



Viñedo conducido en espaldera. / @nafardron

Aplicaciones foliares de riboflavina en el viñedo como herramienta para incrementar el contenido nitrogenado de la uva

T. Garde-Cerdán, R. González-Santamaría y E. P. Pérez-Álvarez. Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino (Gobierno de La Rioja-CSIC-Universidad de La Rioja)
R. Ruiz-González y S. Nonell. Institut Químic de Sarrià. Universitat Ramon Llull

El objetivo de este trabajo ha sido estudiar la influencia de la aplicación foliar en el viñedo de riboflavina (vitamina B2) sobre la composición nitrogenada de la uva. Para ello, en el envero y una semana después, se aplicaron dos disoluciones acuosas de dicha vitamina sobre las hojas de las plantas de un viñedo de Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) injertado sobre Richter-110. Los resultados mostraron que, en los mostos, la concentración de la mayoría de los aminoácidos fue más alta cuando se aplicó la dosis más

baja de riboflavina (100 g/ha), aunque la dosis más alta (200 g/ha) también mejoró su composición nitrogenada. Desde el punto de vista de la mejora del contenido en aminoácidos de los mostos, estos resultados son prometedores, ya que con las aplicaciones foliares se contribuye a evitar posibles problemas de fermentación a causa de la falta de nitrógeno y se podría mejorar la composición volátil de los vinos, ya que los aminoácidos son precursores de numerosos compuestos volátiles fermentativos.

El nitrógeno desempeña un papel importante en muchas de las funciones de la planta. La fertilización nitrogenada del viñedo puede influir en la composición de la uva, aumentando la concentración de aminoácidos (Garde-Cerdán *et al.*, 2014; Pérez-Álvarez *et al.*, 2017) y pudiendo evitar problemas asociados a la falta de nitrógeno, como fermentaciones lentas o paradas de fermentación (Arias-Gil *et al.*, 2007). Además, la composición nitrogenada de la uva está relacionada con la formación de aromas fermentativos (Garde-Cerdán y Ancín-Azpilicueta, 2008). Sin embargo, el uso excesivo de fertilizantes nitrogenados puede ocasionar problemas medioambientales. Una alternativa puede ser la aplicación foliar de compuestos nitrogenados, ya que es una técnica rápida y eficiente, que reduce costos y contribuye a una agricultura sostenible.

La riboflavina (vitamina B2) es una vitamina soluble en agua (figura 1), que está ampliamente presente en la naturaleza y en una gran cantidad de alimentos (Powers, 2003). El papel de la riboflavina

en las plantas no se conoció hasta el año 2000. Esta vitamina aumenta la resistencia a enfermedades en diversas especies vegetales (Boubakri *et al.*, 2013). Las vitaminas están implicadas en el metabolismo nitrogenado de la planta, dado que los aminoácidos son precursores de la mayoría de ellas. Por todo ello, el objetivo de este trabajo fue estudiar la influencia de la aplicación foliar de riboflavina en la composición nitrogenada de la uva.

Material y métodos

Tratamientos foliares

El estudio se llevó a cabo en 2016 en un viñedo de la variedad Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) injertada sobre Richter-110, ubicado en La Grajera (Logroño). Los tratamientos estudiados fueron un control y la aplicación foliar de dos dosis diferentes de riboflavina: 100 g/ha (Rf1) y 200 g/ha (Rf2). Las plantas control se pulverizaron con una disolución acuosa de Tween 80, usada como agente humectante. Para cada aplicación, se pulverizaron 200 ml/planta,

Figura 1. Estructura química de la riboflavina



llevándose a cabo dos veces, en enero y una semana después. Todos los tratamientos se hicieron por triplicado.

Muestreo de uva y análisis de parámetros enológicos

Las uvas se recogieron en su momento óptimo de madurez tecnológica y, posteriormente, se despallaron y estrujaron. Los mostos obtenidos se caracterizaron físico-químicamente, determinándose: alcohol probable, pH, acidez total, intensidad colorante (IC), tonalidad e índice de polifenoles totales (IPT) según los métodos oficiales de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). El ácido málico y el nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) se analizaron utilizando un multianalizador Miura one (Tecnología Difusión Ibérica, Barcelona, España). Los tratamientos se realizaron por triplicado, por lo que los resultados para estos parámetros corresponden a la media de tres análisis (n=3).

Determinación de aminoácidos por HPLC

El análisis de aminoácidos se llevó a cabo por cromatografía líquida (HPLC) (Agilent, Palo Alto, EE. UU.), empleando el método descrito por Garde-Cerdán *et al.* (2014). A 5 ml de muestra, previamente centrifugada, se adicionaron 100 µL de norvalina y 100 µL de sarcosina, como estándares internos. Esta mezcla se filtró y se sometió a una reacción de derivatización con o-ftaldehído (OPA, Agilent) y con 9-fluorenilmetilclorofórmato (FMOC, Agilent). La cantidad de muestra inyectada fue de 10 µL. Todas las separaciones se realizaron en una columna Hypersil



Los ensayos se realizaron en la época de enero. / Ch. Díez

ODS (250 x 4,0 mm, 5 µm; Agilent) termostatzada a 40 °C. Como fases móviles se usaron dos eluyentes: A, acetato de sodio 75 mM, trietilamina al 0,018% (pH 6,9) y tetrahidrofurano al 0,3%; B, agua, metanol y acetonitrilo (10:45:45, v/v/v). La determinación de los aminoácidos se realizó empleando un detector de fluorescencia (FLD) y un detector de diodo array (DAD). La identificación de los compuestos se realizó comparando sus tiempos de retención con los patrones de referencia puros. Los tratamientos se realizaron por triplicado, por lo que los resultados de aminoácidos libres corresponden a la media de tres análisis (n=3).

Análisis estadístico

Los datos de las diferentes determinaciones se procesaron usando el análisis de varianza (ANOVA). Los tratamientos y el control se compararon mediante la prueba *post hoc* Duncan con un nivel de significación menor o igual al 5% ($p \leq 0,05$), empleando el paquete estadístico SPSS (Chicago, EE. UU.).

Resultados y discusión

Efecto sobre los parámetros enológicos

En la tabla 1 se muestran los parámetros físico-químicos y el NFA del mosto control y del mosto procedente de los dos tratamientos con riboflavina (Rf1 y Rf2). Las muestras control y Rf1 presentaron mayor alcohol probable que las muestras Rf2. El contenido de ácido málico fue mayor en

el mosto procedente del tratamiento con Rf2 que en las muestras control y Rf1. La intensidad colorante (IC) fue mayor en las muestras Rf1 que en el control.

Por el contrario, el mosto de Rf2 tenía mayor tonalidad que el control, ambos sin diferencias significativas con respecto a las muestras Rf1. El resto de los parámetros enológicos no mostraron diferencias entre el control y los dos tratamientos con riboflavina. El contenido de NFA en los mostos procedentes de ambas aplicaciones con riboflavina (Rf1 y Rf2) no mostró diferencias significativas respecto al control (tabla 1).

Influencia sobre la concentración de aminoácidos

El contenido de aminoácidos totales y de aminoácidos totales sin prolina en los mostos aumentó debido a las aplicaciones foliares de riboflavina. Fue la dosis más baja de riboflavina (Rf1) el tratamiento más efectivo (figura 2A). El aminoácido mayoritario en los mostos fue la arginina (Arg), observándose que ambos tratamientos favorecieron su síntesis por la planta, aunque en mayor medida cuando se aplicó la dosis más baja de dicha vitamina (figura 2B). En el caso de prolina (Pro) y glutamina (Gln), compuestos que se encontraron también en altas concentraciones, su contenido en las muestras fue mayor con el tratamiento Rf1 que con los tratamientos control y Rf2 (figura 2B). Una tendencia similar se observó para GABA, histidina (His), triptófano (Trp) y leucina (Leu) (figura 2C). El contenido



Cromatógrafo de líquidos (HPLC), equipo utilizado para el análisis de aminoácidos. / Michel López de Dicastillo

de ácido glutámico (Glu), alanina (Ala) y ácido aspártico (Asp) presentó valores más altos en los mostos con ambos tratamientos de riboflavina (Rf1 y Rf2) que con el control (figura 2C), mientras que la dosis más baja de riboflavina (Rf1) fue el tratamiento que provocó el mayor incremento en los niveles de treonina (Thr), serina (Ser) y valina (Val), aunque el tratamiento con Rf2 también favoreció la concentración de estos aminoácidos con respecto al control (figura 2C).

En el caso de los aminoácidos minoritarios, citrulina (Cit), fenilalanina (Phe), isoleucina (Ile), tirosina (Tyr), metionina (Met), cisteína (Cys), ornitina (Orn) y glicina (Gly), aumentaron su concentración en el mosto con la aplicación de Rf1 (figura 2D). El contenido de asparagina (Asn) en las muestras aumentó tras la aplicación de ambas dosis de riboflavina, aunque la dosis Rf1 fue más efectiva que la Rf2. Con respecto a la lisina (Lys), su contenido en el mosto con el tratamiento Rf1 fue mayor que en las muestras control y no mostró diferencias significativas con la aplicación de Rf2 (figura 2D).

Tabla 1. Parámetros enológicos y nitrógeno fácilmente asimilable (NFA) de los mostos control y de los procedentes de las aplicaciones foliares con riboflavina, 100 g/ha (Rf1) y 200 g/ha (Rf2).

	Control	Rf1	Rf2
Peso de 100 bayas (g)	200 ± 10 a	209 ± 10 a	215 ± 28 a
Alcohol probable (% v/v)	12,0 ± 0,4 b	12,2 ± 0,4 b	11 ± 0 a
pH	3,48 ± 0,08 a	3,54 ± 0,06 a	3,52 ± 0,02 a
Acidez total (g/l)*	5,6 ± 0,6 a	5,2 ± 0,3 a	5,9 ± 0,2 a
Ácido málico (g/l)	2,4 ± 0,2 a	2,4 ± 0,3 a	3,0 ± 0,2 b
NFA (mg N/l)	228 ± 33 a	197 ± 17 a	208 ± 11 a
Intensidad colorante (IC)	2,6 ± 0,3 a	3,3 ± 0,4 b	3,08 ± 0,08 ab
Tonalidad	0,53 ± 0,09 a	0,60 ± 0,06 ab	0,68 ± 0,08 b
Índice de polifenoles totales (IPT)	11,6 ± 0,2 a	12,4 ± 0,9 a	12,0 ± 0,8 a

Todos los parámetros se muestran con su desviación estándar (n=3). Para cada parámetro, letras diferentes indican que hubo diferencias significativas entre las muestras ($p \leq 0,05$).

*En g/l de ácido tartárico.

Figura 2. Concentración de aminoácidos (mg/l) en los mostos control y en los procedentes de las aplicaciones foliares con las dosis de riboflavina, 100 g/ha (Rf1) y 200 g/ha (Rf2)



Las hojas de las cepas recibieron una solución acuosa de riboflavina. / Ch. Díez

Otros autores también han encontrado un aumento de la concentración de aminoácidos en el mosto cuando se aplicaron tratamientos foliares de diferentes fuentes de nitrógeno a los viñedos (Garde-Cerdán *et al.*, 2014; Gutiérrez-Gamboa *et al.*, 2017; Pérez-Álvarez *et al.*, 2017), o incluso cuando se utilizó un elicitador como tratamiento foliar (Garde-Cerdán *et al.*, 2016). Cabe destacar que con los tratamientos foliares con riboflavina, el número de aminoácidos que aumentó su concentración respecto al control fue mayor. En esta misma línea, junto con el aumento de la concentración individual de aminoácidos, la acumulación de Arg fue superior a la de Pro, mejorando el contenido en el mosto de nitrógeno asimilable, ya que la Pro es un aminoácido que las levaduras no son capaces de metabolizar en condiciones normales de fermentación (Bell y Henschke, 2005). Además, His, Trp, Tyr, Phe y Met son precursores, respectivamente, de histaminol, triptofol y tirosol, estos dos últimos con importante actividad antioxidante, 2-feniletanol, responsable de un agradable aroma a rosas y metionol, que confiere al vino notas a patata cocida.