.

INTRIERI, C.; FILIPPETTI, I.; ALLEGRO, G.; CENTINARI, M. Y PONI S. (2008). "Early defoliation (hand vs mechanical) for improved crop control and grape composition in Sangiovese (*Vitis vinifera* L.)". *Australian Journal of Grape and Wine Research*, Vol. 14, pgs. 25-32.

LAMBERT, S.G. (2002) *Copigmentation and its impact on the stabilization of red wine pigments*. PhD Thesis. University of Adelaide: Adelaide.

LAMUELA RAVENTÓS, R.M. Y WATERHOUSE, A.L. (1994). "A direct HPLC separation of wine phenolics". *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 45, pgs.1-5.

MARTÍNEZ DE TODA, F. Y TARDAGUILA, J. (2003). "Meccanizzazione e fabbisogni di manodopera dei diversi sistemi di allevamento". En: *Forme di allevamento della vite e modalità di distribuzione dei fitofarmaci*. Ed. Balsari P., Scienza A. Bayer CropScience. Milan (Italia), pgs. 143-158

- MATEUS, N.; SILVA, A.M.S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C. Y DE FREITAS, V. (2002). "Identification of anthocyanin-flavanol pigments in red wines by NMR and mass spectrometry". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 50, pgs. 2110–2116
- MCCLOSKEY, L.P. Y YENGOYAN, L.S. (1981). "Analysis of anthocyanins in *Vitis vinifera* wines and red color versus aging by HPLC and spectrometry". *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 32, pgs. 257–261.
- MONAGAS, M.; SUÁREZ, R.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Y B. BARTOLOMÉ. (2005). "Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS". *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 56, pgs. 139-147.
- NAGEL, C.W. Y WULF, L.W. (1979). "Changes in the anthocyanins, flavonoids and hydroxycinnamic acid esters during fermentation and aging of Merlot and Cabernet Sauvignon". *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 30, pgs. 111–116.
- PONI, S.; BERNIZZONI, F.; BRIOLA, G. Y CENNI, A. (2005). "Effects of early leaf removal on cluster morphology, shoot efficiency and grape quality in two *Vitis vinifera* cultivars". *Acta Horticulturae*, Vol. 689, pgs. 217-225.
- PONI, S.; CASALINI, L.; BERNIZZONI, F.; CIVARDI, S. Y INTRIERI, C. (2006). "Effects of early defoliation on shoot photosynthesis, yield components, and grape quality". *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 57, pgs. 397-407.
- PRICE, S.F. (1994) *Sun exposure and grape phenolic compounds*. Thesis, Oregon State University.
- PRICE, S.F.; BREEN, P.J.; VALLADAO, M. Y WATSON, B.T. (1995). "Cluster sun exposure and quercetin in grapes and wine". *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 46, pgs. 187-194.
- SOMERS, T.C. Y EVANS, M.E. (1979). "Grape pigment phenomena: interpretation of major colour losses during vinification". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Vol. 30, pgs. 623–633.
- SOMERS, T.C. Y VÉRETTE, E. (1988) "Phenolic composition of natural wine types". In: *Wine analysis*. Eds H.-F. Linskens and J.F. Jackson (Springer-Verlag: Berlin), pgs. 219– 257.
- SPAYD, S.E.; TARARA, J.M.; MEE, D.L. Y FERGUSON, J.C. (2002). "Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot berries". *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 53, pgs. 171-782.
- TARARA, J.; LEE, J.; SPAYD, S.E. Y SCAGEL, C.F. (2008). "Berry temperature and solar radiation alter acylation proportion, and concentration of anthocyanins in Merlot grapes". *American Journal of Enology and Viticulture*, Vol. 59, pgs. 235-247.

TARDAGUILA, J.; DIAGO, M.P.; MARTÍNEZ DE TODA, F.; PONI, S. Y VILANOVA, M. (2008). "Effects of timing of leaf removal on yield, berry maturity, wine composition and sensory properties of cv. Grenache grown under non irrigated conditions". *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, Vol.42, pgs. 221-229.

TARDAGUILA, J.; MARTINEZ DE TODA, F.; PONI, S. Y DIAGO, MARIA P. (2010). "Early leaf removal impact on yield components, fruit and wine composition of Graciano and Carignan grapevines". *American Journal of Enology and Viticulture* (En prensa).

TSAO, R. Y YANG, R. (2003). "Optimization of a new mobile phase to know the complex and real polyphenolic composition: towards a total phenolic index using high performance liquid chromatography". *Journal of Chromatography A*, Vol. 1018, pgs. 29-40.