



**CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA
TINTA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Fragoso García**

Dipòsit Legal: T-1532-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FT-MIR

Sandra Frago García

TESIS DOCTORAL

dirigida por las doctoras Montserrat Mestres Solé y Olga Busto Busto



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona 2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
I QUÍMICA ORGÁNICA

C/ Marcel·lí Domingo s/n
Campus Sescelades
43007 Tarragona
Tel. 34 977 55 97 69
Fax 34 977 55 84 46
e-mail: secqaq@urv.cat

Montserrat Mestres Solé, profesora agregada, y Olga Busto Busto, profesora titular del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de la Universidad Rovira i Virgili,

HACEMOS CONSTAR:

Que el presente trabajo, que lleva por título “*CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA FT-MIR*”, ha sido realizado, bajo nuestra dirección, por SANDRA FRAGOSO GARCÍA para la obtención del título de Doctora, en el Grupo de Química Analítica Enológica y de los Alimentos del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica de esta Universidad y que todos los resultados presentados son fruto de las experiencias realizadas por dicha doctoranda.

Tarragona, 24 de Mayo de 2011

Dra. Montserrat Mestres Solé

Dra. Olga Busto Busto

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011



Este trabajo ha constituido una de las líneas de investigación del Grupo de Química Analítica Enológica y de los Alimentos de la Universidad Rovira I Virgili. Todos los resultados que se presentan en esta memoria son fruto de los experimentos realizados en su laboratorio de la Facultad de Enología de Tarragona.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

Quiero agradecer en estas líneas a todas aquellas personas que han estado junto a mí en cada una de las etapas de la realización de esta Tesis Doctoral, brindándome su apoyo, cariño y ayuda, el hacer posible que llegara hasta aquí.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis tutoras de Tesis, Montserrat Mestres y Olga Busto, su confianza y dedicación en la revisión de este trabajo.

Olga, gracias por darme la oportunidad de realizar el doctorado y de poder vivir nuevas experiencias en esta ciudad, Tarragona, a la que llevaré siempre en mi corazón. Montse, gracias por tu trabajo infatigable, por tu dedicación y por tu capacidad de calmar las aguas cuando estaban revueltas. Gracias por empujar “esto” hacia adelante, buena parte del éxito de este trabajo es gracias a ti.

Gracias al Dr. Josep Guasch por introducirme en el análisis del vino, por compartir sus amplios conocimientos y por sus sabios consejos.

Gracias a la gente del laboratorio que ha estado conmigo durante estos años de andadura. A Laura y Luciano por compartir sus inquietudes y por los buenos ratos que pasamos. A mi tocaya, Sandra, porque aunque sólo hemos coincidido poquito tiempo, ha sido una magnífica compañía. Admiraré siempre su buen humor en todo momento.

También quisiera agradecer a los miembros del Departamento de Química Analítica y Química Orgánica que han estado dispuestos a ayudarme. Gracias a Ricard por su ayuda en la resolución de dudas cuando lo necesité. Hago extensivo mi agradecimiento a Santi, Joan y Jordi. Especialmente, gracias Jaume, por los años de amistad.

Mi más sentido agradecimiento a ti, Joe, primero por tu ayuda con la dura quimiometría y, más tarde, por tu amistad y cariño incondicional. Sé que tengo un amigo en Colombia que me espera con los brazos abiertos. Nunca he conocido a una persona tan generosa como tú. Gracias por tu apoyo en la distancia.

Mi agradecimiento a los enólogos y resto de personal de la bodega experimental “Mas dels Frares” por el tiempo que emplearon en resolver mis dudas a lo largo de la vendimia y por todos los favores prestados.

También quisiera agradecer a los profesores de la Licenciatura de Enología haberme descubierto el apasionante y complejo mundo del vino, que era desconocido para mí.

Mi compañera y amiga, Catalina, te agradezco todos los momentos que hemos pasado tanto dentro, como fuera de la Universidad. Siempre me has escuchado cuando lo he necesitado. ¡Tenemos pendientes muchas catas por hacer! No cambies, eres una persona excepcional.

A Marc, por tu aliento y paciencia en los últimos momentos. Quizá no hubiera llegado hasta aquí de no haberte conocido. Me has llenado de ilusión para emprender nuevos proyectos. Gracias, también, por cuidar de mí.

Y por supuesto, gracias a mi familia. Lo que soy es gracias a vosotros.

Papá, mamá y María, muchas gracias por haber soportado el vacío que dejé en casa al decidir dejar Madrid para probar cómo era la vida de investigador. Os he extrañado todos los días.

Gracias por darme todo vuestro apoyo y cariño en los momentos en los que cundió el desánimo. Siempre confiasteis en mi capacidad de trabajo, y aunque pasé por algunas crisis, sirvieron para reforzar mi deseo de llegar hasta el final. Sois mi mayor tesoro. Gracias también a ti, Juan, que ya eres parte de la familia, por tus ánimos desde la distancia y por estar al lado de María cuando falté. Sin vosotros, nada habría sido posible. ¡Os quiero!

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

A mi padre, a mi madre y a mi hermana.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Fragoso García
DL:T-1532-2011

*“La ciencia se compone de errores,
que a su vez, son los pasos hacia la verdad”*

Julio Verne

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

ÍNDICE

CAPÍTULO I. Presentación y objetivos	1
CAPÍTULO II. El color de la uva tinta y el vino	17
II.1. La composición fenólica de las uvas tintas	19
II.1.1 Antocianos	21
II.1.2 Taninos	24
II.1.3 Síntesis de los compuestos fenólicos	31
II.1.4 Factores vitícolas que influyen en la síntesis de los compuestos fenólicos	32
II.1.5 Evolución de los antocianos y taninos durante la maduración de la uva	33
II.2. La composición fenólica del vino tinto	36
II.2.1 Extracción de los compuestos fenólicos durante el proceso de vinificación en tinto	36
II.2.2 Prácticas enológicas durante la vinificación en tinto que influyen en la extracción de los compuestos fenólicos	39
II.2.2.1 Tiempo de maceración	39
II.2.2.2 Temperatura de fermentación	41
II.2.2.3 Uso de enzimas	42
II.2.2.4 Rotura del sombrero	43
II.2.2.5 Anhídrido sulfuroso	43
II.2.3 Propiedades químicas de los antocianos	43
II.2.3.1 En función del pH	44
II.2.3.2 En presencia de anhídrido sulfuroso	46
II.2.4 Evolución de los compuestos fenólicos en el vino a lo largo de su elaboración y envejecimiento	47
II.2.4.1 Reacciones enzimáticas	48
II.2.4.2 Interacciones químicas	50
II.2.5 Importancia de la proporción del contenido de antocianos y taninos sobre la capacidad de envejecimiento de un vino tinto	60
II.3 Bibliografía	63
CAPÍTULO III. Criterios para determinar la madurez óptima de la uva tinta	73
III.1. Índices de madurez de la uva	75
III.2. La madurez fenólica	77
III.2.1 Métodos para determinar el contenido fenólico de las uvas	78
III.2.1.1 Métodos que analizan la uva entera	87
III.2.1.2 Métodos que analizan las diferentes partes de la uva	99
III.3. Determinaciones espectrofotométricas en el análisis del color y de los compuestos fenólicos	101
III.3.1 Parámetros cromáticos	102
III.3.1.1 Intensidad colorante	102
III.3.1.2 Tonalidad	104
III.3.1.3 Componentes del color	104
III.3.2 Análisis de los compuestos fenólicos	104
III.3.2.1 Compuestos fenólicos totales	105
III.3.2.2 Antocianos totales	108
III.3.2.3 Taninos	111
III.4. Parte experimental	117
III.4.1 Presentación	117
III.4.2 Materiales y métodos	120
III.4.3 Resultados y discusión	140

III.4.3.1 Comparación de tres métodos de extracción de uva	140
III.4.3.2 Optimización de un método de extracción de la uva	149
III.4.3.3 Predicción del color y de la composición fenólica del vino a partir del análisis de uvas	164
III.4.4 Conclusiones	180
III.5. Bibliografía	183
CAPÍTULO IV. Control de la maduración fenólica de la uva y la vinificación en tinto mediante FT-MIR	199
IV.1. Espectroscopia de infrarrojo	201
IV.1.1 Aspectos fundamentales	202
IV.1.2. Fundamento de la radiación MIR	204
IV.1.3 Asignación de bandas	205
IV.1.4 Espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-MIR)	208
IV.2 Aplicación de la espectroscopia FT-MIR en el análisis de uvas y vinos tintos	213
IV.3. La Quimiometría y el desarrollo de modelos PLS	221
IV.3.1 Calibración multivariante	222
IV.3.2 Descomposición en componentes principales (PCA)	225
IV.3.3 Selección de muestras para la calibración	228
IV.3.4 Creación del modelo de calibración	230
IV.3.5 Validación del modelo de calibración	232
IV.4. Parte experimental	235
IV.4.1 Presentación	235
IV.4.2 Materiales y métodos	237
IV.4.3 Resultados y discusión	245
IV.4.3.1 Seguimiento de la madurez fenólica de las uvas tintas mediante FT-MIR	245
IV.4.3.2 Seguimiento de la extracción de los compuestos fenólicos durante la vinificación en tinto mediante FT-MIR	263
IV.4.4 Conclusiones	285
IV.5 Bibliografía	287
CAPÍTULO V. Conclusiones generales	299
ANEXOS	
Anexo 1. Comparison of three extraction methods used to evaluate phenolic ripening in red grapes: <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 58 (2010) 4071-4076	305
Anexo 2. Estudio y optimización de un método analítico para la estimación de los parámetros de madurez fenólica de la uva tinta: <i>Enólogos</i> , 58 (2009) 38-43	313
Anexo 3. Prediction of red wine colour and phenolic parameters from the analysis of its grape extract: <i>International Journal of Food Science and Technology</i> (pendiente de publicación)	321
Anexo 4. Application of FT-MIR spectroscopy for a fast control of red grape phenolic ripening: <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> , 59 (2011) 2175-2183	333
Anexo 5. Quantification of phenolic compounds along red winemaking using FT-MIR spectroscopy and PLS-regression: <i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i> (pendiente de publicación)	343
Anexo 6. Contribuciones a congresos	353

CAPÍTULO I

Presentación y objetivos



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

I.1 Presentación

La viña, planta colonizadora y vehículo de civilización, y el vino, bebida mágica asociada desde siempre a la inmortalidad, están presentes en las culturas más antiguas que se conocen, como demuestra la existencia de la palabra “vino” en todas las lenguas indoeuropeas. De hecho, la cultura del vino, ha contribuido significativamente al progreso de las civilizaciones distribuidas por todo el área del Mediterráneo.

Diversas teorías científicas pretenden explicar el origen de la viña, de su domesticación y de datar el momento histórico en el que el hombre elaboró vino por primera vez. Su cultivo se sitúa originariamente en las faldas del Cáucaso (Armenia, Georgia), extendiéndose por Oriente hasta llegar a China y la India y por Occidente hacia el Mediterráneo (1). Aquí fue donde habitaron los primeros pueblos que aprendieron a ser viticultores, hasta llegar a la máxima expresión de pueblo devoto del vino que fue Grecia.

Sin embargo, es a Roma a quien corresponde el honor de haber sido la gran difusora de la cultura del vino, con la expansión del Imperio romano por toda Europa. Alrededor del año 200 a.C., el vino en Roma se convirtió en un producto lujoso y de prestigio, comenzándose a clasificar según la procedencia y añada. Los vinos eran muy densos (se hervían) y se rebajaban con agua a la hora de servir. En algunas ocasiones se realizaban maceraciones en hierbas aromáticas, similares al procedimiento de obtención del vermut. Los esclavos y legionarios sólo tenían derecho a beber una mezcla de vino avinagrado rebajado con agua llamado “posca”, que se aderezaba con miel (2). Aquellos vinos resultarían imbebibles para los paladares de los consumidores actuales.

Ya en la Edad Media, se continuaba bebiendo el vino mezclado con agua y, en la mayoría de los casos, los vinos se convertían en vinagre al llegar la primavera (3), lo que demuestra que el almacenamiento de esta bebida era una cuestión que quedaba aun por resolver. La protección contra la oxidación era muy pobre y el uso de sulfuroso era aun desconocido. A pesar de ello se empleaban algunas técnicas con el objeto de aumentar la vida del vino, como recubrir los recipientes con brea, el empleo de resinas, el uso de saborizantes que enmascarasen el sabor del vino avinagrado, etc.

No fue hasta el año 1863 cuando el emperador francés, Luis Napoleón, solicitó al químico Louis Pasteur que estudiase las razones por las que se estropeaban los vinos, ya que estaba causando grandes daños a la economía francesa.

Tres años después Pasteur publicó "Études sur le vin" (4) demostrando por vez primera que existían las levaduras, seres vivos microscópicos que gobernaban los procesos de fermentación alcohólica, y cómo el control de estos organismos hacía que se pudiese controlar la degradación del vino. Dicho de otra manera, Pasteur fue el primero en determinar el papel central del oxígeno en la elaboración del vino.



Figura I.1. Louis Pasteur en su laboratorio, pintado por A. Edelfeldt en 1885

Esta nueva visión fundamentó que la enología empezara a cobrar una visión científica acerca de sus procesos. Puede decirse que con Pasteur nació la ciencia de la enología, combinando el estudio de procesos del ámbito de la biología y la química. A partir de entonces, se comenzaron a estudiar y a perfeccionar los procesos de elaboración y conservación del vino que garantizarían su máxima calidad.

El concepto de calidad de cualquier alimento, no olvidemos que el vino es considerado un alimento (5), engloba tanto conceptos higiénico-sanitarios,

nutritivos y tecnológicos, como organolépticos. Éstos últimos hacen referencia a los atributos sensoriales de color, aspecto, sabor, textura, aroma, etc., los cuales.

En este sentido, el análisis sensorial de un vino, el cual se define como el conjunto de métodos y técnicas que permiten identificar, percibir y apreciar a través de los órganos de los sentidos, un cierto número de sus propiedades (6), es un instrumento muy importante para las bodegas para conocer la aceptación de sus productos por parte de los consumidores.

El análisis instrumental es un complemento al análisis sensorial, ya que permite detectar y reconocer compuestos que no son percibidos en la degustación. Además, a través del análisis instrumental es posible conocer si los niveles de los constituyentes de un vino se sitúan dentro del marco legal de protección de la salud del consumidor, por lo que no puede separarse de su análisis sensorial. La tecnología puede ayudar al análisis sensorial, pero nunca podrá reemplazarla, ya que no detecta la armonía de los constituyentes de un vino.

El vino ha pasado de ser una bebida consumida cotidianamente en el hogar a ser actualmente un elemento de ocio y sociabilidad que se disfruta en compañía, siendo los restaurantes y las celebraciones, los marcos más atractivos para su consumo. Es importante recalcar la componente hedónica que tiene el vino, las sensaciones de placer y estimulación que provocan en el consumidor al degustarlo.

La percepción humana del mundo es fundamentalmente visual (7), de ahí que sean el color y la apariencia el primer contacto que tiene el consumidor con el vino, condicionando e influenciando su elección.

El color de un vino está condicionado por un gran número de factores como la variedad de uva, el tipo de producto, el modo de elaboración o su edad. En cualquier caso, el color de un vino depende de su composición química por lo que, es uno de los factores más determinantes a la hora de caracterizarlo.

El vino blanco puede presentar una gama de colores desde el amarillo pálido al caramelo según la intensidad de la maceración y grado de oxidación. Los reflejos verdes indican que se trata de un vino blanco joven, y este color va evolucionando durante el envejecimiento. Si el envejecimiento tiene lugar en un ambiente reductor, protegido del aire, vira hacia un tono amarillo dorado, mientras que en contacto con el aire lo hace hacia tonos marrones. Los vinos blancos licorosos se vuelven de color ámbar con el tiempo; los de Madeira, por ejemplo, se vuelven de color caoba.

El color de los vinos rosados depende de su juventud, y su intensidad está condicionada por el tipo de vinificación: los obtenidos por vinificación en blanco contendrán muy pocos antocianos y su color será menos intenso, mientras que los que se han obtenido mediante una corta maceración tendrán una mayor intensidad de color debido a la mayor concentración de antocianos. Con el envejecimiento, el color del vino rosado pasa del color rosa fresa hacia tonos más pálidos, hasta alcanzar el característico color llamado “piel de cebolla”.

En los vinos tintos se pueden encontrar casi todos los tonos rojos, desde tonalidades moradas propias de un vino joven hasta tonalidades cereza propias de un vino de crianza, o teja de los muy envejecidos. Además, el color del vino tinto puede proporcionarnos una idea no sólo de su edad, sino de su estado de conservación e incluso de si posee algún defecto. El estudio del color del vino tinto ha cobrado mucha importancia en los últimos años, centrándose en el conocimiento de los compuestos responsables del mismo y de su estabilidad a lo largo del tiempo.

Además del color, el grado de limpidez y vivacidad del vino, que hacen referencia al aspecto del mismo, complementan el examen visual. Así podemos enriquecer la descripción visual con adjetivos tales como brillante, luminoso, pálido, mate, etc.

Por todo ello, el color del vino aporta mucha información sobre su calidad. Una discordancia entre el color que presenta un vino y el que cabría esperar según la edad del mismo es motivo suficiente para rechazarlo, más

aún si esta circunstancia se acompaña de la falta de calidad en otros atributos sensoriales.

En las bodegas, conscientes de esta importancia, cada vez es mayor el interés por conocer y controlar los factores que condicionan el color del vino tinto, para poder asegurar una adecuada intensidad y evolución del color a lo largo de su almacenamiento. Hasta no hace muchos años, este conocimiento era básicamente empírico y, por consiguiente, las intervenciones técnicas eran muy limitadas. En la actualidad, se han producido avances significativos en el conocimiento científico sobre la materia colorante de los vinos tintos, lo que ha propiciado un avance tecnológico notable.

El color del vino tinto depende en buena medida del estado de maduración de las uvas con las que se elabora, que determina su contenido en antocianos, así como del proceso de vinificación empleado (8).

El estado de maduración de las uvas condicionará la fecha de la vendimia, por lo que es necesario realizar controles de maduración que permitan establecer el momento óptimo de madurez (9).

Hasta hace poco, la madurez de la uva se determinaba por la relación de azúcares y acidez de la pulpa (madurez tecnológica) a partir de la cual se extrae el mosto. Tras la fermentación, los azúcares y ácidos confieren al vino su característico equilibrio alcohol-acidez. El control de madurez tecnológica en el viñedo se realiza de forma simple y rápida, determinando el contenido de azúcares por refractometría del mosto, la acidez total por valoración ácido-base del mosto y su pH por potenciometría (10), existiendo equipos automáticos para la medida de estos parámetros.

Actualmente, para definir el estado de maduración de las uvas tintas es necesario valorar, además, su contenido en compuestos fenólicos, especialmente en antocianos y taninos, pues son los compuestos responsables del color y el cuerpo del vino (11). Este parámetro es lo que se denomina madurez fenólica. Para determinar el contenido fenólico de las uvas es necesaria una etapa de pretratamiento de la muestra previa al análisis propiamente dicho, que consiste en someter a las uvas a un proceso acelerado

de extracción de los compuestos fenólicos localizados en la piel y en las pepitas de la uva. Además, para que este método de evaluación de la madurez fenólica sea fiable, el método de extracción debería reproducir lo que ocurre en el depósito de fermentación y los resultados aportados deberían tener una correlación con los vinos obtenidos a partir de las mismas uvas.

Las metodologías empleadas en bodegas para medir los compuestos fenólicos se basan en la espectrofotometría UV-Vis, que es una técnica sencilla, pero lenta cuando hay que analizar muchas muestras a la vez.

Entre los grandes avances de la instrumentación analítica, destaca la espectroscopia de infrarrojo medio con transformada de Fourier (FT-MIR), la cual ha demostrado ser una técnica con gran potencial tanto para la investigación científica como para la industria (12). Los equipos basados en esta técnica aportan gran cantidad de información en un tiempo de análisis mínimo, inferior a un minuto.

Los equipos FT-MIR ya se están utilizando en las grandes bodegas para el análisis rutinario de algunos parámetros del vino, como son el grado alcohólico, los azúcares reductores, la acidez...(13,14). La fiabilidad de los resultados aportados con ella dependen de la robustez y trazabilidad con las que se hayan construido los modelos de calibración, por lo que es recomendable evaluar los modelos facilitados por el fabricante y que sea cada bodega la que compruebe y cree sus propios modelos de calibración empleando muestras representativas a modo de patrones de calibración.

La técnica FT-MIR también se aplica actualmente en el control de vendimia, pero su uso se centra fundamentalmente en el control de la madurez tecnológica de la uva, es decir, del contenido en azúcares (y consecuentemente del grado alcohólico probable) y de la acidez total del mosto. De manera particular, el FT-MIR también puede emplearse en el análisis de algunos compuestos relacionados con el estado sanitario de la vendimia (15).

Sin embargo, dado que no existe una metodología rápida y fiable basada en el FT-MIR para evaluar el contenido de compuestos fenólicos en uvas durante la vendimia ni tampoco para monitorizar la extracción de estos

compuestos en los depósitos de fermentación, el grupo de *Química Analítica Enològica i dels Aliments* de la *Universitat Rovira i Virgili (URV)* consideró interesante abrir una línea de investigación dedicada a dicho propósito.

Teniendo en cuenta que en la bibliografía existen diferentes métodos de extracción de la uva para el estudio de estos compuestos, se pensó que la primera etapa del trabajo de investigación debería centrarse en el tratamiento de la muestra (la uva) para desarrollar un método de análisis de rutina repetitivo, rápido, fiable y que fuese de fácil implementación en bodega.

Así fue como empezó a perfilarse esta Tesis Doctoral que se ha desarrollado a caballo entre el Laboratorio de Investigación 323 del *Dpto. de Química Analítica y Química Orgánica* y en la *Finca y Bodega Experimental "Mas dels Frares"* (en el término municipal de Constantí, en Tarragona), pertenecientes a la *Facultad de Enología* de Tarragona de la *Universitat Rovira i Virgili*.

La memoria de esta Tesis Doctoral está estructurada de manera que los distintos capítulos (exceptuando el Capítulo II) muestran una primera parte introductoria, a continuación la descripción de la parte experimental donde se detalla y discute el proceso que ha dado lugar a los trabajos publicados, los cuales se recogen en los Anexos 1-5, al final de la Tesis, y por último las conclusiones a las que ha dado lugar los estudios realizados en cada capítulo. Asimismo, en el Anexo 6 se pueden encontrar las contribuciones a los congresos a las que ha dado lugar toda la investigación.

El Capítulo II proporciona una visión general de los compuestos fenólicos responsables del color de la uva y el vino y los factores que más condicionan su presencia y proporción en este mismo. El capítulo se inicia con la clasificación de los compuestos fenólicos y una descripción de éstos, incluyendo su localización en las diferentes partes de la baya, así como el proceso de síntesis y factores que lo favorecen y la evolución que presentan a la largo de la maduración de la uva.

El capítulo continúa con la descripción de los factores más influyentes en el proceso de extracción de los compuestos fenólicos de la uva durante la

vinificación en tinto, la evolución que sufren estos compuestos a lo largo del envejecimiento del vino y el papel que desempeña el equilibrio entre los diferentes compuestos fenólicos (antocianos y taninos) en la estabilidad de su color a lo largo del tiempo.

El Capítulo III comienza con una parte teórica introductoria donde se presenta una revisión bibliográfica de los métodos de pre-tratamiento de la uva para la cuantificación de los compuestos fenólicos, así como las determinaciones analíticas basadas en la espectrofotometría UV-Vis para evaluar sus parámetros fenólicos y cromáticos para el seguimiento de su madurez fenólica.

La segunda parte del Capítulo III constituye la parte experimental. En él se detalla en primer lugar el estudio de comparación de tres de los métodos más utilizados por el sector enológico con el fin de conocer sus propiedades, y de si era posible establecer correspondencias entre ellos mediante regresión lineal, con el fin de establecer equivalencias que permitiesen transformar los resultados proporcionados por laboratorios que emplean diferentes metodologías.

El siguiente estudio se centró en evaluar las variables más determinantes en la extracción eficaz de los compuestos fenólicos de interés para poner a punto un método de extracción de la uva que fuera rápido, preciso y fiable para poder ser implantado en bodega. También se realizó un estudio de conservación de muestras derivado de la necesidad de mantener las propiedades de las uvas intactas hasta su análisis.

Tras optimizar el método de extracción con el que determinar el contenido fenólico de la uva, el último estudio recogido en el Capítulo III se centró en evaluar la capacidad predictiva del método de extracción optimizado de las propiedades cromáticas y composición fenólica del vino obtenido mediante las correlaciones obtenidas entre los extractos de uva y sus correspondientes vinos.

El Capítulo IV comienza con una parte teórica introductoria donde se presenta el método de análisis rápido basado en la espectroscopia de infrarrojo

con transformada de Fourier (FT-MIR), las técnicas quimiométricas empleadas en el tratamiento de datos, así como una revisión bibliográfica sobre el empleo de la técnica FT-MIR en el análisis de uvas y vinos.

La segunda parte del Capítulo IV constituye la parte experimental. Comienza con el estudio donde se detalla el desarrollo de modelos de calibración multivariante, basados en la regresión PLS entre la respuesta de la espectroscopia FT-MIR y la respuesta de la espectrofotometría UV-Vis como técnica de referencia, que permiten el seguimiento de la madurez fenólica mediante la cuantificación de los compuestos fenólicos en extractos de uva de forma rápida y fiable.

El segundo estudio del Capítulo IV consistió en emplear la técnica FT-MIR empleada en el seguimiento de la madurez fenólica para monitorizar la extracción de los compuestos fenólicos procedentes de la uva durante la vinificación en tinto.

Para acabar, en el Capítulo V se recogen las conclusiones generales a las que se ha llegado a partir de los resultados obtenidos durante la experimentación realizada.

I.2 Objetivos

El mercado actual del vino tinto de alta calidad demanda vinos de mucho color y cuerpo, sin resultar demasiado duros y astringentes. Para producir este tipo de vino es necesario que la uva presente los adecuados niveles de madurez y calidad, por tanto, estos criterios son lo que deben emplearse para determinar la fecha de la vendimia.

Los compuestos fenólicos son los responsables del color del vino y también contribuyen a su estructura y a la estabilización del color durante su almacenamiento. Si las uvas no alcanzan un adecuado grado de madurez fenólica, los vinos acostumbran a ser poco coloreados y demasiado duros.

Se hace necesario, por tanto, realizar un seguimiento del estado de madurez fenólica de las uvas durante su desarrollo para decidir el momento óptimo de vendimia.

Durante los últimos años se han descrito diversas metodologías para la determinación de la madurez fenólica. No obstante, todas estas metodologías proporcionan resultados que no siempre reflejan lo que después ocurrirá durante la vinificación. La fase de extracción es crucial, ya que en ella se pretende reproducir de forma acelerada el proceso de solubilización de los compuestos fenólicos que tendrá lugar en el depósito de fermentación. Este es probablemente el factor determinante de todas las metodologías, ya que no se trata de extraer todo aquello que la uva contiene, sino de extraer sólo lo que el futuro vino tendrá. Por lo tanto, la fiabilidad del método de extracción adoptado en los controles de maduración fenólica de la uva depende sobremanera del resultado que obtengamos en los vinos finales.

La concentración de los compuestos fenólicos en el vino depende no sólo de la materia prima, la uva, sino también del modelo de vinificación que apliquemos. De ahí el interés de encontrar métodos rápidos que permitan valorar en tiempo real el contenido fenólico de la uva, y seguir la extracción de los compuestos fenólicos durante la vinificación.

Respecto a la técnica analítica, la tradicionalmente empleada en bodega para determinar estos compuestos es la espectrofotométrica, basada en las medidas de absorbancia de la muestra a longitudes de onda específicas. Esta técnica es rápida y sencilla, pero resulta difícil de automatizar cuando se precisa analizar un elevado número de muestras, por el tratamiento que requiere la muestra.

En los últimos tiempos, el uso de técnicas espectroscópicas como la espectroscopia de infrarrojo medio con transformada de Fourier (FT-MIR), ha emergido como una poderosa herramienta analítica no destructiva que permite realizar análisis de múltiples compuestos en un elevado número de muestras de una manera rápida y automatizada.

La espectroscopia infrarroja requiere el empleo conjunto de técnicas quimiométricas de calibración multivariante para el tratamiento de los datos. El método de calibración multivariante más utilizado es el de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

Aunque existen bodegas que ya emplean equipos FT-MIR en sus laboratorios para la cuantificación de diversos parámetros en la uva y el vino, los modelos de calibración comerciales proporcionados para la cuantificación de los compuestos fenólicos no resultan satisfactorios.

Esto se debe a que las muestras empleadas en la construcción de esos modelos proceden de variedades de uva y regiones vitícolas concretas, que otorgan características propias a la matriz de la muestra, y que no tienen por qué ser similares a las de nuestras muestras.

Por tanto es preciso desarrollar nuevos modelos de calibración utilizando un número suficiente de muestras representativas como para asegurar que el método contemplará la variabilidad típica de las muestras que se pretenden analizar. Conviene destacar que para la calibración de un equipo FT-MIR no se pueden preparar soluciones de patrones comerciales puros, ya que la matriz de estos diferiría de las de las muestras a analizar.

A parte del control de maduración, para las bodegas es de vital importancia controlar las fermentaciones que transcurren en los depósitos, con el objetivo de comprobar que se desarrollan satisfactoriamente y poder establecer el final de la extracción de los compuestos fenólicos. Este aspecto es importante porque si se prolonga la etapa de maceración durante demasiado tiempo puede producirse un aumento de la acidez volátil, del amargor y de los aromas herbáceos. Además, el conocimiento de la composición fenólica del vino permite determinar su calidad y capacidad para envejecer.

A partir de todas estas premisas, los objetivos del presente trabajo de investigación fueron:

1. Desarrollar un método de análisis de la uva para determinar su madurez fenólica de manera que se dispusiera de una herramienta que permitiera establecer la fecha de vendimia con más criterio.

2. Aplicar la técnica FT-MIR para reproducir los valores de los parámetros de madurez fenólica determinados con el método desarrollado anteriormente. De este modo se podría disponer de una técnica rápida para hacer el seguimiento de este parámetro.

3. Estudiar la posibilidad de predecir los parámetros fenólicos del vino a partir de los parámetros fenólicos medidos en la uva a través de la técnica rápida FT-MIR.

I.2 Bibliografía

- (1) Puig i Vayreda E. La Cultura del vi. Barcelona: UOC; 2007.
- (2) Fatás Cabeza G. Agua, sal, pan, vino y aceite en Roma: Discurso de ingreso en la Academia Aragonesa de Gastronomía; 2002.
- (3) Jackson RS. Wine science: principles and applications. San Diego: Academic Press; 1994.
- (4) Pasteur L. Études sur le vin, ses maladies, causes qui les provoquent, procédés nouveaux pour le conserver et pour le vieillir. Paris; 1866.
- (5) BOE núm. 165. LEY 24/2003, de 10 de julio, de la Viña y del Vino; 2003.
- (6) Aleixandre Benavent JL, Universitat Politècnica de València. La Cultura del vino: cata y degustación. Valencia: Universidad Politècnica de Valencia. Departamento de Tecnología de Alimentos; 2006.
- (7) Vidal A. Olores y perfumes. Industria farmacéutica: Equipos, procesos y tecnología 1992; 1: 97-101.
- (8) Zamora Marín F. Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. Madrid: A. Madrid Vicente; 2003.
- (9) Barceló JM. La gestion de la maturation: le premier acte œnologique. Incidence sur les profils de vins de Syrah dans les Côtes du Rhône. *Revue Française d'Œnologie* 1997; 165: 24-26.
- (10) Watson B. Evaluation of winegrape maturity. Corvallis, Oregon: Hellman E.W.; 1999.
- (11) Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. Handbook of enology, Vol 2. The chemistry of wine, stabilization and treatments. Chichester: John Wiley & Sons; 1999.
- (12) Sun D. Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Amsterdam: Academic Press; 2009.
- (13) Bauer R, Nieuwoudt H, Bauer FF, Kossmann J, Koch KR, Esbensen KH. FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. *Analytical chemistry* 2008; 80: 1371-1379.
- (14) Patz CD, Blieke A, Ristow R, Dietrich H. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica Chimica Acta* 2004; 513: 81-89.
- (15) Versari A, Parpinello GP, Mattioli AU, Galassi S. Determination of grape quality at harvest using Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 2008; 59: 317-322.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

CAPÍTULO II

El color de la uva tinta y el vino



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

El color es una de las propiedades organolépticas más importantes del vino. En consecuencia, influye de manera decisiva en la aceptación del producto por parte del consumidor. El color del vino depende de varios factores como son el estado de maduración de las uvas con que se ha elaborado, de las técnicas enológicas empleadas, de su estado de conservación, tiempo de crianza, etc. Por todo ello, el color es uno de los parámetros más determinantes a la hora de caracterizar un vino tinto.

II.1 La composición fenólica de las uvas tintas

Los compuestos fenólicos presentes en la uva tinta representan una amplia familia de moléculas que desempeñan un importante papel en enología, por su contribución en los atributos sensoriales del vino tinto, como el color, las propiedades gustativas (cuerpo, astringencia, y amargor), y su capacidad de envejecimiento (1).

Desde el punto de vista químico, los compuestos fenólicos se caracterizan por tener un anillo fenólico al que se unen sustituyentes de diferente naturaleza química. Su reactividad se debe al carácter ácido de la función fenólica y al carácter nucleofílico del anillo (2).

Los compuestos fenólicos se clasifican en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides. Se hace esta distinción en función de si derivan o no de la estructura del anillo de flavano (Figura II.1).

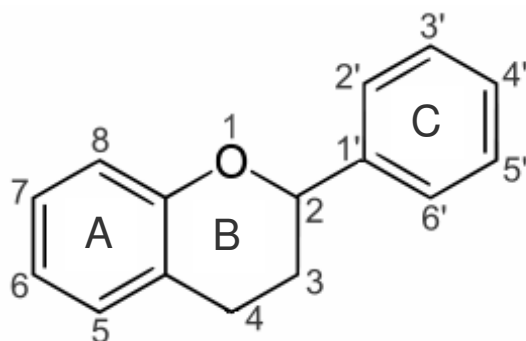


Figura II.1. Anillo de flavano

El anillo de flavano posee dos anillos bencénicos (A y C) agrupados con un oxígeno y unidos por una cadena de tres átomos de carbono que suele cerrarse formando el ciclo del pirano (B).

La Tabla II.1 muestra las diferentes familias de compuestos fenólicos presentes en el racimo de uva, divididas en dos grandes grupos en función de su estructura química: flavonoides y no flavonoides. En la Figura II.2 se muestra su distribución en las diferentes partes del racimo.

Tabla II.1. Clasificación de los compuestos fenólicos presentes en la uva

No Flavonoides	Flavonoides
Ácidos fenólicos - Ácidos benzoicos - Ácidos cinámicos	Flavonoles Flavanonoles y Flavonas Antocianos
Estilbenos	Flavanoles - Catequinas - Taninos condensados - Procianidinas - Prodelfinidinas

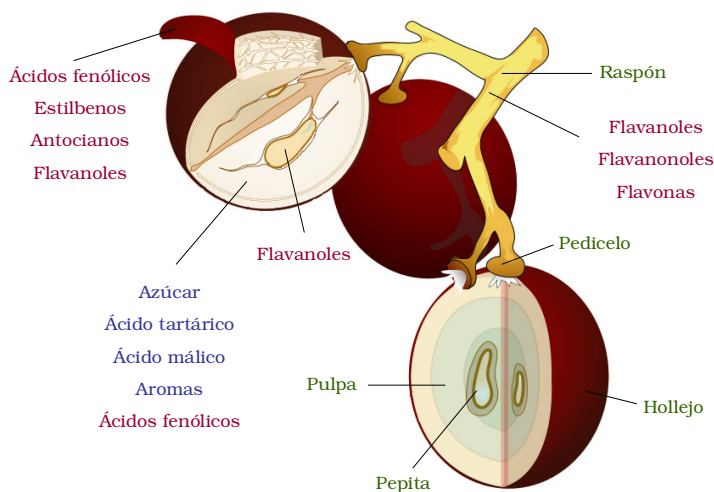


Figura II.2. Localización de los diferentes compuestos fenólicos en el racimo

Los ácidos fenólicos se pueden encontrar tanto en las pieles como en la pulpa (3), pero desde el punto de vista cuantitativo y organoléptico estos compuestos no son relevantes.

La presencia de los estilbenos se limita a las pieles (4) y aunque desde el punto de vista organoléptico no son significativos, debido a su potencial anticarcinogénico y efectos neuroprotectores, se les atribuye un papel importante en la salud humana (5).

Los flavonoles son los responsables del color amarillo de las pieles de las variedades blancas, por lo que se encuentran fundamentalmente en las pieles (6), aunque también se han detectado en la pulpa (7).

Los antocianos son los pigmentos responsables del color púrpura de la piel de las uvas tintas y naturalmente del color del vino tinto, por lo que se localizan en la piel de la baya (8), aunque excepcionalmente también pueden encontrarse en la pulpa de las variedades tintoreras (9), siendo éstas muy ricas en color.

Los flavanoles se encuentran repartidos en las partes sólidas de la uva: piel, pepitas y raspón (10-13), mientras que los flavanones y flavonas se han identificado en la piel de la uva blanca (14) y en el raspón (13).

Finalmente, merecen especial distinción los antocianos y los taninos condensados, por ser los compuestos más relevantes en relación al color del vino tinto y a su estabilidad durante su envejecimiento. Además, los taninos también son responsables de las sensaciones gustativas del vino. Por ello, el estudio de ambos tipos de compuestos presenta mucha importancia para el sector enológico.

II.1.1 Antocianos

Los antocianos -del griego *anthos* (flor) y *kyanos* (azul)- reciben este nombre cuando están bajo la forma heterósida (unidos por enlace glucosídico en posición 3 a una molécula de glucosa), que es la que se encuentra en las uvas de las variedades tintas de *Vitis vinífera*. Sin embargo, cuando están bajo

forma libre (aglicona) (15) se denominan antocianinas, aunque éstas son formas inestables.

Se distinguen cinco tipos de moléculas de antocianinas, en función de los sustituyentes R_1 y R_2 (Figura II.3). En el género *Vitis* el antociano mayoritario es la malvidina-3-glucósido (16-18). En otras especies del mismo género, como *Vitis rupestris* o *Vitis riparia*, los antocianos se encuentran como diglucósidos, con moléculas de glucosa en las posiciones 3 y 5.

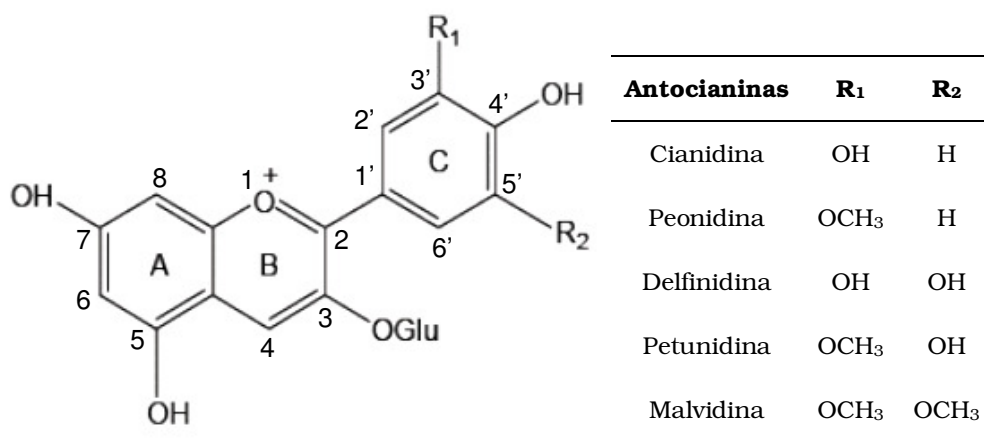


Figura II.3. Estructura química de los antocianos de *Vitis vinifera*

Existe otra categoría de antocianos en la uva, denominada antocianos acilados, que se caracterizan porque en ellos la molécula de glucosa está esterificada por un ácido fenólico, generalmente cafeico o p-cumárico (19) (Figura II.4).

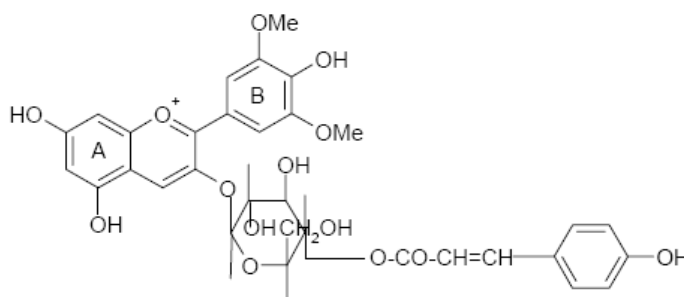


Figura II.4 Estructura del p-cumarato-3-monoglucósido de malvidina

En el vino la complejidad de la composición antociánica aumenta aun más debido a la combinación de los antocianos con ciertas moléculas, como el ácido acético, el pirúvico, el vinilfenol, el acetaldehído, los vinilflavanoles, etc., que se producen durante la fermentación y crianza en barricas (20,21). Esta variabilidad estructural permite discriminar variedades por su perfil antociánico (22,23), así como la caracterización de determinados vinos (24-26).

En la uva, los antocianos se encuentran en cantidades entre 500 y 3000 mg/Kg (27), en el vino rosado entre 35 y 160 mg/L (28) y en el vino tinto entre 300 y 800 mg/L (29,30), aunque puede ser incluso menor, en función de la variedad (31,32).

Los antocianos son compuestos solubles en agua localizados en las vacuolas de las células de la piel de las variedades tintas. A medida que las uvas maduran, los antocianos ocupan un mayor espacio dentro de la vacuola, incrementando su tamaño, en detrimento del citoplasma. En los casos excepcionales de las variedades tintoreras, estos compuestos también están presentes en la pulpa, dando variedades muy ricas en color. Cabe decir, que los antocianos también están presentes en las hojas, en especial al final de la etapa de crecimiento, cuando las hojas se vuelven rojas antes de su caída (33), y que como es lógico, estos compuestos están ausentes en las variedades de uva blanca.

Si consideramos que la piel de uva está constituida por entre 5 y 6 capas celulares, estos pigmentos se sitúan en las vacuolas de las células localizadas en la hipodermis, entre la 1ª y 4ª capa de células (34), de manera que se produce un gradiente de concentración positiva desde el exterior hacia el interior de las uvas (Figura II.5).

Existen estudios sobre dónde se origina la síntesis de los antocianos (35-37) según los cuáles ésta se inicia dentro de unas vesículas esféricas denominadas antocianoplastos situadas en el citoplasma. Una vez que se forman los antocianos dentro de los antocianoplastos, éstas vesículas aumentan su tamaño y durante la maduración, los antocianos migran hacia la vacuola, donde se acumulan, volviéndola más pigmentada.

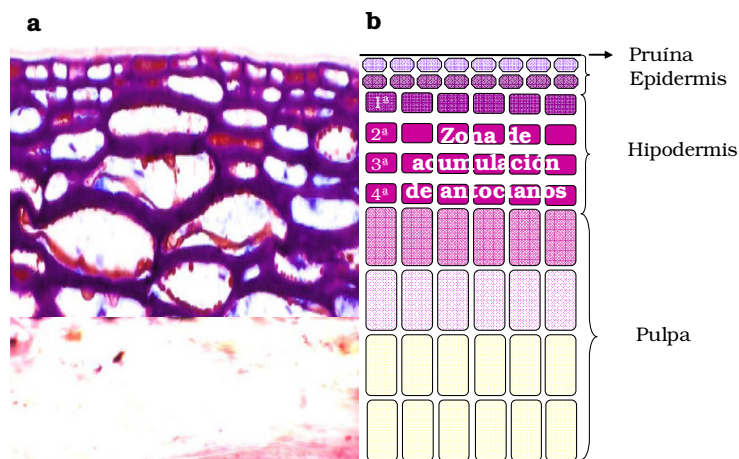


Figura II.5. Sección transversal de la piel de la uva tinta (a) y estructura esquemática de los tejidos de la piel (b)

II.1.2 Taninos

Los taninos representan una compleja familia dentro de los flavanoles (31), y está compuesta por cuatro tipos principales: galotaninos, elagitaninos, taninos complejos y taninos condensados (38). La Figura II.6 muestra la clasificación de los taninos que existen en la naturaleza.

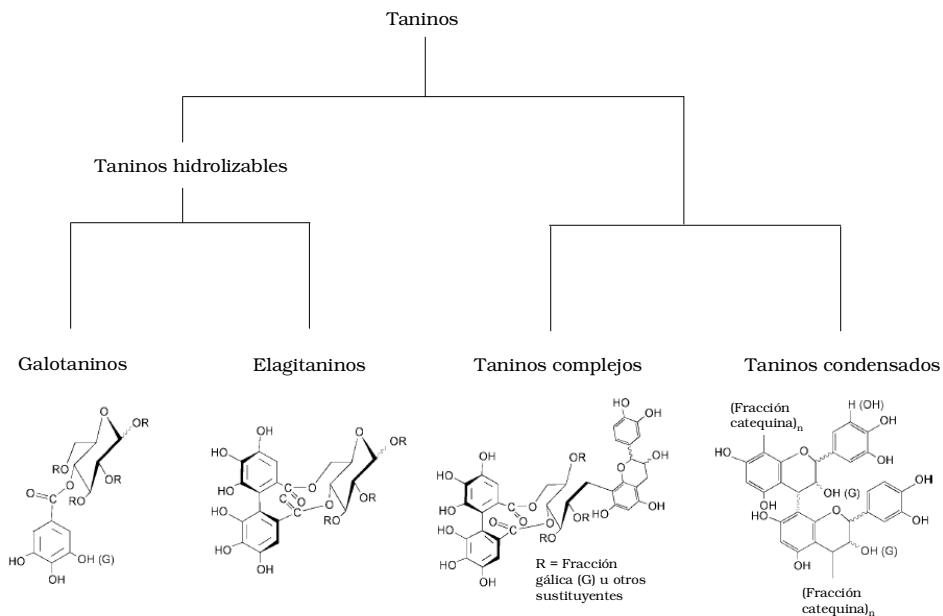


Figura II.6. Clasificación de los taninos (38)

Los galotaninos y elagitaninos conforman el grupo de los taninos hidrolizables y se pueden encontrar en los vinos de crianza debido a que su origen es la propia madera de las barricas. Estos taninos son polímeros de unidades de ácido gálico o elágico esterificado con glucosa y presentan la característica de hidrolizarse añadiendo ácido, agua caliente o tanasas.

Sin embargo, hay elagitaninos que no son hidrolizables debido a una unión C-C adicional entre su unidad de catequina con un resto glucosídico unido a otra unidad de galotanino o elagitanino. A este tipo de taninos se les denomina taninos complejos (38), por no entrar dentro de las otras clasificaciones.

Desde el punto de vista enológico, los más importantes son los taninos condensados, ya que provienen de la uva. Se encuentran distribuidos en las partes sólidas (piel, pepitas y raspón) en elevadas concentraciones y desempeñan un papel importante en las propiedades organolépticas del vino tinto, como la estabilidad del color y las propiedades gustativas relativas al cuerpo y a la astringencia.

Los taninos condensados son un grupo heterogéneo de compuestos formado por la condensación de dos o más unidades de flavanol, unidos entre sí mediante enlaces carbono-carbono. De acuerdo al número de unidades de flavanol elementales que entran a formar parte de su estructura, se suele distinguir entre taninos oligómeros (hasta cinco unidades) y polímeros (más de cinco unidades).

Los taninos condensados integran, junto con las formas isoméricas de la catequina, la familia de los flavanoles (31). En la Figura II.7 se muestra la estructura química de los monómeros de flavanol.

La familia química de los taninos condensados comprende dos tipos de compuestos: las procianidinas y prodelfinidinas.

Las procianidinas son polímeros de flavanol que derivan de la catequina y la epicatequina, y reciben este nombre debido a que en medio fuertemente ácido se hidrolizan para dar lugar a cianidina.

De manera similar, las prodelphinidinas son los polímeros de flavanol que derivan de la galocatequina y la epigalocatequina, y reciben este nombre porque se hidrolizan a delphinidina en medio ácido.

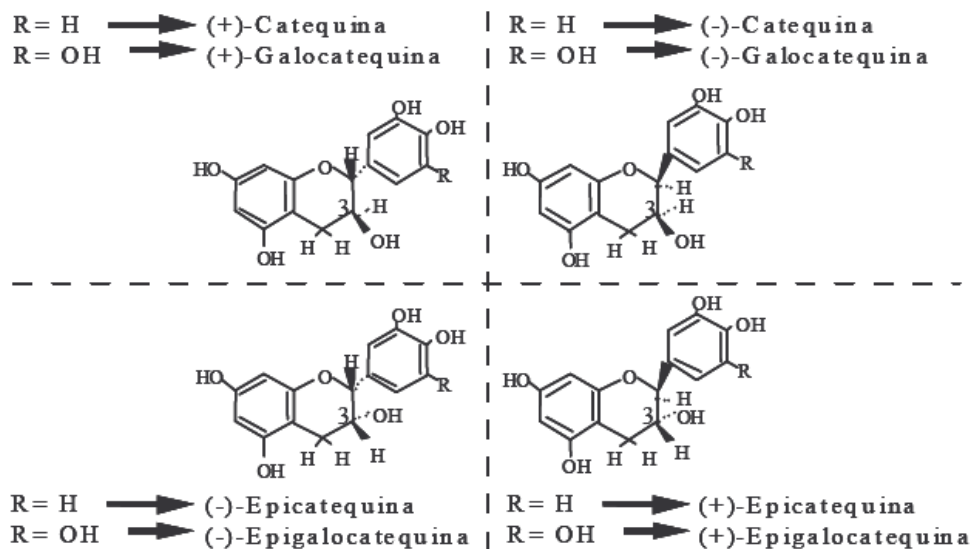
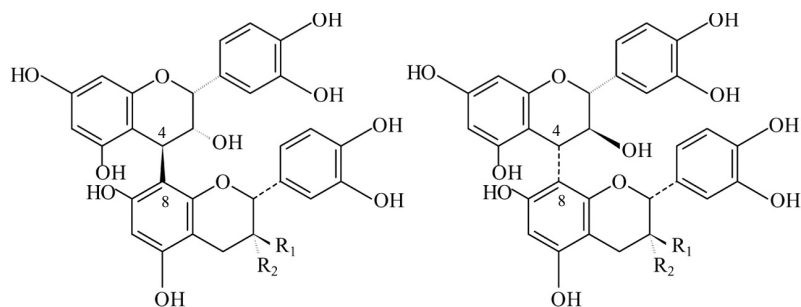


Figura II.7. Estructura química de los monómeros de flavanol (39)

En la polimerización de los flavanoles, se produce una condensación oxidativa entre el carbono C4 del heterociclo y el carbono C8 o C6 de otra unidad adyacente. A este tipo de polímeros, cuyos monómeros se unen mediante un solo enlace se les denominan polímeros de tipo B. Así, las procianidinas dímeras B1, B2, B3 y B4 (Figura II.8) se caracterizan por presentar enlaces C4-C8 y son las más comunes en las uvas.

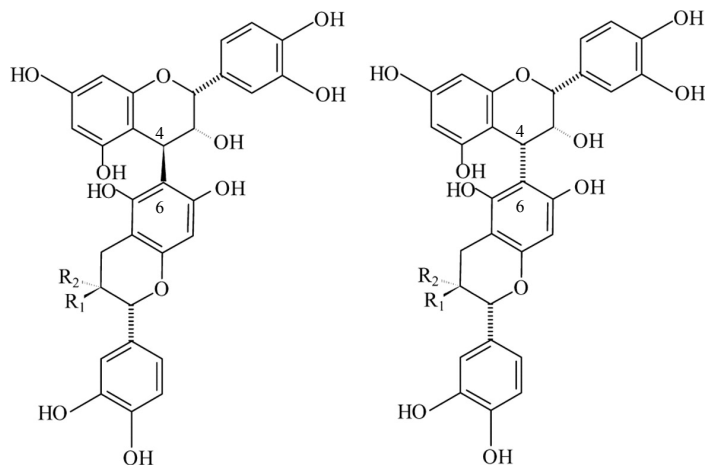
La procianidina B1 se localiza en la piel de la uva, mientras que las B3 y B4 se hallan en las semillas. Sin embargo, la procianidina B2 es la más abundante tanto en pieles como en pepitas (40,41).

En lo que a las procianidinas dímeras unidas por enlaces C4-C6 respecta, aunque no son tan abundantes como las anteriores, podemos encontrar en las uvas la B5, B6, B7 y B8 (Figura II.9).



	R₁	R₂
Procianidina B1	OH	H
Procianidina B2	H	OH
Procianidina B3	OH	H
Procianidina B4	H	OH

Figura II.8. Estructura de las Procianidinas B1-B4



	R₁	R₂
Procianidina B5	H	OH
Procianidina B6	OH	H
Procianidina B7	OH	H
Procianidina B8	H	OH

Figura II.9. Estructura de las Procianidinas B4-B8

Por otro lado, los polímeros de tipo A presentan un enlace éter adicional entre las posiciones C2-O-C7, como las procianidinas A1 y A2 (Figura II.10) o C2-O-C5, aunque en la uva este tipo de estructuras se encuentra en menor proporción que las de tipo B (42).

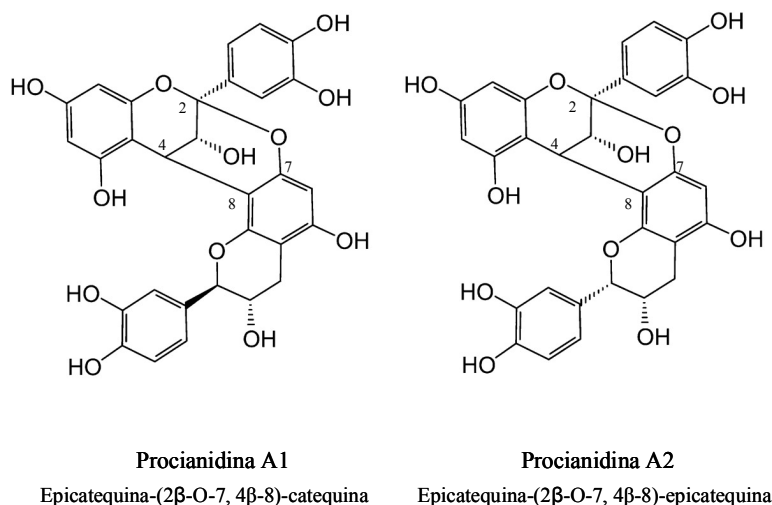


Figura II.10. Estructura de las Procianidinas A1 y A2

Cabe decir que la mayoría de autores incluyen dentro del término procianidinas todos los taninos condensados, es decir, tanto las procianidinas como las prodelfinidinas. Para evitar esta confusión, en el texto de la presente Tesis Doctoral se emplea el término “taninos condensados”, ya que más amplio que el de procianidinas.

En las uvas, se hace una distinción entre los taninos de las pieles y los taninos de las pepitas (12). Se ha observado que los taninos condensados procedentes de la piel y las pepitas difieren en tamaño, tipo de unidades que los conforman y propiedades sensoriales. En general, los taninos de las pepitas son más cortos y tienen un alto porcentaje de subunidades galoidadas (esterificadas con ácido gálico) debido a la mayor presencia de subunidades de epigallocatequina (11). Los taninos de las pieles son generalmente mayores y presentan una proporción significativa de subunidades de epigallocatequina trihidroxilada (12).

Tanto los monómeros de flavanol como los taninos condensados presentan una clara tendencia a la polimerización. El grado de polimerización medio es del orden de 10 en las semillas (11) y de 30 en los hollejos (12), si bien el grado de polimerización medio en el vino se sitúa alrededor de 7 (43).

Respecto a los niveles de astringencia y amargor que aporta un tanino condensado, éstos vienen determinados por su tamaño (44). Así, tal y como se muestra en la Figura II.11, cuando el grado de polimerización de un tanino llega a valores cercanos a diez unidades de flavanol, se consigue la mayor astringencia, mientras que cuando la polimerización está alrededor de cuatro unidades, se obtienen los taninos más amargos (45).

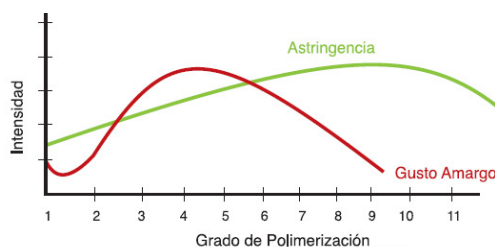


Figura II.11. Relación entre el grado de polimerización de los taninos con el amargor y la astringencia (45)

En lo que concierne a la localización de los taninos condensados en las pepitas (Figura II.12), éstos se distribuyen entre los tres tejidos marcados con asterisco (*): la epidermis, una parte amplia del tegumento externo, y la capa interna del tegumento interno (46).

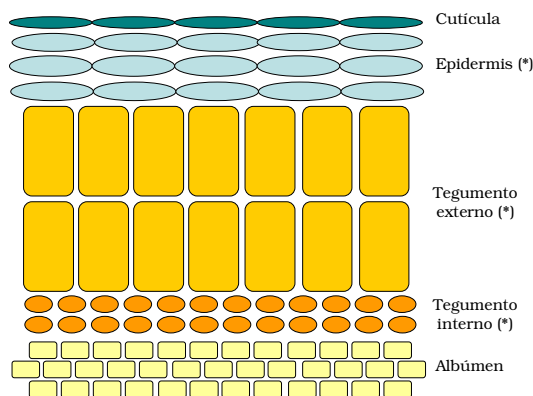


Figura II.12. Estructura esquemática de los tejidos de las pepitas

Desde la perspectiva de elaboración del vino, tener en cuenta esta localización es importante, porque los compuestos de la epidermis y del tegumento externo se extraen parcialmente durante el proceso de maceración, cuando el etanol disuelve la capa cerosa de la cutícula (47).

En la Figura II.13 se muestra esquemáticamente la localización de los taninos en la piel de la uva, la cual también contiene ácidos fenólicos y flavanoles en las células vacuolares. Los ácidos fenoles son los compuestos fenólicos mayoritarios de la pulpa.

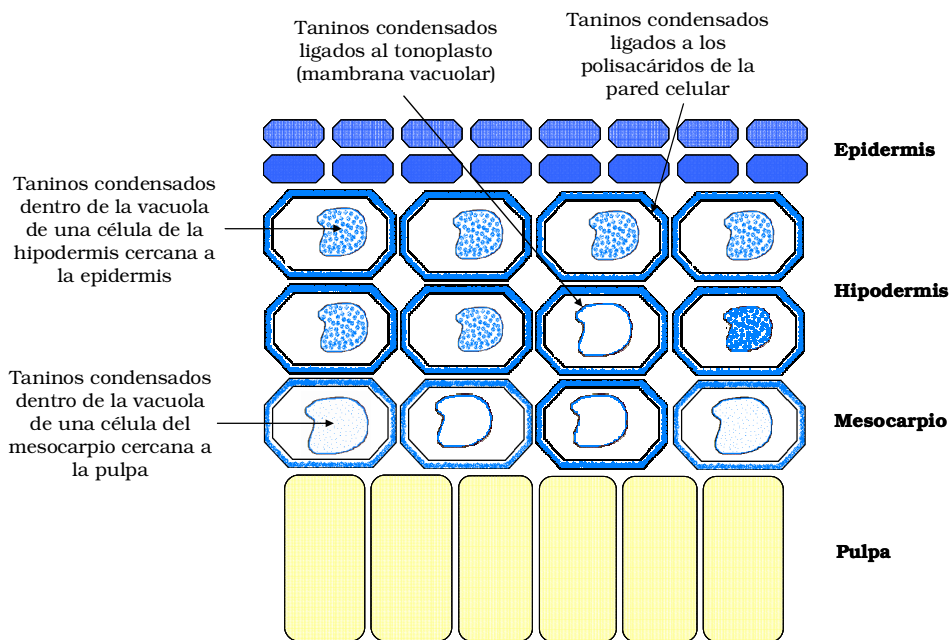


Figura II.13. Localización esquemática de los taninos en las pieles

En cuanto a los taninos condensados de las pieles, hay que distinguir entre tres tipos:

1. Los taninos condensados presentes en las vacuolas de algunas células. Éstos aparecen en forma de gránulos en las células de la hipodermis, próxima a la epidermis, y como granulaciones difusas en las células internas del mesocarpio, hacia la pulpa.

2. Los taninos condensados fuertemente enlazados al tonoplasto, que es la membrana proteofosfolipídica que delimita la vacuola. Estos taninos se encuentran formando un depósito continuo, pero pueden presentarse bajo la forma de unidades granulares separadas.

3. Los taninos condensados ligados a los polisacáridos de la pared celular (de celulosa-pectina) a través de enlaces glucosídicos. Este complejo tanino-polisacárido tiene un efecto positivo en las cualidades organolépticas de los vinos, ya que aumentan su untuosidad y volumen en boca (32).

II.1.3 Síntesis de los compuestos fenólicos

La síntesis de los compuestos fenólicos es una consecuencia colateral de la formación y acumulación de azúcares en la uva (1,49) (Figura II.14).

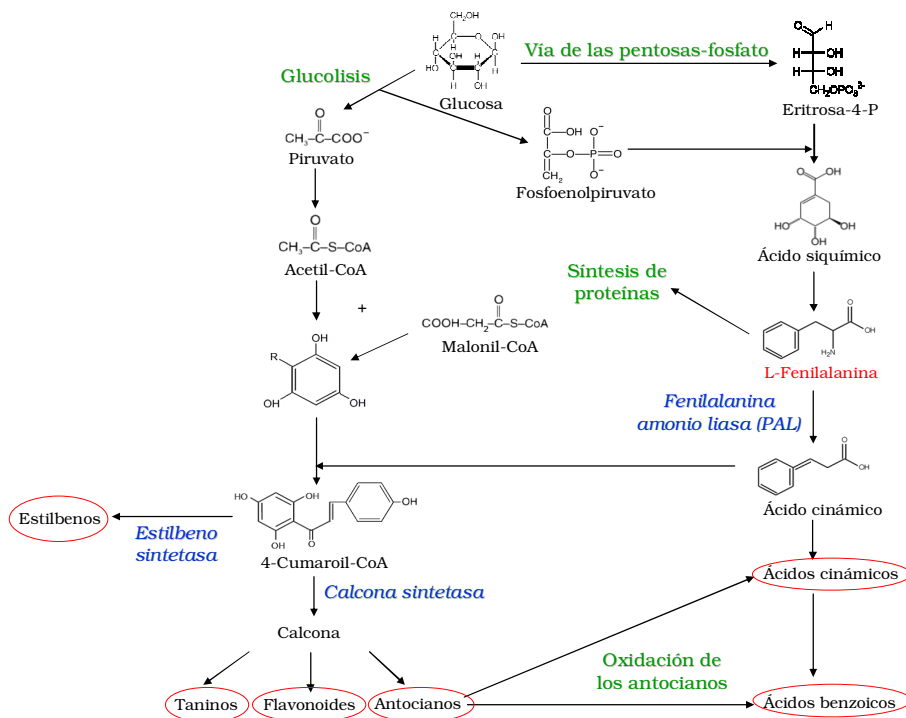


Figura II.14. Esquema de la síntesis de los compuestos fenólicos

La síntesis de los compuestos fenólicos comienza con la molécula de L-fenilalanina (50), la cual es sintetizada por la planta a partir del ácido siquímico (51). La fenilalanina es transformada en ácido cinámico gracias a la acción de la enzima fenilalanina-amonoliase (PAL) que, eliminando amonio de la fenilalanina y tirosina, forma los primeros compuestos fenólicos (52).

La enzima PAL está localizada exclusivamente en las células del hollejo y de algunos tejidos de pepitas, lo que explica la acumulación de los polifenoles en estas partes del grano de uva. Durante la fase de crecimiento de la uva (período herbáceo), la actividad de la enzima PAL está orientada (a través de los fitorreguladores auxinas, giberelinas y citoquininas) a estimular la síntesis de proteínas necesarias en el crecimiento vegetativo de la planta (órganos verdes). En el envero, el crecimiento vegetativo se detiene y la enzima PAL cambia de función (por acción del fitorregulador ácido abscísico) hacia la síntesis de compuestos fenólicos, que se prolonga durante toda la maduración.

II.1.4 Factores vitícolas que influyen en la síntesis de los compuestos fenólicos

Los factores vitícolas más influyentes en la síntesis de los compuestos fenólicos de las uvas son los que influyen en la actividad de la enzima PAL y son: la luz, la temperatura y las condiciones del terreno, como la fertilidad y agua disponible.

La luz es indispensable para la activación de la PAL, por lo que el número de horas de insolación tendrá, sin duda, gran importancia sobre la síntesis de compuestos fenólicos.

También se incrementa la actividad de la enzima PAL al aumentar la temperatura hasta un límite máximo de 35°C, obteniéndose así uvas con mayor concentración de compuestos fenólicos (50-52).

Por otro lado, si el terreno presenta abundante disponibilidad de nitrógeno y agua, se desactiva el ácido abscísico (ABA), orientando la enzima PAL hacia la síntesis de proteínas y crecimiento vegetativo y bloqueando la vía de síntesis de los compuestos fenólicos y de maduración fenólica. De ahí que

las cepas más frondosas posean las uvas menos coloreadas. Por este motivo deben limitarse los abonados y riegos con el objetivo de obtener un equilibrio entre producción y calidad del producto.

Existe un estudio particularmente interesante en lo que se refiere al efecto del estrés hídrico sobre la síntesis de antocianos (18). En dicho estudio, realizado sobre cepas de la variedad Merlot, se observa cómo este factor vitícola modifica de manera notable el metabolismo secundario y la expresión de los genes que dirigen la síntesis de los diferentes tipos de antocianos en la etapa de maduración. Así, el estrés hídrico no sólo provoca un aumento significativo del contenido antociánico total (del 37-57%), sino que también influye en la composición antociánica que determina el color de las uvas, dirigiendo la ruta de síntesis de los antocianos hacia estructuras que presentan un color más azulado: Malvidina-3-glucósido, Delfinidina-3-glucósido y Petunidina-3-glucósido.

II.1.5 Evolución de los antocianos y taninos durante la maduración de la uva

Desde el envero hasta la maduración, el contenido fenólico de la piel aumenta. En la Figura II.15, se muestra la evolución de los antocianos y taninos durante la maduración de la uva tinta.

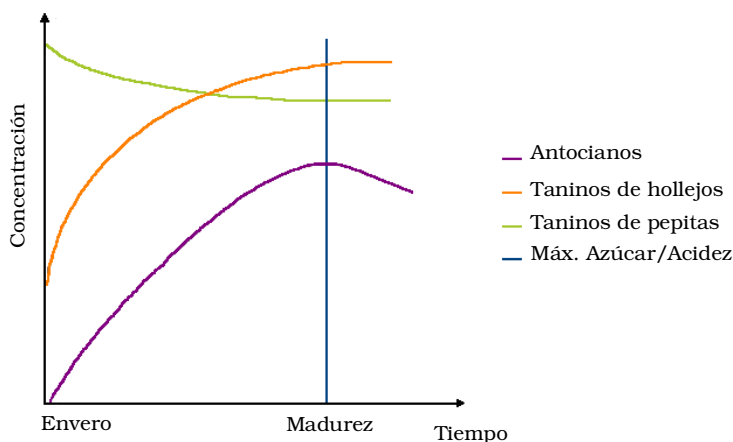


Figura II.15. Evolución de los compuestos fenólicos durante la maduración de la uva tinta (1)

La evolución de los antocianos es ascendente y se describe en tres etapas: una fase inicial de acumulación rápida, sucedida por una acumulación lenta hasta llegar a un máximo (que generalmente coincide con el valor más alto de la relación azúcar/acidez), tras el cual, disminuye (27,53). Este descenso de la concentración se produce cuando las uvas maduran demasiado (etapa de sobremaduración) y los antocianos comienzan a descomponerse.

Por otra parte, la concentración de monómeros de flavanol (catequina y epicatequina) de las pepitas, así como de los dímeros de flavanol, las procianidinas B1, B2, B3 y B4 (B2 y B4 son las predominantes en las pepitas) aumenta en el envero, que es el momento de máxima concentración. Le sigue una etapa de marcado descenso hasta cerca de la maduración, y, en ese momento, permanece relativamente constante (54,55). El descenso de concentración de los monómeros y dímeros de flavanol, que puede explicarse por fenómenos de oxidación (56,57) y de síntesis de pigmentos polímeros (58), hace aumentar el grado medio de polimerización en las pepitas durante la maduración (57, 59). Así pues, en general, los taninos condensados contenidos en las pepitas sufren un progresivo descenso desde el envero hasta la maduración porque se incrementa su grado de polimerización, aunque disminuye su extractabilidad debido a la lignificación de las pepitas (41).

Respecto a las procianidinas de las pieles (B1, B3 y B4), éstas tienen una evolución similar a las de las pepitas, de manera que la concentración aumenta en los primeros días de la maduración y va seguida de un descenso progresivo (54) debido a reacciones de polimerización. Consecuentemente, la presencia de taninos condensados en los hollejos aumenta durante la maduración, aunque su acumulación es más lenta y su máximo se alcanza algunos días después que el de los antocianos, por lo que la evolución de estos compuestos y el máximo alcanzado no siempre coincide. Los taninos condensados de las pieles presentan estructuras complejas, polimerizándose con proteínas y polisacáridos de las paredes celulares del hollejo que, como se ha dicho anteriormente y comunicando al vino sensaciones muy apreciadas de untuosidad y volumen en boca (1).

El balance global de taninos condensados en la uva indica que las concentraciones son altas en el envero, pero van decreciendo los taninos procedentes de las pepitas y aumentando los de las pieles a lo largo de la maduración, hasta permanecer casi constante en el momento próximo a la vendimia. Este comportamiento también está relacionado con la evolución de la extractabilidad de pieles y pepitas a lo largo de la maduración.

Así pues, se puede constatar que el hecho de retrasar la vendimia y, por tanto, aumentar el nivel de maduración de la uva, produce un incremento de la sensación de volumen en boca y cuerpo (39). Por el contrario, disminuye la astringencia y el sabor amargo. Dicho de otra manera, los vinos obtenidos de uva verde son cortos en boca, con poco volumen y cuerpo y, sin embargo, astringentes y amargos. Los vinos de uva madura serán menos astringentes que los de uva verde y tendrán más color.

Es por tanto obvio, que el correcto grado de maduración es vital para la elaboración de vinos de calidad. En el caso ideal, la maduración fenólica y tecnológica tienen lugar simultáneamente, pero en la realidad, no siempre ocurre así.

En la uva verde no sólo existe una baja concentración de compuestos fenólicos, sino que tanto la capa ceroide (pruina) que recubre la superficie de la uva (capa externa de la piel) como la cara interna de la piel, que está cubierta por una capa de células de la pulpa muy gruesa, dificultan la solubilización de los compuestos fenólicos por ambas caras. Por tanto, los compuestos fenólicos serán de difícil extracción y dará lugar a vinos poco coloreados, estructurados y astringentes.

A medida que la uva madura, la capa de células de la pulpa unida a la cara interna de la piel se vuelve más fina, permitiendo una mayor extracción de compuestos fenólicos, antocianos y taninos condensados fundamentalmente, por la cara interna de la piel. Además, por otra parte, el incremento de la concentración de etanol que se produce en la fermentación solubiliza la pruina que recubre la uva y hace posible que también se produzca la extracción por la cara externa de la piel.

Respecto a la extracción de los compuestos fenólicos de las semillas, hay que recordar que, con la madurez, éstas endurecen su superficie con una cutícula y una envoltura lignificada (Figura II.16) que dificultará la extracción en ausencia de etanol (60).



Figura II.16 Evolución del color de las pepitas a lo largo de la maduración de la uva

II.2 La composición fenólica del vino tinto

II.2.1 Extracción de los compuestos fenólicos durante el proceso de vinificación en tinto

La vinificación es el conjunto de operaciones puestas en práctica para transformar el mosto resultante del estrujado de los racimos en vino y, en el caso de la uva tinta, implica tres fenómenos principales: la fermentación alcohólica, la maceración y la fermentación maloláctica.

Cuando la uva entra a la bodega, se despalilla para eliminar el raspón y se estruja para aumentar la superficie de contacto entre el mosto y las partes sólidas de la uva, lo que facilita la maceración. El mosto es trasladado a los tanques de fermentación donde de inmediato se procede a agregar anhídrido sulfuroso, que actúa como antioxidante y antimicrobiano. A esta etapa, previa a la fermentación, se la denomina *maceración pre-fermentativa*, por lo que se desarrolla en medio acuoso y a temperaturas moderadas (39).

A continuación, se inocula la levadura comercial, teniendo lugar simultáneamente la fermentación alcohólica y la maceración. La maceración que transcurre en paralelo con la fermentación se la denomina *maceración durante la fermentación* y ambos fenómenos condicionan la cinética de extracción de los compuestos fenólicos.

Durante el proceso de fermentación, que suele desarrollarse entre 22°C y 30°C, las levaduras transforman los azúcares en etanol y dióxido de carbono, junto con otros productos (31). El progresivo aumento de la concentración de etanol, junto con el de la temperatura, facilita una mayor extracción de los compuestos fenólicos de pieles y pepitas.

Este hecho se debe a que el etanol actúa sobre las membranas celulares y vacuolares de las células de las pieles mediante la desorganización de su estructura creando orificios que permiten que las moléculas situadas en las vacuolas atraviesen las paredes celulares. De esta manera, los antocianos y taninos libres poco polimerizados son extraídos al comienzo de la vinificación, mientras que los pigmentos polímeros y las proantocianidinas con mayor grado de polimerización, o proantocianidinas unidas a proteínas o polisacáridos de las paredes celulares se extraen al final de la vinificación, cuando el etanol ha degradado las membranas celulares de las pieles (48).

La presencia de etanol también conlleva el aumento de la extracción de los taninos de las pepitas. Esto se explica porque la capa formada por ácidos grasos y otros lípidos cuticulares (ceras) que recubre la superficie de las semillas son insolubles en fase acuosa. Esta capa actúa como una barrera para la difusión de los taninos cuando el medio es acuoso (al comienzo de la fermentación), pero, durante el transcurso de la fermentación, se acelera la solubilización de estas sustancias en etanol (34).

Desde que finaliza la fermentación (desaparición de todos los azúcares del medio comprobada por la estabilización de la densidad) hasta que se decide descubar tiene lugar la *maceración post-fermentativa* en medio etanólico. Su duración dependerá de la decisión del enólogo, ya que si se prolonga en exceso esta etapa pueden aparecer defectos como la oxidación de los compuestos fenólicos (entre ellos los antocianos), un aumento del amargor, de aromas herbáceos y de acidez volátil (61).

La Figura II.17 muestra la cinética de extracción de los compuestos fenólicos durante estas etapas.

Acabada la fermentación y maceración, se procede a descubar el vino

para separar las pieles y las pepitas. El vaciado de los depósitos se realiza mediante el escurrido del vino (sangrado). A continuación se procede a prensar los orujos para obtener el denominado vino de prensa (supone el 15% del volumen total del vino obtenido).

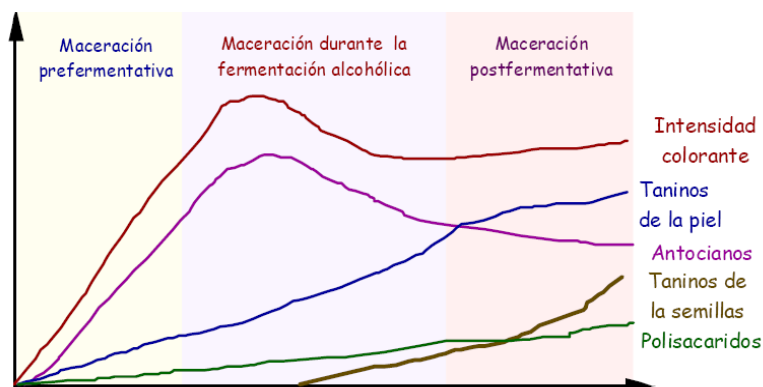


Figura II.17. Cinética de extracción de los compuestos fenólicos durante la fermentación/maceración (39)

Cuando el vino es destinado a crianza, las primeras fracciones del vino de prensa se suelen mezclar con el vino sangrado para que le aporte más cuerpo (ya que es más rico en compuestos fenólicos) y establezca su color (32).

Para terminar, tiene lugar la fermentación maloláctica, que supone la transformación del ácido málico procedente de la uva en ácido láctico por parte de las bacterias lácticas localizadas en la piel de la uva. Los efectos que la fermentación maloláctica produce sobre los vinos son deseables en el caso de los tintos destinados a crianza, ya que produce una disminución de la acidez total del vino (con la desaparición del ácido málico) y de las sensaciones gustativas ásperas y astringentes, y la aparición del ácido láctico, que es más suave, y de manoproteínas liberadas tras la autólisis de las levaduras y otros polisacáridos procedentes de las bacterias lácticas (31) que incrementan las sensaciones de suavidad y untuosidad.

La fermentación maloláctica también modifica el aroma del vino, disminuyendo los aromas varietales (primarios) y los generados durante la fermentación alcohólica (secundarios), mientras que lo enriquece en diacetilo por degradación del ácido cítrico. Este compuesto característico de la

fermentación maloláctica presenta olor a mantequilla y contribuye positivamente al aroma del vino (32).

Entre los inconvenientes que provoca la fermentación maloláctica está la pérdida de color del vino debida al aumento del pH, que modifica el equilibrio entre las diferentes formas de los antocianos, como se verá más adelante. Al aumentar el pH, una pequeña parte de los cationes flavilio (rojo) se desplaza a bases quinona (azul) y carbinol (incoloras).

II.2.2 Prácticas enológicas durante la vinificación en tinto que influyen en la extracción de los compuestos fenólicos

La extracción de los compuestos fenólicos de la uva está condicionada indudablemente por el grado de madurez de la uva (apartado II.1.5). Sin embargo, las prácticas enológicas empleadas durante la vinificación pueden favorecer aún más la disolución de los compuestos fenólicos en el vino.

II.2.2.1 Tiempo de maceración

Los criterios para decidir el tiempo de maceración deben fundamentarse en el tipo de vino que deseamos elaborar, la variedad de uva, en el estado sanitario y en su nivel de madurez fenólica (62). La Figura II.18 muestra el efecto del tiempo de maceración sobre las sensaciones gustativas del vino.

La maceración corta es empleada para obtener vinos jóvenes, ya que con pocos días de maceración se consigue una correcta extracción del color y de aromas afrutados y se evita obtener vinos muy tánicos (39, 63, 64).

Por el contrario, si deseamos obtener vinos de crianza, las maceraciones deberán ser más largas, ya que de este modo se consigue incrementar la extracción de antocianos, taninos, polisacáridos y proteínas para dar al vino la estructura necesaria y garantizar un color elevado y estable en el tiempo.

Alargando las maceraciones se consiguen vinos con altos contenidos de catequina y taninos, que pueden unirse a los antocianos y estabilizar el color frente a una variación de pH o decoloración con SO₂ (64).

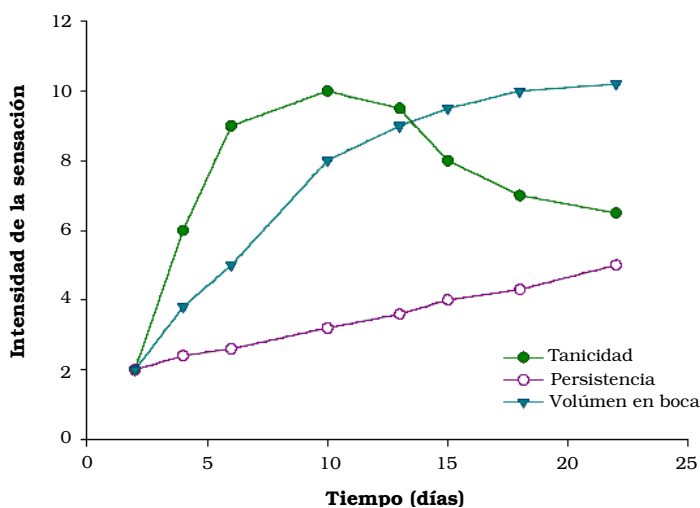


Figura II.18. Influencia del tiempo de maceración sobre las sensaciones gustativas del vino (39)

Además, la extensión de la maceración produce un aumento progresivo de los taninos procedentes de las pepitas, llegando a ser los predominantes en la composición tánica del vino (40, 65). Por ello, podemos decir que, alargando la maceración, el equilibrio gustativo del vino evoluciona muy positivamente, siempre y cuando la uva esté sana y bien madura. Como muestra la Figura II.18, alargando la maceración se incrementa el volumen en boca y la persistencia del vino.

Por lo tanto, dependiendo del tipo de uva y vino a elaborar, se hace necesario un modo de trabajar distinto, puesto que para la elaboración de vinos de crianza de alta calidad es indispensable realizar maceraciones largas con uvas maduras. Por el contrario, si la uva posee insuficiente madurez fenólica no conviene alargar la maceración, ya que se corre el riesgo de obtener vinos muy duros, amargos y herbáceos.

Por otra parte, tiempos de maceraciones excesivamente largos pueden deteriorar la calidad sensorial del vino. Al prolongar innecesariamente la maceración, puede aumentar la acidez volátil considerablemente y el sombrero comienza a desprender olor a ácido acético y acetato de etilo, echando a perder las características sensoriales buscadas. Para evitar el desastre, se debe

proceder a descubrir el vino en cuanto se detecte un punto de inflexión en su calidad sensorial.

El número de días en los que se consigue la máxima extracción de color varía entre los 4-16 días (66), en función de la variedad de uva de que se trate. La concentración de antocianos aumenta progresivamente durante los 4-6 primeros días de maceración, para después estabilizarse. La concentración de taninos de las pieles también se estabiliza tras los 4-6 días de maceración, aunque la de las pepitas continúa aumentando hasta los diez días (65). Alrededor del décimo día, la concentración total de polifenoles alcanza su máximo (64, 67, 68).

II.2.2.2 Temperatura de fermentación

La temperatura de fermentación es también muy influyente en la disolución de los compuestos fenólicos, ya que favorece su difusión (69). Temperaturas del orden de los 28-30°C producen una óptima extracción y polimerización de los antocianos, deseable para obtener vinos tintos de mucho color para crianza (70, 71), mientras que temperaturas del orden de 20-25°C se utilizan para producir vinos tintos frescos, afrutados (72). Por esta razón, se han desarrollado técnicas que permiten variar la temperatura a las que tiene lugar la fermentación.

La *maceración carbónica* es una técnica prefermentativa que emplea nieve carbónica para bajar la temperatura de la uva hasta los 4°C y evitar que fermente inmediatamente. Durante la maceración carbónica, pieles y pepitas se maceran durante 1 ó 2 días a una temperatura entre 15-20°C con el propósito de aumentar la extracción de los compuestos fenólicos en fase acuosa. Así se consigue que la fermentación comience con un alto nivel de antocianos y flavanoles poco polimerizados (de pequeño tamaño) disueltos ya en el medio.

Esta práctica incrementa significativamente el color, la concentración de antocianos y compuestos fenólicos totales (39) en ausencia de etanol, por lo que es muy adecuada para uva poco madura, ya que no se corre el riesgo de extraer demasiado tanino de las semillas. Además, al enfriar el mosto se

reduce la acción de las polifenoxidasas que puedan deteriorar el color del vino. Más tarde, durante la fermentación, el etanol degradará las pieles y se extraerán los compuestos fenólicos de mayor tamaño, los más polimerizados.

Existe otra técnica prefermentativa denominada *termovinificación*, que consiste en calentar la pasta de vendimia hasta los 70°C durante 30-60 minutos para producir una mayor solubilización de los compuestos fenólicos. Los vinos obtenidos por termovinificación presentan un color más intenso que los vinos tradicionales, aunque contienen menos antocianos y más compuestos polímeros. Hay que ser prudentes en la utilización de esta técnica, ya que comporta el riesgo de obtener vinos astringentes con aromas herbáceos. Además, los antocianos a partir de los 40°C se degradan (73), por lo que sólo se suele emplear en los casos en los que la uva presente problemas de podredumbre, ya que la fuerte temperatura desactiva la enzima lacasa generada por la *Botrytis cinerea* (39).

Otra técnica parecida a la termovinificación es la denominada *maceración final en caliente*. Esta técnica consiste en calentar a 35-40°C la cuba una vez que la fermentación alcohólica ha finalizado. Este sistema de vinificación permite también incrementar la extracción de los compuestos fenólicos y mejorar el color del vino, aunque una sobreextracción puede dar lugar a un vino astringente y herbáceo (74).

II.2.2.3 Uso de enzimas

Otra práctica enológica empleada para aumentar la extracción de color es la utilización de enzimas pectolíticos. Ello se debe a que estas enzimas, al hidrolizar las pectinas de las paredes de las células de la capa de la pulpa próxima a la piel (mesocarpio), favorecen la extracción de antocianos, proporcionando un aumento de color y una disminución del tiempo de maceración (75, 76).

Los preparados actuales contienen, además de la actividad pectolítica, otras como glicosidasas, proteasas, hemicelulasas y celulasas, que refuerzan la acción de las pectinasas. Con estos preparados se ha conseguido elaborar vinos de mejor color, contenido tánico y calidad (77), ya que no sólo los

antocianos van a ser extraídos de las pieles, sino también taninos ligados a las paredes celulares como resultado de la acción de celulasas y hemicelulasas. Estos taninos pueden ayudar a estabilizar el color del vino y a incrementar la sensación de volumen en boca.

II.2.2.4 Rotura del sombrero

Las diversas operaciones destinadas a romper el sombrero (pieles y pepitas compactadas), formado en la superficie del depósito por el arrastre de partículas en suspensión mediante el CO₂ desprendido en la fermentación, proporcionan una mayor extracción de color y de compuestos fenólicos. Estas operaciones sumergen las pieles y pepitas con el mosto en fermentación una o dos veces al día para aumentar la superficie de contacto.

A mayor número de bazuqueos, mayor extracción de color (39). Sin embargo hay que ser prudentes en su aplicación, puesto que estas prácticas también implican una aireación del vino que puede favorecer el crecimiento de bacterias acéticas y provocar su picado.

II.2.2.5 Anhídrido sulfuroso

A las temperaturas a las que normalmente tienen lugar las fermentaciones en tinto, el anhídrido sulfuroso no afecta excesivamente a la extracción de compuestos fenólicos. Sin embargo, a bajas temperaturas (por debajo de los 12°C), como las que existen en las maceraciones carbónicas, una concentración superior de anhídrido sulfuroso rompe las células de los hollejos y produce una extracción mayor de color (78).

El anhídrido sulfuroso también afecta el color del vino a través de la decoloración reversible de los antocianos, protegiéndolos de la oxidación.

II.2.3 Propiedades químicas de los antocianos

Se ha incluido este apartado porque constituye el fundamento sobre el que se basan los métodos de análisis más utilizados por las bodegas para

determinar la concentración de estos compuestos, y que se revisarán en el Capítulo III.

II.2.3.1 En función del pH

En el vino, los antocianos presentan un equilibrio entre diferentes formas químicas en función del pH (39) (Figura II.19).

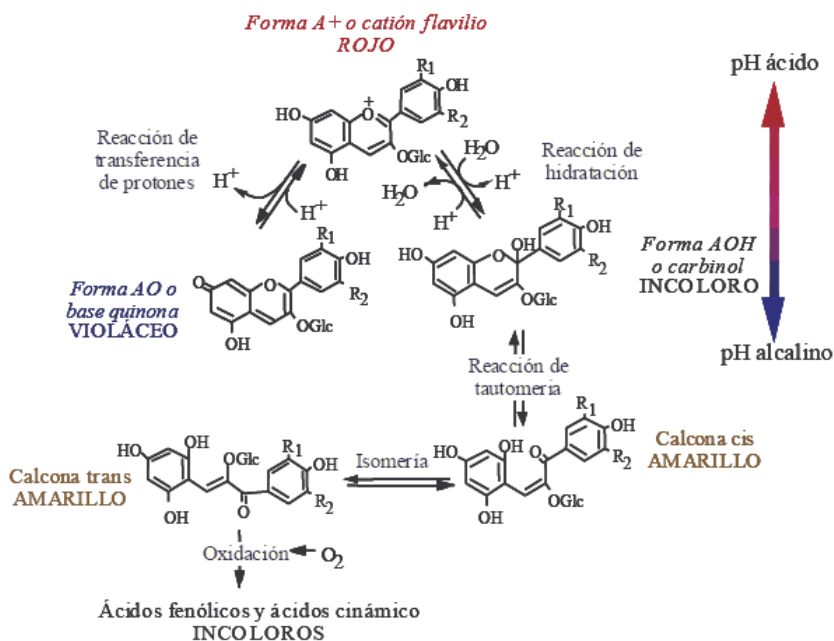


Figura II.19. Equilibrios entre las formas estructurales de los antocianos en función del pH (39)

A un pH bajo (< 2.0) los antocianos se encuentran mayoritariamente en forma de catión flavilio (A⁺), de color rojo. Sin embargo, es una estructura poco estable y evoluciona rápidamente. Al aumentar el pH, como puede ocurrir tras la fermentación maloláctica (pH>3.5), el catión flavilio desaparece rápidamente por desprotonación de los grupos hidroxilo de las posiciones 5, 7, y 4' para dar lugar a varias formas coloreadas denominadas bases quinonas (AO). Estas estructuras, que aun mantienen la alternancia de los dobles enlaces, presentan coloración azulada, con máximos de absorción a longitudes de onda próximas a 620 nm.

Este equilibrio se establece de forma muy rápida (tiempos del orden de milisegundos), pero en medios acuosos las bases quinonas formadas son muy inestables, ya que no están favorecidas termodinámicamente. Sólo predominan a corto plazo y por ello los equilibrios se desplazan rápidamente hacia la formación de bases hidratadas.

Al pH del vino (2.8-4.0), se produce la hidratación del catión flavilio, dando lugar a la formación de pseudobases carbinol (AOH) incoloras. La destrucción de la alternancia de dobles enlaces produce una pérdida de color. Las reacciones de hidratación son mucho más lentas que las de desprotonación y pueden tardar varios segundos o incluso algunos minutos en equilibrarse. Sin embargo, las bases carbinol (AOH) están más favorecidas termodinámicamente que las bases quinona (AO) y son las que prevalecen a largo plazo.

A pH básico se forma rápidamente la base quinona (AO), azul, pero es inestable, por lo que a pH básico predominan las formas carbinol (incolora) y calcona (amarilla). La presencia de luz y el aumento de la temperatura, produce que la pseudobase carbinol se abra y se transforme en la forma calcona. Las calconas pueden ser neutras e incoloras o estar como formas ionizadas (*cis* o *trans*) con una coloración amarilla pálida.

La reversión de la forma calcona a la forma flavilio (A^+) al disminuir el pH se produce de forma mucho más lenta en el caso de la *trans* que en la *cis*, incluso las formas *trans* no son reversibles si se oxidan para dar ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos), que son incoloros (79).

En condiciones de temperatura moderada y en medios algo ácidos, el equilibrio tarda varias horas en establecerse, pero, de lo contrario, éste se establece rápidamente. Así, en ausencia de sustituyentes del heterociclo, se favorece la formación de las estructuras tipo calcona, sobre todo si las temperaturas de conservación son elevadas. Es por ello que, para preservar el color de los vinos, éstos se conservan protegidos de la luz (en botellas oscuras), a temperaturas moderadas y previniéndolos de fuertes oxigenaciones (sulfitados). Como veremos a continuación, el bisulfito (HSO_3^-) y los taninos protegen a los antocianos, evitando que se den las reacciones anteriores.

La estabilidad de los antocianos no sólo se ve amenazada por los cambios de pH, sino que también ésta depende de la estructura y concentración de los mismos, así como la presencia de agentes para combinarse, como el bisulfito u otros sustituyentes (80). La Figura II.20 muestra el porcentaje de cada una de las formas antociánicas a diferente pH (81). En teoría, al pH del vino (entre 3 y 4), la mayoría de los antocianos deberían estar bajo la forma carbinol (AOH), incolora. Además debería haber la misma proporción de antocianos A⁺ (rojo) y AO (azul). Sin embargo, esto en la práctica no ocurre.

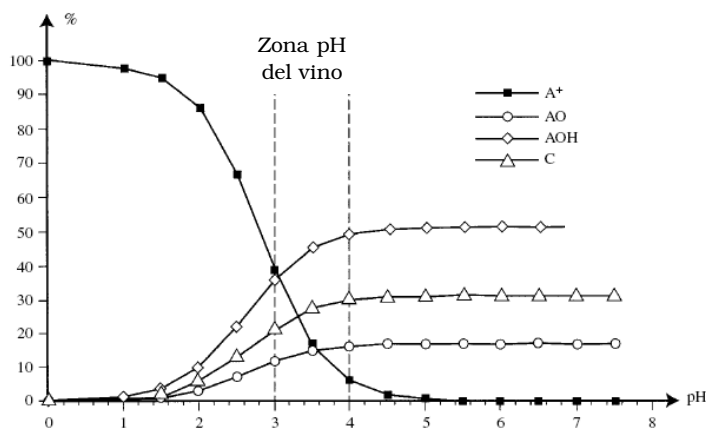


Figura II.20. Porcentaje de cada una de las formas antociánicas: flavilio (A⁺), carbinol (AOH), quinona (AO) y calcona (C) a diferente pH (81)

Básicamente hay tres fenómenos que modifican este equilibrio: la copigmentación, las combinaciones de los antocianos con los taninos y la formación de antocianos polímeros, que se abordarán a continuación. Estos fenómenos protegen el color del vino tinto, modificando la intensidad y la tonalidad.

II.2.3.2 En presencia de anhídrido sulfuroso

La presencia de anhídrido sulfuroso en los vinos tintos produce una decoloración de los antocianos. Los iones bisulfito (HSO₃⁻) son capaces de formar compuestos de adición con los antocianos, uniéndose sobre las posiciones 2 ó 4 del catión flavilio (A⁺) y dando lugar a la formación de un aducto incoloro, que es estable al pH del vino (Figura II.21).

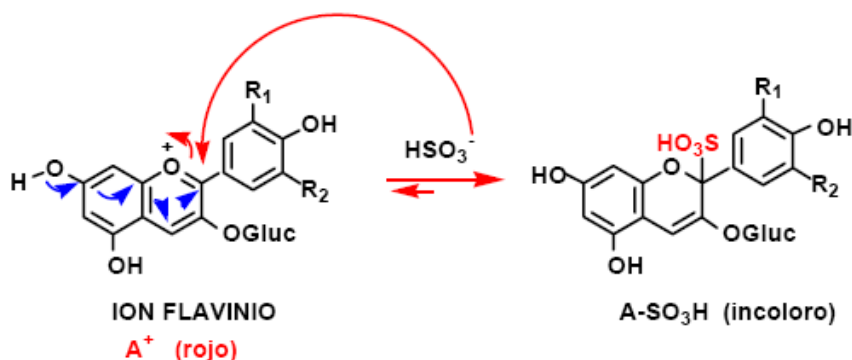


Figura II.21. Reacción entre el bisulfito y los antocianos

La reacción ocasiona la decoloración de los antocianos pero también les aporta estabilidad, ya que el complejo es menos sensible a los procesos de hidratación y polimerización, al tener ocupadas las posiciones reactivas.

Esta reacción es reversible en grado variable, dependiendo de la naturaleza del antociano y del pH. El aducto se vuelve a disociar a la sal de flavilio original y SO₂ libre cuando el medio se acidifica (pH = 1).

Aquellos compuestos que tienen la posición 2 ó 4 ocupada no pueden unirse al HSO₃⁻, por ello los pigmentos derivados de antocianos que se forman en el vino durante su envejecimiento que posean la posición 2 ó 4 ocupada serán, total o parcialmente, resistentes a la acción del bisulfito.

Los antocianos 3,5-diglucósidos presentan mayor facilidad para unirse al bisulfito que los correspondientes monoglucósidos.

II.2.4 Evolución de los compuestos fenólicos en el vino a lo largo de su elaboración y envejecimiento

Durante el proceso de elaboración del vino tienen lugar distintas reacciones que implican a los compuestos fenólicos y que afectan al color y a las características sensoriales del producto, además de a su capacidad para envejecer. Así, existen estudios que demuestran que mientras tras un año en botella, se degrada el 50% de los antocianos libres (82) y, tras dos años de envejecimiento en botella, este porcentaje aumenta hasta el 80% de antocianos

libres y el 40% de los taninos, aunque que el contenido fenólico total no sufre cambios significativos (83). Esto sugiere que durante el envejecimiento del vino los compuestos fenólicos sufren transformaciones importantes que dotan a los vinos envejecidos de una compleja composición fenólica.

II.2.4.1 Reacciones enzimáticas

Las reacciones enzimáticas, en su mayoría catalizadas por las enzimas polifenoloxidasas (PPO), comienzan en el estrujado, cuando se daña la estructura de la célula en presencia de oxígeno. Afecta sobre todo a mostos, produciendo el pardeamiento de los compuestos fenólicos. Este tipo de reacciones cobran más importancia en los vinos blancos que en los tintos.

Los compuestos fenólicos involucrados en reacciones de oxidación enzimática son sólo aquellos capaces de ser sustratos de la polifenoloxidasa (PPO). El mejor sustrato de la PPO lo constituyen los ácidos cinámicos, entre ellos el ácido caftárico, que lo convierte en ortoquinona. Por el contrario, catequinas, taninos y antocianos son pobres sustratos de la PPO y no pueden reaccionar con ella directamente debido a su impedimento estérico (31). Sin embargo, pueden reaccionar con la ortoquinona del ácido caftárico formada enzimáticamente a través de reacciones acopladas de oxidación y condensación nucleófila.

Las ortoquinonas secundarias generadas por este fenómeno reaccionan espontáneamente con moléculas nucleófilas del mosto para formar distintos aductos que pueden incorporarse a nuevas reacciones de degradación (84), lo que produce la pérdida de compuestos fenólicos.

En la Figura II.22 se recoge un esquema de las principales vías de reacción seguidas por la ortoquinona del ácido caftárico.

Las ortoquinonas del ácido caftárico pueden reaccionar con el glutatión (vía 1 de la Figura II.22), para dar lugar a un compuesto incoloro denominado "producto de reacción de la uva" (GRP, *Grape Reaction Product*). La formación de GRP es muy rápida y, mientras en el mosto haya cantidades suficientes de glutatión, éste va a constituir la principal vía de reacción de la ortoquinona,

evitando la oxidación de los compuestos fenólicos. En el mosto, donde se observa un gran pardeamiento, se encuentran generalmente cantidades bajas de glutatión y compuestos similares. De este modo, la relación entre contenidos de glutatión y de ácido caftárico del mosto está relacionada con su capacidad para pardear.

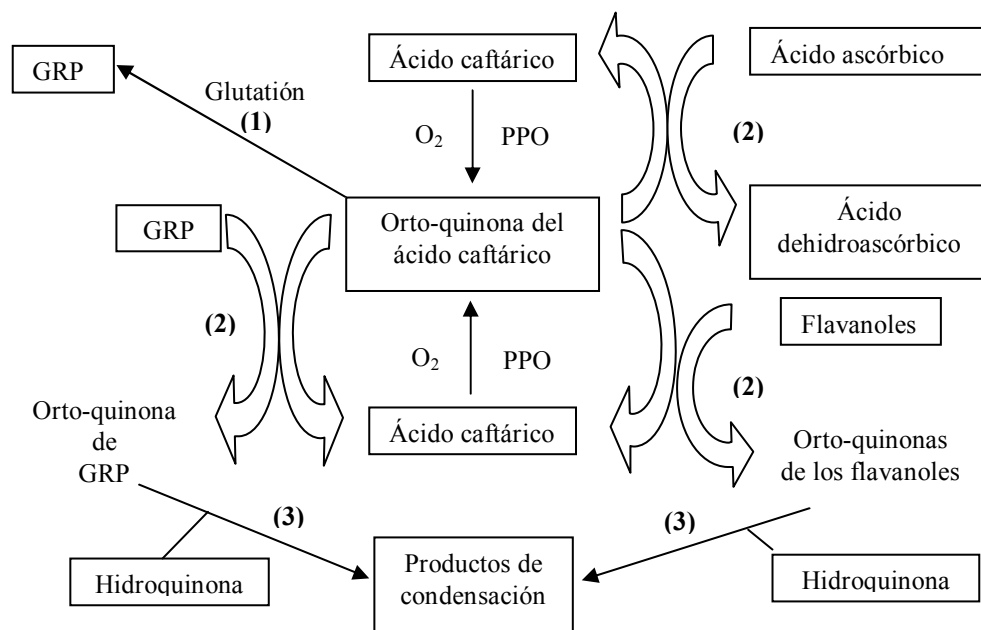


Figura II.22 Reacciones de las quinonas del ácido caftárico en el mosto
*GRP = Grape reaction products

A partir de las ortoquinonas formadas en las reacciones de oxidación, se pueden formar productos de condensación (vía 3 de la Figura II.22), que, a su vez, pueden también transformarse en nuevas quinonas (85). A medida que aumenta el grado de condensación, la coloración de los compuestos cambia hacia tonos pardos y se vuelve más resistente a la decoloración por bisulfito; paralelamente se observa la formación de un precipitado marrón, debido a la menor solubilidad de los polímeros y a la formación de enlaces con proteínas y polisacáridos.

Los antocianos también pueden ser oxidados directamente por peroxidadas y lacasas con la consecuente decoloración. La enzima lacasa (generada por *Botrytis cinerea*), en general parece ser más resistente a las

condiciones de vinificación que la enzima PPO y su presencia suele ser un gran problema con respecto a la calidad del vino.

II.2.4.2 Interacciones químicas

Durante la vinificación y envejecimiento del vino se producen diferentes interacciones y reacciones químicas, que ejercen una gran influencia sobre el color, la estabilidad del color, el cuerpo y la astringencia del vino. De entre estas destacan las de copigmentación, las de estabilización, las de polimerización de taninos y las de cicloadición de antocianos. De todas ellas se hace un pequeño resumen a continuación.

Copigmentación

La copigmentación se trata de un tipo de interacción molecular que puede producirse entre los antocianos y otros compuestos que los acompañan en sus medios naturales contribuyendo al mantenimiento del color rojo en los vinos tintos jóvenes. Los iones flavilio (A^+) y las bases quinónicas (AOH) de los antocianos presentan una estructura prácticamente plana, capaz de asociarse de forma no covalente con otros compuestos que posean también una parte plana y polarizable. Se forman, así, complejos de apilamiento vertical (tipo “sandwich”) mantenidos por enlaces de baja energía (Van der Waals, interacciones hidrofóbicas), que se estabilizan por disposición de las moléculas de azúcar en la parte externa, entre las cuales se establecen uniones por puentes de hidrógeno (Figura II.23).

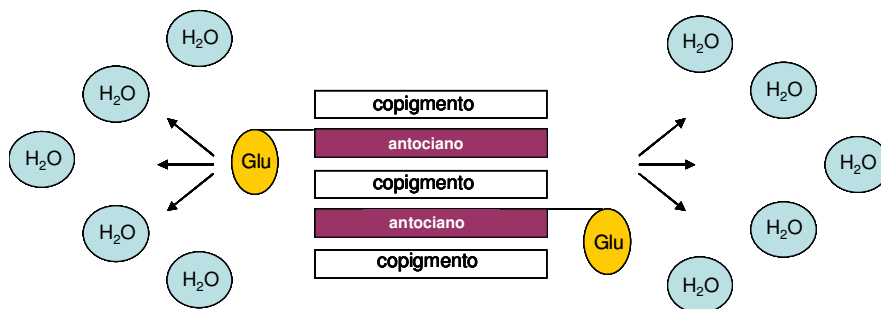


Figura II.23. Esquema de los complejos de copigmentación

Dentro de estas agrupaciones, compuestas por un número de capas variables entre 2 a 10, se genera un entorno hidrofóbico que impide que las moléculas de agua accedan al interior de estos complejos. De este modo, se protegen los antocianos de la hidratación, evitando la formación de bases carbinol (AOH) incoloras y, por tanto, la decoloración, haciendo que los equilibrios se desplacen hacia las formas coloreadas de los antocianos.

Los copigmentos que pueden interaccionar con los antocianos son tan variados como los ácidos fenólicos, flavonoides, flavonas, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos y metales, así como otras moléculas de antocianos (86). Los flavonoles forman los principales copigmentos. Por el contrario, los flavanoles son los copigmentos menos efectivos (debido a que no poseen estructura plana), excepto la (-) epicatequina que debido a su estructura prácticamente plana se combina fácilmente con los antocianos (87).

Hay distintos factores que se sabe que influyen sobre el proceso de copigmentación, entre ellos destacan el pH, el etanol, la temperatura, la estructura molecular de los copigmentos y la proporción entre antocianos y copigmentos (29).

El pH óptimo para la copigmentación se sitúa entre 3 y 5, dependiendo del par pigmento-copigmento. Los efectos de la copigmentación son más fácilmente observables a pH ligeramente ácido o neutro por ser el rango de pH donde predominan las formas incoloras de los antocianos.

La copigmentación está ligada a la presencia de agua como disolvente, ya que para que el efecto tenga lugar es necesario que exista un medio organizado, como la estructura de red que adoptan las moléculas de agua al unirse por puentes de hidrógeno. De este modo, el efecto de la copigmentación disminuye a medida que aumenta la concentración de etanol en el vino, el cual provoca la destrucción parcial de la red de moléculas de agua. A pesar de ello, el efecto de la copigmentación se sigue observando en el vino, ya que su componente mayoritario es el agua.

El aumento de la temperatura rompe las interacciones hidrofóbicas y reduce la estabilidad de los complejos de copigmentación, haciendo que parte

de los iones flavilio (A^+) quede libre y disponible para su hidratación y consecuente decoloración. El efecto de la temperatura está ligado al estado de organización del agua. El aumento de la temperatura provoca perturbaciones parciales en la estructura reticular del agua, lo que reduce el número de puentes de hidrógeno en la capa de solvatación y disminuye la eficacia del proceso de copigmentación.

Tanto el copigmento como la estructura y concentración del antociano son esenciales para describir los cambios de color en términos de intensidad colorante o tonalidad (29). A mayor concentración de antocianos y copigmentos, más favorecida estará la copigmentación. La estructura del antociano formará copigmentos más estables a mayor grado de glicosilación y acilación, puesto que estará más impedido el acceso a las moléculas de agua.

Los copigmentos son los responsables de la coloración característica de las uvas tintas, presentando un color intenso y azulado que no se corresponde con el del vino elaborado.

Ello es debido a que parte de los antocianos están copigmentados en el hollejo, rompiéndose esta estructura cuando la uva se airea en el estrujado (la oxidación disocia los copigmentos). En los vinos tintos jóvenes, donde existe un ambiente más reductor, los copigmentos se forman de nuevo y pueden ser responsables de un 40% de la intensidad del color, así como de su tonalidad violácea, perdiéndose este efecto cuando se produce la oxigenación durante la crianza en barrica (32). La copigmentación produce un aumento de la absorbancia que se traduce en un incremento del color (efecto hiperocrómico), así como un desplazamiento del máximo de absorbancia hacia una tonalidad de color púrpura y azul (efecto batocrómico) (88). Ambos efectos se representan en la Figura II.24.

El incremento en la intensidad y estabilidad del color, resultante de la copigmentación, es debido a un cambio en el efecto de la hidratación sobre las formas flavilio (A^+) o bases quinónicas (AO), que son atrapadas por los copigmentos en los complejos antociano-copigmento.

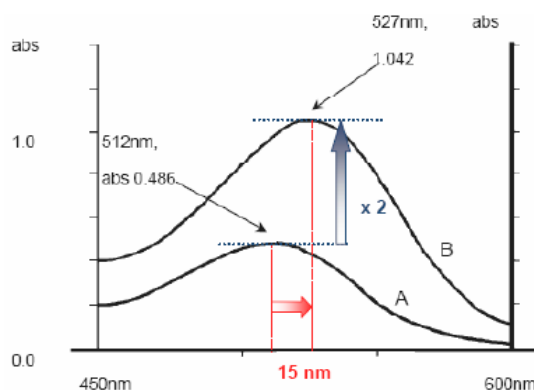


Figura II.24. Efecto *hipercrómico* y *batocrómico* producido por la copigmentación. A) Antociano libre, B) Antociano copigmentado

El efecto hiperacrómico (aumento de la absorbancia) es mayor cuando la concentración de copigmentos y de antocianos aumenta. También es más pronunciado este efecto cuando el tamaño del tanino y el grado de glicosilación del antociano es mayor, porque se pueden establecer mayor número de interacciones débiles.

Por el contrario, el etanol reduce el efecto batocrómico y el hiperacrómico (89), ya que impide que se establezcan puentes de hidrógeno entre las moléculas de copigmentos. Así se explica que la intensidad colorante del vino tras la fermentación alcohólica disminuya, y no porque se deba a la pérdida de materia colorante.

La copigmentación no sigue la ley de Lambert-Beer, la absorbancia que se produce no es proporcional a la concentración del copigmento. Si un antociano está copigmentado y se diluye con agua, su intensidad colorante baja mucho más de lo que cabría esperar. Ésta es la manera de evaluar si un compuesto coloreado lo es por reacción química o por copigmentación, comparando la absorbancia inicial y la final tras realizar una dilución. Si el descenso de la intensidad colorante no es proporcional a la dilución realizada, el color del compuesto se debe fundamentalmente a la copigmentación.

La copigmentación es de gran interés porque parece que contribuye significativamente al color de los vinos tintos jóvenes, y podría ser el primer paso en la formación de nuevos pigmentos en los vinos de crianza (90).

Reacciones de estabilización

Durante el proceso de envejecimiento del vino, la concentración de antocianos libres va disminuyendo hasta incluso desaparecer, sin que el color rojo del vino se pierda en la misma proporción. Esta disminución se debe a reacciones de estabilización.

Las reacciones de estabilización tienen, la mayoría de las veces, su origen en la formación de combinaciones entre antocianos y taninos, estos últimos a través de una unidad flavanol.

Los antocianos libres son inestables y deben estar combinados con taninos u otros compuestos del vino para formar pigmentos estables, que estabilicen y prolonguen el color de los vinos con el tiempo.

Las estructuras formadas entre antocianos y taninos se pueden clasificar en dos grupos respecto a sus vías de formación (89): unión directa antociano-tanino o tanino-antociano y la unión mediada por acetaldehído.

Unión directa antociano-tanino/tanino-antociano: estas reacciones participan en la transformación de los antocianos del vino a pigmentos más estables (91).

Entre las reacciones directas entre antociano-tanino se encuentran los pigmentos T-A⁺ y A⁺-T, unidos por las posiciones C4 del antociano y las posiciones C8 o C6 de los taninos, así como los compuestos incoloros A-(O)-T, que contienen un enlace éter adicional entre el C2 del antociano y el grupo hidroxilo del C7 del tanino.

Las estructuras T-A⁺ se originan de la adición nucleófila de un antociano en forma hemiacetálica (AOH) sobre el carbocatión del tanino (T⁺), seguido de la deshidratación del aducto resultante T-AOH.

Esto se produce porque los taninos, en un medio ácido como el vino, pueden hidrolizarse formando un carbocatión que reacciona con los antocianos bajo la forma hemiacetálica (AOH) (92), produciendo un complejo

incolore que se colorea seguidamente de rojo anaranjado después de su deshidratación.

Esta condensación se ve favorecida por la ausencia de oxígeno y la temperatura, lo que explica la evolución del color de los vinos almacenados en ambientes reductores a temperatura ambiente, como depósitos o botellas.

Las estructuras A⁺-T se forman por el ataque nucleófilo de la posición C8 o C6 de los taninos sobre la posición electrófila C4 del antociano en forma de catión flavilio (A⁺), formando un flaveno incolore intermedio A-(O)-T, el cual, posteriormente, se puede colorear de rojo (A⁺-T) en presencia de oxígeno (93), estableciéndose un estado de equilibrio entre ambas formas.

En el vino este tipo de reacción estaría limitada por la pequeña proporción en que se encuentra la forma catiónica del antociano (A⁺) debido a la existencia de un pH insuficientemente ácido. Aunque se han postulado diversas estructuras para los productos formados en esta reacción, hasta el momento sólo se ha identificado un dímero incolore antociano-catequina (94).

El color que presentan los pigmentos A⁺-T y T-A⁺ es similar al de los antocianos originales (95), mientras que los pigmentos A-(O)-T son incolores.

Los compuestos A⁺-T son resistentes a la decoloración por SO₂, mientras que los aductos T-A⁺ son susceptibles a la decoloración por SO₂ y a la hidratación.

Tanto los pigmentos tanino-antociano como el aducto incolore A-(O)-T se han podido detectar en vinos (96), aunque no se han podido distinguir entre los derivados T-A⁺ y A⁺-T. Sin embargo, los antocianos dímeros sí se han podido caracterizar (mediante espectrometría de masas). Consisten en una unidad catiónica flavilio (A⁺) y la otra unidad está como antociano hidratado, hemiacetal (AOH). La existencia de tales estructuras derivadas de reacciones directas entre moléculas de antocianos confirma que reaccionan como nucleófilos y electrófilos en el vino.

Unión antociano-tanino mediada por acetaldehído: el otro tipo de reacción entre ambos compuestos consiste en la unión mediante acetaldehído.

El acetaldehído es un producto que se forma durante la fermentación alcohólica y, en etapas posteriores, también por la oxidación del etanol (97).

Es necesario un pH ácido para que el acetaldehído sea capaz de formar el catión necesario para que la condensación tenga lugar (98).

Estas reacciones implican la protonación del acetaldehído, que en forma de carbocatión, reacciona con la posición C6 o C8 del tanino (99) y tras la deshidratación, el aducto acetaldehído-tanino reacciona con el antociano. Como resultado se forman los pigmentos antociano-etil-tanino (A^+-Et-T) y antociano-etil-antociano ($A^+-Et-AOH$), en el caso en que el acetaldehído reaccione con un antociano hidrata (AOH), estos últimos descubiertos recientemente (100).

Estos pigmentos son de tonalidad más violácea que los antocianos originales, tienen un color más estable que los antocianos libres frente a los cambios de pH y también son parcialmente resistentes a la decoloración por hidratación y bisulfito.

Reacciones de polimerización de los taninos

Por su parte, los taninos pueden polimerizar de forma directa formando un carbocatión en medio ácido que reacciona con otro tanino o con cualquier otra molécula presente en el medio (39).

Estas reacciones son reversibles, por lo que las moléculas van reaccionando siguiendo el mismo mecanismo y llevando a cabo un proceso de ruptura y recombinación que a lo largo del tiempo produce un incremento de la polimerización (31, 92). La configuración espacial que tendrán los taninos mediante este tipo de uniones será la de un polímero lineal más largo. Este tipo de polimerización no requiere la presencia de oxígeno, por lo que puede tener lugar en el depósito, en la bodega y en la botella.

Este tipo de polimerización que tiene lugar en el vino dará lugar a moléculas cada vez más grandes, lo que se traducirá inicialmente en un

incremento de la astringencia, una disminución del sabor amargo y en un incremento del color amarillo del vino. No obstante hay que tener en cuenta que si se alcanza cierto grado de polimerización, las moléculas se vuelven insolubles y pueden precipitar (98).

Otro posible mecanismo de polimerización de los taninos es mediante la formación de semiquinonas (39), las cuales forman un enlace estable mediante un mecanismo de tipo radicalario, dando lugar a la unión colateral de dos moléculas de tanino (1). Este tipo de reacción requiere la participación del oxígeno como sustrato y la presencia de hierro o cobre como catalizadores.

El otro posible mecanismo de polimerización de los taninos proviene de la participación del acetaldehído protonado, que en forma de carbocatión, reacciona con la posición C6 o C8 del tanino y tras la deshidratación, el aducto acetaldehído-tanino reacciona con otro tanino, uniendo dos taninos mediante puente de etilo (39). Los polímeros tanino-etil-tanino (T-Et-T) resultantes son incoloros.

Las uniones por puentes de etilo pueden romperse, dejando libre un tanino-etilo, el cual puede reaccionar de forma similar con otra molécula de tanino presente en el medio. Las estructuras obtenidas mediante puentes de etilo están sujetas a procesos de ruptura y recombinación que se traducirá, con el tiempo, en un incremento del grado de polimerización de los taninos.

Los dos últimos mecanismos de polimerización (mediados por semiquinonas y acetaldehído) dan lugar a uniones colaterales de taninos, de tal manera que su configuración espacial resultante será la de dos polímeros lineales unidos mediante enlace covalente o puente de etilo.

Ambos tipos de mecanismo de polimerización cruzada darán lugar a una disminución de la astringencia, ya que decrece el número de grupos hidroxilo que pueden reaccionar con las proteínas salivales, debido a que éstas son macromoléculas y por tanto no podrán interactuar con los grupos OH internos de las nuevas cadenas colaterales de las procianidinas. Estos dos tipos de polimerización también pueden dar lugar a la precipitación cuando el

tamaño del polímero sea muy elevado, lo que indirectamente produce un cambio de color en el vino (98).

Al requerirse oxígeno, estos tipos de polimerización tendrán lugar en el trasiego de los vinos, en la crianza en bodega o durante la microoxigenación llevada a cabo en depósitos.

Reacciones de cicloadición de los antocianos

El último grupo de pigmentos derivados de los antocianos que se pueden encontrar en el vino corresponde a los piranoantocianos (101, 102), formados por reacción de los antocianos originales de la uva con metabolitos producidos por las levaduras durante la fermentación (102). Se trata de otro tipo de reacción de las formas catiónicas de los antocianos (A⁺), resultante en la formación de un segundo anillo de pirano.

El mecanismo implica a las posiciones pobres en electrones C4 y grupo hidroxilo del C5 de los antocianos, y a los compuestos que poseen un doble enlace polarizable. La estructura de estos pigmentos deriva de la cicloadición de un resto vinifenol generado por las levaduras sobre la malvidina-3-glucósido o sobre su éster con ácido p-cumárico, dando lugar a un anillo tiránico adicional en la estructura antociánica.

El ácido pirúvico conduce a la mayoría de los piranoantocianos que se encuentran actualmente en el vino, como los carboxi-piranoantocianos (R = COOH), denominadas comúnmente vitisinas A (102).

También el acetaldehído proporciona piranoantocianos, denominados vitisinas B (R =H) (103, 104). Cuando los taninos están presentes junto con antocianos y acetaldehído, pueden encontrarse flavanil-piranoantocianos (R = monómero de flavanol hasta tritémero)(105-107).

Se pueden generar siguiendo dos tipos de reacciones: tanto por reacción entre antocianos y dímeros de flavanol unidos por puente de etilo o por reacción entre piranoantocianos y flavanoles. Además, se producen reacciones adicionales de los carboxi-piranoantocianos con los flavanoles y el

acetaldehído produce pigmentos azules basados en uniones entre flavanol y piranoantocianos a través de puentes vinilo (108).

La familia de los piranoantocianos se caracteriza por presentar máximos de absorción a longitudes de onda máxima menores en el espectro visible (desplazadas hipsocrómicamente) con respecto a las de sus antocianos precursores, lo que les confiere un color más anaranjado. Se trata de pigmentos químicamente más estables que poseen un color más resistente a los cambios de pH y a la decoloración por SO₂ que los antocianos (debido a la sustitución del flavilio C4), lo que unido a su tonalidad rojo-anaranjada, similar a la que adquiere el vino tinto durante su envejecimiento, hace pensar que podrían jugar un papel crucial en los cambios de color que se producen en el vino tinto de crianza.

Se han caracterizado parcialmente por espectrometría de masas pigmentos con estructuras más complejas que consisten en unidades de malvidina-3-glucósido y flavanol por diferentes tipos de uniones (Figura II.25), incluyendo uniones directas, por puentes etilo y enlaces tipo A.

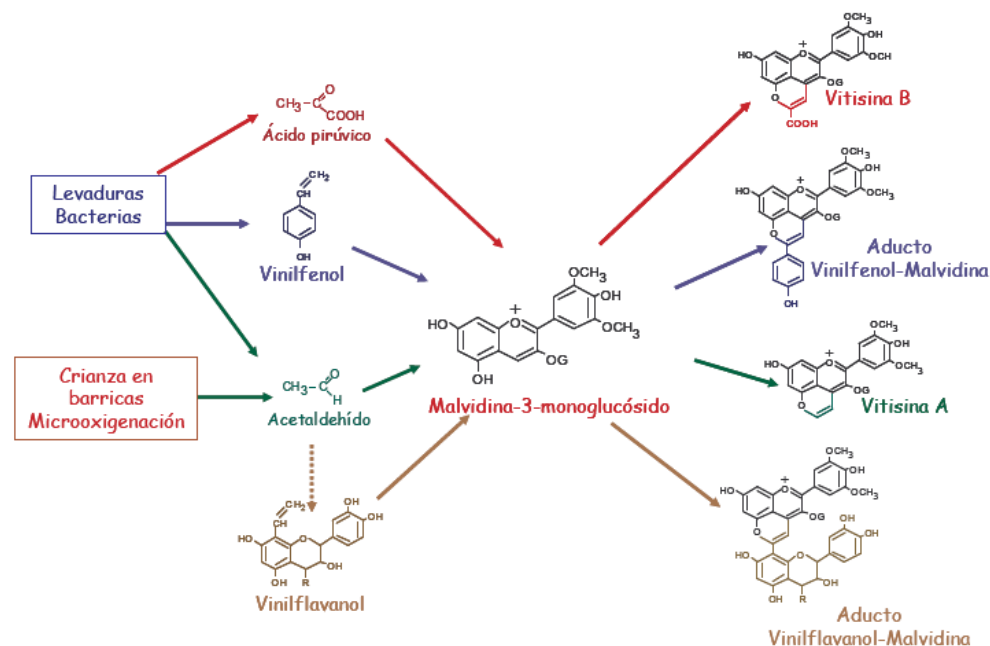


Figura II.25. Posibles mecanismos de formación de piranoantocianos

La mayor estabilidad de su color se atribuye a la sustitución de la posición C4 del antociano, lo que dificulta la reacción de hidratación, que lleva a la formación de pseudobases incoloras; de este modo, el predominio de la forma flavilio se extiende hasta valores de pH más elevados y la base quinoidal pasa a ser la otra forma dominante a medida que aumenta el pH.

Además, algunos de estos compuestos también contienen una fracción de piranoantocianos. Por tanto, la amplia diversidad de estructuras formadas en el vino se traduce en una gran variedad de propiedades, contribuyendo a diferenciar y caracterizar los vinos.

II.2.5 Importancia de la proporción del contenido de antocianos y taninos sobre la capacidad de envejecimiento de un vino tinto

Las proporciones relativas de antocianos y taninos tienen mucha importancia en los cambios de la composición fenólica que ocurren durante el envejecimiento del vino (39), y por tanto, determinan su capacidad para ser destinado a crianza. En la Tabla II.2 se presentan los intervalos habituales y las concentraciones aconsejables de antocianos y taninos que debe tener un vino tinto joven para poder ser destinado a crianza (39).

Tabla II.2. Valores habituales y concentraciones aconsejables de un vino tinto joven para ser destinado a crianza

	Intervalo habitual	Valor óptimo	Mínimo aconsejable
Antocianos (mg/L)	200-1200	> 800	400
Taninos (g/L)	1-5	>3	2

Como se puede ver, para que un vino tinto pueda ser envejecido, la concentración de antocianos óptima debe ser mayor de 800 mg/L, mientras que la de taninos debe superar los 3 g/L.

Sus proporciones relativas dirigen la selectividad entre los tres tipos de productos que se pueden formar por reacción:

- los que contienen unidades de tanino (T) y antocianos (A): T-A⁺, AT y T-Et-A.
- los que contienen sólo unidades de tanino (T): T-T y T-Et-T.
- los que sólo contienen unidades de antociano (A): A⁺-AOH y A⁺-Et-AOH.

Cuando la concentración de antocianos es muy superior a la de taninos ($A \gg T$), se espera que aumente la cantidad de antocianos polímeros (A⁺A) con respecto a otros, aunque también pueden tener lugar las reacciones de condensación con los taninos (73). La polimerización de taninos entre sí no se verá favorecida, debido a su baja concentración. También se puede producir la combinación entre antocianos y taninos pero sin que todos los antocianos lleguen a combinarse. Por lo tanto, los antocianos que no estén protegidos con SO₂ se oxidarán, evolucionando irreversiblemente hacia fenoles incoloros, produciéndose una importante destrucción del color rojo. Este vino no será apto para crianza.

Cuando la concentración de antocianos sea inferior a la de taninos ($A \ll T$), también podrán tener lugar todas las reacciones, pero habrá una que predomine sobre las demás. Todos los antocianos disponibles podrán ser combinados con taninos, pero los taninos que se encuentran en exceso podrían polimerizar directamente o a través del acetaldehído, aumentando el color amarillo del vino y la astringencia. Este vino tampoco es apto para envejecer.

La situación ideal para un vino se dará cuando se obtenga una concentración de antocianos y taninos equivalente ($A \approx T$) en las primeras etapas de la vinificación, donde todas las reacciones sean igualmente probables y todas las clases de productos (TA⁺, TT y A⁺A) se pueden formar potencialmente en los vinos. En este caso, se favorecen las reacciones de combinación entre ambos compuestos y, por tanto, la estabilización del color rojo y una disminución de la astringencia. Este tipo de vino es muy adecuado para crianza.

Debido a la importancia del adecuado balance entre la concentración de antocianos y taninos que tiene para la estabilidad del color del vino tinto durante la crianza, es necesario conocer su contenido desde la materia prima (durante la maduración en el viñedo), así como a lo largo de la vinificación para la toma de las decisiones más oportunas que ayuden a alcanzar el equilibrio y la armonía deseada.

II.3 Bibliografía

- (1) Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. Handbook of enology, Vol 2. The chemistry of wine, stabilization and treatments. Chichester: John Wiley & Sons; 1999.
- (2) Monagas M, Bartolome B, Gomez-Cordoves C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical reviews in food science and nutrition* 2005; 45: 85-118.
- (3) Ribéreau-Gayon P. Les acides-phénols de *Vitis vinifera*. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences* 1963; 256: 4108-4111.
- (4) Jeandet P, Bessis R, Gautheron B. The production of resveratrol (3, 5, 4'-trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. *American Journal of Enology and Viticulture* 1991; 42: 41-46.
- (5) Perez-Lopez F, Chedraui P, Haya J, Cuadros J. Effects of the Mediterranean diet on longevity and age-related morbid conditions. *Maturitas* 2009; 64: 67-79.
- (6) Cheynier V, Rigaud J. HPLC Separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture* 1986; 37: 248-252.
- (7) Pereira G, Gaudillere J, Pieri P, Hilbert G, Maucourt M, Deborde C. Microclimate influence on mineral and metabolic profiles of grape berries. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2006; 54: 6765-6775.
- (8) Barceló AR, Calderón AA, Zapata JM, Muñoz R. The histochemical localization of anthocyanins in seeded and seedless grapes (*Vitis vinifera*). *Scientia Horticulturae* 1994; 57: 265-268.
- (9) Castillo-Munoz N, Fernandez-Gonzalez M, Gomez-Alonso S, Garcia-Romero E, Hermosin-Gutierrez I. Red-color related phenolic composition of Garnacha tintorera (*Vitis vinifera* L.) grapes and red wines. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2009; 57: 7883-7891.
- (10) Escribano-Bailón MT, Guerra M, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 1995; 200: 221-224.
- (11) Prieur C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* 1994; 36: 781-784.
- (12) Souquet J, Cheynier V, Brossaud F, Moutounet M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* 1996; 43: 509-512.

- (13) Souquet J, Labarbe B, Le Guerneve C, Cheynier V, Moutounet M. Phenolic composition of grape stems. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2000; 48: 1076-1080.
- (14) Trousdale E, Singleton V. Astilbin and engeletin in grapes and wine. *Phytochemistry* 1983; 22: 619-620.
- (15) Blouin J, Cruège J. Analyse et composition des vins: comprendre le vin. Paris: Dunod; 2003.
- (16) Fernández-López J, Hidalgo V, Almela L, Roca J. Quantitative changes in anthocyanin pigments of *Vitis vinifera* cv Monastrell during maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1992; 58: 153-155.
- (17) González-San José ML, Di Stefano R. Fattori che condizionano la stabilità degli antociani in soluzione (1º contributo). *Rivista di Viticoltura e di Enologia* 1990; 3: 63-68.
- (18) Castellarin S, Di Gaspero G. Transcriptional control of anthocyanin biosynthetic genes in extreme phenotypes for berry pigmentation of naturally occurring grapevines. *BMC Plant Biology* 2007; 7:46-56.
- (19) Guerrero R, Liazid A, Palma M, Puertas B, Gonzalez-Barrio R, Gil-Izquierdo A. Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry* 2009; 112: 949-955.
- (20) Sun B, Leandro MC, de Freitas V, Spranger MI. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2006;1128: 27-38.
- (21) Wang H, Race E, Shrikhande A. Anthocyanin transformation in Cabernet sauvignon wine during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 7989-7994.
- (22) Ortega-Regules A, Romero-Cascales I, López-Roca JM, Ros-García JM, Gómez-Plaza E. Anthocyanin fingerprint of grapes: environmental and genetic variations. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2006; 86: 1460-1467.
- (23) Núñez V, Monagas M, Gomez-Cordovés MC, Bartolomé B. *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and Technology* 2004; 31: 69-79.
- (24) Alcalde-Eon C, Boido E, Carrau F, Dellacassa E, Rivas-Gonzalo J. Pigment profiles in monovarietal wines produced in Uruguay. *American Journal of Enology and Viticulture* 2006; 57: 449-459.
- (25) Kelebek H, Canbas A, Selli S. HPLC-DAD-MS analysis of anthocyanins in rose wine made from cv. Okuzgözü grapes, and effect of maceration time on anthocyanin content. *Chromatographia* 2007; 66: 207-212.

- (26) Burns J, Mullen W, Landrault N, Teissedre P, Lean M, Crozier A. Variations in the profile and content of anthocyanins in wines made from Cabernet sauvignon and hybrid grapes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 2002; 50: 4096-4102.
- (27) Cayla L, Cottureau P, Renard R. Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard. *Revue Française d'Oenologie* 2002; 193:10-16.
- (28) Murat M, Tominaga T, Saucier C, Glories Y, Dubourdiou D. Effect of anthocyanins on stability of a key odorous compound, 3-mercaptohexan-1-ol, in Bordeaux rose wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 2003; 54: 135-138.
- (29) Boulton R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* 2001; 52: 67-87.
- (30) Gonzalez-Neves G, Gil G, Ferrer M, Charamelo D, Balado J, Boichicchio R. Prediction of the colour and polyphenolic composition of the young red wines from the phenolic potential of the grapes. *International Journal of Food Science and Technology* 2010; 45: 1843-1851.
- (31) Flanzy C, López Gómez A, Macho Quevedo J, Madrid Vicente A, Madrid Cenzano A, Abbal P. *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*. Madrid: AMV Ediciones; 2000.
- (32) Hidalgo Togores J. *Tratado de enología*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2003.
- (33) Darne G, Glories Y. Anthocyanins in leaves of some *Vitis-vinifera L.* cultivars between veraison and leaf fall. *Vitis* 1988; 27: 71-78.
- (34) Amrani-Joutei K, Glories Y. Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Revue Française d'Oenologie* 1995; 153: 28-31.
- (35) Pecket RC, Small CJ. Occurrence, location and development of anthocyanoplasts. *Phytochemistry* 1980; 19: 2571-2576.
- (36) Small CJ, Pecket RC. The ultrastructure of anthocyanoplasts in red-cabbage. *Planta* 1982; 154: 97-99.
- (37) Nozzolillo C, Ishikura N. An investigation of the intracellular site of anthocyanoplasts using isolated protoplasts and vacuoles. *Plant Cell Reports* 1988; 7: 389-392.
- (38) Khanbabaee K, van Ree T. Tannins: classification and definition. *Natural Product Reports* 2001; 18: 641-649.
- (39) Zamora Marín F. *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. Madrid: A. Madrid Vicente; 2003.

- (40) González-Manzano S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta* 2004; 513: 283-289.
- (41) De Freitas V, Glories Y, Monique A. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 2000; 51: 397-403.
- (42) De Gaulejac N, Vivas N, Absalon C, Nonier M. Identification of procyanidin A2 in grape and wine of *Vitis vinifera* L. CV. Merlot noir and Cabernet sauvignon. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 2001; 35: 51-56.
- (43) Sarni-Manchado P, Deleris A, Avallone S, Cheynier V, Moutounet M. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture* 1999; 50: 81-86.
- (44) Peleg H, Gacon K, Schlich P, Noble AC. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999; 79: 1123-1128.
- (45) Peña Á. En la calidad de uvas y vinos: los taninos y su importancia. *Vendimia* 2006; Abril: 18-20.
- (46) Amrani-Joutei K, Glories Y, Mercier M. Localization of tannins in grape berry skins. *Vitis* 1994; 33: 133-138.
- (47) Geny L, Saucier C, Bracco S, Daviaud F, Glories Y. Composition and cellular localization of tannins in grape seeds during maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 8051-8054.
- (48) Amrani-Joutei K, Glories Y. Étude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 1994; 28: 303-317.
- (49) González-SanJosé ML, Díez C. Compuestos fenólicos en el hollejo de la uva tinta durante la maduración. *Agrochimica* 1992; 36: 63-70.
- (50) Hiratsuka S, Onodera H, Kawai Y, Kubo T, Itoh H, Wada R. Enzyme activity changes during anthocyanin synthesis in 'Olympia' grape berries. *Scientia Horticulturae* 2001; 90: 255-264.
- (51) Umbarger H. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annual Review of Biochemistry* 1978; 47: 532-606.
- (52) Roubelakis-Angelakis K, Kliewer W. Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenolics in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 1986; 37: 275-280.

- (53) Venencie C, Uveira MN, Guet S. Maturité polyphénolique du raisin mise en place d'une méthode d'analyse de routine. *Revue Française d'Oenologie* 1997; 167: 36-41.
- (54) Jordao A, Laureano O. Evolution of catechins and oligomeric procyanidins during grape maturation of Castelao frances and Touriga francesa. *American Journal of Enology and Viticulture* 2001; 52: 230-234.
- (55) Fernández-De Simón B, Hernández T, Estrella I, Gómez-Cordovés C. Variation in phenol content in grapes during ripening: low-molecular-weight phenols. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 1992;194:351-354.
- (56) Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL. Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry* 2000; 55: 77-85.
- (57) Downey M, Harvey J, Robinson S. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2003; 9:15-27.
- (58) De Freitas V, Glories Y. Concentration and compositional changes of procyanidins in grape seeds and skin of white *Vitis vinifera* varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1999; 79: 1601-1606.
- (59) Czochanska Z, Foo L, Porter L. Compositional changes in lower molecular-weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry* 1979; 18: 1819-1822.
- (60) Romeyer F, Macheix J, Sapis J. Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry* 1986; 25: 219-221.
- (61) Samappito S, Butkhup L. Effect of skin contact treatments on the aroma profile and chemical components of mulberry (*Morus alba* Linn.) wines. *African Journal of Food Science* 2010; 4: 52-61.
- (62) Auw J, Blanco V, OKeefe S, Sims C. Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet sauvignon, Chambourcin, and Noble wines and juices. *American Journal of Enology and Viticulture* 1996; 47: 279-286.
- (63) Gil-Muñoz R, Gómez-Plaza E, Martínez A, López-Roca JM. Evolution of phenolic compounds during wine fermentation and post-fermentation: influence of grape temperature. *Journal of Food Composition and Analysis* 1999; 12: 259-272.
- (64) Gomez-Plaza E, Gil-Munoz R, Lopez-Roca JM, Martinez-Cutillas A, Fernandez-Fernandez JI. Phenolic compounds and color stability of red wines: effect of skin maceration time. *American Journal of Enology and Viticulture* 2001; 52: 266-270.
- (65) Llaudy MdC, Canals R, Canals JM, Zamora F. Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *European Food Research and Technology* 2008; 226: 337-344.

- (66) Yokotsuka K, Sato M, Ueno N, Singleton VL. Colour and sensory characteristics of Merlot red wines caused by prolonged pomace contact. *Journal of Wine Research* 2000; 11: 7-18.
- (67) Gómez-Plaza E, Gil-Muñoz R, López-Roca JM, Martínez-Cutillas A, Fernández-Fernández JI. Maintenance of colour composition of a red wine during storage. Influence of prefermentative practices, maceration time and storage. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 2002; 35: 46-53.
- (68) Pardo Castellví R, De Castro Martín JJ. Estudio de la extracción de compuestos fenólicos de variedades tintas durante la vinificación en la D.O. Penedés. *Viticultura y Enología Profesional* 2003; 87: 37-42.
- (69) Gomez-Miguez M, Heredia F. Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52: 5117-5123.
- (70) Gao L, Girard B, Mazza G, Reynolds A. Changes in anthocyanins and color characteristics of Pinot noir wines during different vinification processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997; 45: 2003-2008.
- (71) Girard B, Yuksel D, Cliff M, Delaquis P, Reynolds A. Vinification effects on the sensory, colour and GC profiles of Pinot noir wines from British Columbia. *Food Research International* 2001; 34: 483-499.
- (72) Zoecklein BW. Wine analysis and production. New York etc.: Chapman & Hall; 1995.
- (73) Cacace, J.; Mazza, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 2003; 59: 379-389.
- (74) Ribéreau-Gayon P. Handbook of enology, Vol 1. The microbiology of wine and vinifications. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons; 2006.
- (75) Bakker J, Bellworthy S, Reader H, Watkins S. Effect of enzymes during vinification on color and sensory properties of port wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 1999; 50: 271-276.
- (76) Ducruet J, Dong A, Canal-Llauberes RM, Glories Y. Influence des enzymes pectolytiques sélectionnées pour l'oenologie sur la qualité et la composition des vins rouges. *Revue Française d'Oenologie* 1997; 155: 16-19.
- (77) Guerrand D, Gervais JP. Extraction of red wine phenolics during fermentation: A new pectinase preparation. *Australian Grapegrower and Winemaker* 2002; 466: 60-64.
- (78) Bakker J, Bridle P, Bellworthy S, Garcia-Viguera C, Reader H, Watkins S. Effect of sulphur dioxide and must extraction on colour, phenolic composition and sensory quality of red table wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1998; 78: 297-307.

- (79) Waterhouse AL. Determination of total phenolics. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* 2002; Supplement 6: I1.1.1–I1.1.8.
- (80) Bakowska A, Kucharska AZ, Oszmianski J. The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex. *Food Chemistry* 2003; 81: 349-355.
- (81) Glories Y. La couleur des vins rouges. 2e Partie: mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 1984; 4: 253-271.
- (82) Somers TC. Polymeric nature of wine pigments. *Phytochemistry* 1971; 10:2175-2186.
- (83) Sun B, Spranger M. Changes in phenolic composition of Tinta miuda red wines after 2 years of ageing in bottle: effect of winemaking technologies. *European Food Research and Technology* 2005; 221: 305-312.
- (84) Sarni P, Fulcrand H, Souillol V, Souquet J, Cheynier V. Mechanisms of anthocyanin degradation in grape must-like model solutions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1995; 69: 385-391.
- (85) Singleton V. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems - Observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture* 1987; 38: 69-77.
- (86) Mazza G, Brouillard R. The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry* 1990; 29: 1097-1102.
- (87) Gutiérrez IH, Lorenzo ES, Espinosa AV. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry* 2005; 92: 269-283.
- (88) Vivar-Quintana AM, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Anthocyanin-derived pigments and colour of red wines. *Analytica Chimica Acta* 2002; 458: 147-155.
- (89) Kennedy JA, Waterhouse AL. Red wine color: exploring the mysteries. Washington, DC: American Chemical Society; 2004.
- (90) Brouillard R, Dangles O. Anthocyanin molecular-interactions- the first step in the formation of new pigments during wine aging. *Food Chemistry* 1994; 51: 365-371.
- (91) Fulcrand H, Duenas M, Salas E, Cheynier V. Phenolic reactions during winemaking and aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 2006; 57: 289-297.
- (92) Haslam E. In vino veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* 1980; 19: 2577-2582.

- (93) Santos-Buelga C, Bravo-Haro S, Rivas-Gonzalo JC. Interactions between catechin and malvidin-3-monoglucoside in model solutions. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung* 1995; 201: 269-274.
- (94) Remy-Tanneau S, Le Guerneve C, Meudec E, Cheynier V. Characterization of a colorless anthocyanin-flavan-3-ol dimer containing both carbon-carbon and ether interflavanoid linkages by NMR and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 3592-3597.
- (95) García-Puente Rivas E, Alcalde-Eon C, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC, Escribano-Bailón MT. Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. *Analytica Chimica Acta* 2006; 563: 215-222.
- (96) Remy S, Fulcrand H, Labarbe B, Cheynier V, Moutounet M. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2000; 80: 745-751.
- (97) Wildenradt HL, Singleton VL. The production of aldehydes as a result of oxidation of polyphenolic compounds and its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture* 1974; 25: 119-126.
- (98) Rivas-Gonzalo JC, Bravo-Haro S, Santos-Buelga C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin-3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1995; 43: 1444-1449.
- (99) Fulcrand H, Doco T, EsSafi N, Cheynier V, Moutounet M. Study of the acetaldehyde induced polymerisation of flavan-3-ols by liquid chromatography ion spray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1996; 752: 85-91.
- (100) Atanasova V, Fulcrand H, Le Guerneve C, Cheynier W, Moutounet M. Structure of a new dimeric acetaldehyde malvidin 3-glucoside condensation product. *Tetrahedron Letters* 2002; 43: 6151-6153.
- (101) Fulcrand H, Dos-Santos P, SarniManchado P, Cheynier V, FavreBonvin J. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* 1996:735-739.
- (102) Fulcrand H, Benabdeljalil C, Rigaud J, Cheynier V, Moutounet M. A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry* 1998; 47: 1401-1407.
- (103) Bakker J, Timberlake C. Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997; 45: 35-43.
- (104) Bakker J, Bridle P, Honda T, Kuwano H, Saito N, Terahara N, et al. Identification of an anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry* 1997; 44: 1375-1382.

- (105) Francia-Aricha E, Guerra M, Rivas-Gonzalo J, Santos-Buelga C. New anthocyanin pigments formed after condensation with flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1997; 45: 2262-2266.
- (106) Mateus N, Silva A, Vercauteren J, de Freitas V. Occurrence of anthocyanin-derived pigments in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 4836-4840.
- (107) Asenstorfer R, Hayasaka Y, Jones G. Isolation and structures of oligomeric wine pigments by bisulfite-mediated ion-exchange chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 5957-5963.
- (108) Mateus N, Silva A, Rivas-Gonzalo J, Santos-Buelga C, De Freitas V. A new class of blue anthocyanin-derived pigments isolated from red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 1919-1923.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

CAPÍTULO III

Criterios para determinar la madurez óptima de la uva tinta



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Fragoso García
DL:T-1532-2011

III.1 Índices de madurez de la uva

Para producir vinos tintos de calidad, el grado de madurez de la uva juega un papel decisivo. Por ello, cada año se analiza la composición de las uvas durante la maduración a fin de determinar la fecha de vendimia más apropiada considerando las cambiantes condiciones climáticas. Sin embargo, el criterio seguido para estimar el estado de madurez óptimo es multivariado y complejo, lo cual da lugar al uso de diferentes índices (1).

En el viñedo, los técnicos suelen realizar un análisis organoléptico de los granos de uva mediante la impresión visual, táctil, gustativa e incluso olfativa que producen. A medida que se acerca el momento de vendimia se produce una pérdida de la rigidez del racimo, el raspón se lignifica, se facilita el desprendimiento del grano de uva del escobajo, se produce una fácil separación de las semillas de la pulpa, así como de la pulpa del hollejo cuando se aprietan las bayas entre los dedos. Además, aumenta el peso del racimo y cambia su color, disminuye la firmeza de pulpa y hollejo y aumenta el rendimiento del mosto. Las uvas tienen sabor azucarado y suave.

Sin embargo, estos índices de madurez generales por sí solos no revelan de un modo claro y determinante el estado de maduración de la uva, de ahí que suelen complementar a los índices de **madurez tecnológica** y **fenólica**, que son los más empleados por los productores de vino.

El concepto de **madurez tecnológica** hace referencia al balance entre azúcares y ácidos del mosto (2-5), cuya ratio aumenta conforme avanza la maduración. Si bien este índice, por sí mismo, puede ser perfectamente válido para fijar la fecha de vendimia en la elaboración de vinos blancos, para el caso de los vinos tintos debe determinarse también la **madurez fenólica** de las uvas (2), que es una medida del contenido de antocianos y taninos presentes en las uvas así como de la extractabilidad de éstos durante la vinificación.

Como se comentó en el Capítulo II, antocianos y taninos ejercen una gran influencia sobre el color del vino y su estabilidad a lo largo de la crianza. Así, las uvas más maduras tendrán mayor concentración de antocianos y taninos, ya que, además de aumentar la concentración de estos compuestos

durante la maduración, se produce un incremento de la extractabilidad de las pieles. Sin embargo, el contenido en antocianos, tras alcanzar un máximo, comienza a disminuir en la etapa de sobremaduración (6).

Aunque lo ideal sería que las uvas tintas alcanzaran la madurez tecnológica y la madurez fenólica siempre de manera simultánea, la realidad puede ser muy distinta (1, 5) tal y como muestra la Figura III.1.

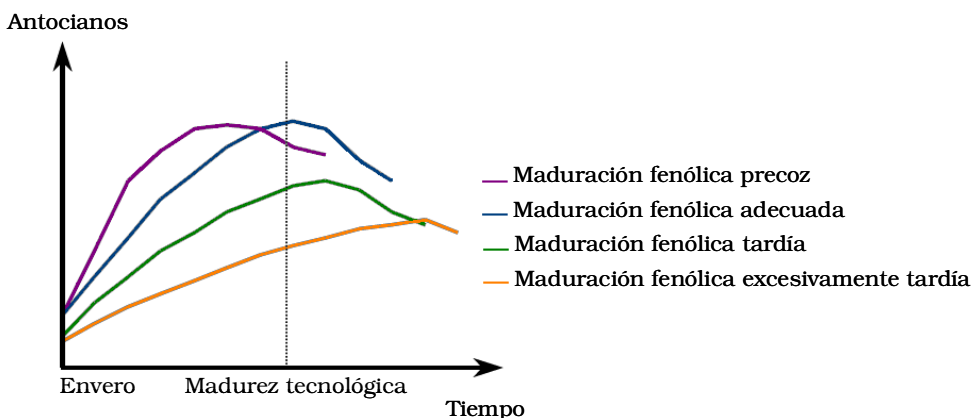


Figura III.1. Acumulación de antocianos en el transcurso de la maduración de la uva (1)

Así, aunque en algunos casos la variedad se adecúa perfectamente al terruño y ambas maduraciones se alcanzan al unísono (línea azul), a menudo se dan otras situaciones.

Por un lado, podemos encontrarnos con una maduración precoz de los compuestos fenólicos si la maduración fenólica tiene lugar antes de que se haya llegado a la madurez tecnológica ideal (línea morada). La solución a este problema pasaría por vendimiar antes de alcanzar la madurez tecnológica y corregir en bodega el grado alcohólico probable. Este comportamiento nos indica una incorrecta adaptación de la variedad a las condiciones edafoclimáticas.

El caso opuesto se presenta cuando la maduración de los compuestos fenólicos es tardía (línea verde). Ante esta situación, para alcanzar una correcta maduración de las semillas y de las pieles se necesita que la uva permanezca más tiempo en la cepa y esto conlleva una cierta sobremaduración

de la pulpa, provocando que se incremente el grado alcohólico más de lo deseado. Una situación extrema de este tipo de maduración (línea naranja) implicaría la obtención de uvas no aptas para la elaboración de vinos tintos de calidad.

III.2 La madurez fenólica

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 definen la madurez fenólica como la madurez óptima de las uvas para la elaboración de vinos tintos de alta calidad (1,5).

Sin embargo, aunque una elevada concentración de antocianos y taninos en la piel de la uva pueda conferir mucho color al vino y que propicie que éste sea estable en el tiempo, para poder decir que se ha llegado a una madurez fenólica óptima es necesario que las células de la piel también estén lo suficientemente degradadas para que los antocianos y taninos sean extraídos fácilmente durante la vinificación.

Se puede registrar un potencial de extracción variable en función de las diferentes condiciones de maduración debidas al tipo de clima, suelo y variedad de uva (7,8).

En el viñedo, es posible obtener una idea aproximada de la degradación de las células de la piel mediante el examen visual del color tras aplastar una uva entre el pulgar y el dedo índice. Sin embargo, existen métodos de laboratorio que permiten evaluar la madurez fenólica de una manera más objetiva que este examen táctil.

Los métodos analíticos que se utilizan para determinar la madurez fenólica tienen dos puntos críticos: el proceso de extracción de los compuestos fenólicos y la aplicación de la instrumentación tras un adecuado proceso de calibrado.

La extracción de los compuestos fenólicos es crucial, ya que de ella se pretende extraer, de forma rápida, información sobre la solubilización de los compuestos fenólicos que tendrá lugar en la vinificación. Éste es, probablemente, el factor determinante de todas las metodologías empleadas para determinar el momento óptimo de madurez fenólica.

III.2.1 Métodos para determinar el contenido fenólico de las uvas

La mayoría de los métodos que se han planteado en los últimos años para controlar la maduración fenólica están basados en la obtención de un extracto de uvas, que contenga una fracción representativa de los compuestos fenólicos presentes en la uva, por maceración en un disolvente. En este extracto se suele medir el contenido de antocianos, de taninos, de compuestos fenólicos totales en ocasiones expresado en forma de índice (IPT), así como parámetros referidos al color, con el fin de fijar la fecha de vendimia más apropiada.

Una muestra del interés que ha suscitado este problema es el gran número de métodos propuestos por diversos autores y que se recogen en la Tabla III.1 de manera resumida. En ésta se especifica el tipo de muestreo, la parte de la baya utilizada, el tratamiento de la muestra, así como las condiciones de extracción de los compuestos fenólicos.

Las metodologías propuestas se pueden dividir en dos grandes grupos: los que analizan la uva entera, para lo cual se tritura finamente la uva (con o sin trituración de las pepitas) hasta obtener una pasta homogénea que favorezca la extracción; y por otra parte, aquellos que analizan pieles y pepitas por separado, ya sean estas últimas enteras o trituradas. La trituración parcial de las pepitas se consigue con una batidora, la trituración total con un equipo homogeneizador de alta velocidad (Ultra-Turrax®), y se mantienen intactas con licuadora.

Sin embargo, a la hora de elegir un método de tratamiento de la muestra para poder ser utilizado como método de análisis de rutina en una bodega, debe buscarse un método sencillo, repetitivo, rápido y fiable.

Tabla III.1. Metodologías para evaluar el contenido fenólico de la uva tinta

Material analizado	Nº bayas	Trituración	Procedimiento de extracción	Tiempo	Tª	Vol. extracto constante	Parámetros analizados	Referencias
UFT	200	Licuadaora 2 min., vel. baja	50 g/50 ml sol. pH 1.0 (HCl 0.1M) 50 g/50 ml sol. pH 3.2 (5g/L H ₂ T)	4h	20-25°C	no	AT, AE, CFT, EA%, MP%	(9-25)
UFT	100	Licuadaora 1 min, vel. media	20g/20 ml sol. A: tampón KCl (3.72g KCl + 4.10 ml HCl 0.1M + EtOH 10%, pH 1.0 20g/20 ml sol. B: tampón citrato (14.4g ác. cítrico + 9.28 g citrato sódico) + Na ₂ S + EtOH 10%, pH 3.6	1h	20-25°C	no	AT, AE, CFT, EA%, MP%	(26)
UFT	200	Licuadaora 2 min, vel. baja	50 g/100 ml sol. (85 ml HCl 0.1% + 15 ml EtOH 96%)	2h	20-25°C	no	AT, CFT	(27, 28)
UFT	100	Licuadaora 2 min, vel. baja	50 g/100 ml sol. (85 ml HCl 0.1% + 15 ml EtOH 96%)	1h	20-25°C	no	AT, CFT	(17, 29, 30)
UFT	100	Ultra-Turrax 2 min, 24000 rpm	50 g/100 ml sol. (85 ml HCl 0.1% + 15 ml EtOH 96%) lavado residuo (con 50 ml sol.)	15 min	40°C	si (200 ml con sol.)	AT, CFT, TC	(31)
UFT	200	Licuadaora 2 min, vel. baja	Centrifugación (vel. NF)	NF	NF	no	AT, CFT	(32, 33)
UFT	100	Licuadaora t y vel. NF 3 ml Na ₂ S ₂ O ₅ 15%	20 g/20-25 ml HCl 2% lavado residuo (x3) con 20-25 ml HCl 2%	30 min	70°C	si (100 ml con HCl 2%)	AT, TC	(34)
UFT	100	Licuadaora 30 s, vel. máx.	300 ml EtOH 95%, toda noche, -24°C re-extracción (x3), EtOH 95% (vel. NF), 2h, 20-25°C	10-16h	-24°C 20-25°C	no	AT, CFT	(35)
UFT	100	Ultra-Turrax t y vel. NF	metanol (vol. NF), toda noche, -24°C; 2ª ext. metanol 80%, 4h, 20-25°C; 3ª ext. H ₂ O, 15h, -24°C; 4ª ext. acetona 75%, 1h, 20-25°C	30-35h	-24°C 20-25°C	no	TC, Cat.	(36)
UFT	20 g	Mortero	50 ml sol. (metanol + HCl 0.1%) Re-ext. 50 ml sol., hasta pérdida de color (≈ 2h)	14h	20-25°C	no	AT, CFT, TC, Cat.	(37)

Tabla III.1. Metodologías para evaluar el contenido fenólico de la uva tinta. (Continuación)

Material analizado	Nº bayas	Trituración	Procedimiento de extracción	Tiempo	Tª	Vol. extracto constante	Parámetros analizados	Referencias
UFT	200 g	Batidora 2 min, vel. NF	35 g en cubeta de cristal de 35 ml	-	20-25°C	no	PMT	(38)
UFT	200 g	Licuadaora 30 s, vel. NF	Microondas (300 w., 5 min)	5 min.	100°C	no	AT, CFT	(39)
UFT	1 Kg	Licuadaora 1.5 min, 3600 rpm	80-100 ml triturado/1 ml sol. A + 4 ml sol. B + 40 ml H ₂ O, agitación 900 rpm	2 min	80°C	no	CP, IMF	(17, 40)
UFT	NF	Batidora 2 min, vel. NF	100 g/100 ml sol. (EtOH 70%, pH 2.0) Re-ext. con 125 ml sol.	noche	4°C	si (500 ml con sol.)	AT	(41)
UFT	100	Ultra-Turrax 1 min, vel. NF	60 ml metanol: HCl 12M (99:1), 4h + 60 ml metanol: HCl 12M (99:1), 12h + 60 ml metanol: HCl 12M (99:1), 4h	20h	20-25°C	si (200 ml con metanol)	AT, CFT	(42)
UFT/UCT	50	Ultra-Turrax 30 s, 24000 rpm	1g/10 ml EtOH 50%	1h	20-25°C	no	AT, CFT	(43-48)
UFT	500 g	Licuadaora 1 min, vel. baja	45 g/225 ml HCl 0.18M añadidos a la licuadaora	1 min	20-25°C	no	AT, CFT	(49, 50)
UCT	50	Ultra-Turrax 30 s, 24000 rpm	20 g/20 ml EtOH 50%:HCl 0.1M (50:50)	5 min	40°C	no	AT, CFT	(51)
PV	20 Kg	-	-	-	20-25°C	no	Coordenadas CIELAB	(52)
PV	4 Kg	Protolipo homogeneizador	Mostio tras centrifugación (vel. NF)	7 min.	20-25°C	no	AT, CFT, IC	(53)

Tabla III.1. Metodologías para evaluar el contenido fenólico de la uva tinta (Continuación)

Material analizado	Nº bayas	Trituración	Procedimiento de extracción	Tiempo	Tª	Vol. extracto constante	Parámetros analizados	Referencias
UCT	NF	Mortero	1g/100 ml sol. (metanol + HCl 0.1%)	NF	NF	no	AT	(54)
UCT	NF	Batidora t y vel. NF	10-15 g uvas/100 ml sol. (metanol + HCl 0.1%)	NF	20-25°C	no	AT	(55)
UCT	200	Equipo NF 5 min, vel. NF	25 g/25 ml sol. pH 3.2 25g/25 ml sol.(metanol + HCl 1%)	4h	20-25°C	no	CFT, AF, Cat., % Amarillo	(56)
PFE	200	-	Pielas 50 g uvas/50 ml sol. (EtOH 12% saturado con K ₂ C ₂ O ₈ + 100 mg/L SO ₂ , pH 3.5)	6h	35°C	no	AT, CFT	(33)
PFE	200	-	Pielas 50 g uvas/50 ml sol. (EtOH 12% saturado con K ₂ C ₂ O ₈ +100 mg/L SO ₂ , pH 3.5)	3h	70°C	no	AT, CFT	(33, 57)
PFE	25	-	Pielas 25 uvas/50 ml sol. (EtOH 2% + 5 g/L H ₂ T, pH 3,6)	4h	50°C	no	AT, CFT, TC	(58)
PFE	5 Kg	-	Acetona: H ₂ O (2:1), vol. NF	NF	20-25°C	no	TC	(59)
PFE	300	-	1g/1 ml acetona 66%	24h	20°C	si (50 ml con H ₂ O)	AT, TC, Cat., Flavonoles	(60)
PFE	NF	-	EtOH 50% (vol. NF) (x2)	24h	30°C	no	AT, CFT	(61-63)
PFE	750 g	-	200 ml EtOH:H ₂ O (70:30) + 1 ml HCl 12M. Evaporación < 30°C. Resuspensión con 10 ml metanol.	48h	20-25°C	si (100 ml con acetato de etilo)	AT	(64)
PFE	30	-	Proporción 1:5 (p/v) de metanol: HCl 12M (99:1)	noche	4 °C	no	CFT, IC, To	(65)

Tabla III.1. Metodologías para evaluar el contenido fenólico de la uva tinta (Continuación)

Material analizado	Nº bayas	Trituración	Procedimiento de extracción	Tiempo	T ^m	Vol. extracción constante	Parámetros analizados	Referencias
PPE	280	-	Pielas enteras 90 uvas/150 ml sol. (EtOH 12% + 2 g/L bitartrato potásico + 100 mg/L SO ₂)	5h	27°C	no	AT, CFT, TC	(66)
PCE	NF	-	10 g/ 25 ml H ₂ T 0.75% (x 20)	20 min	25°C	no	AT, CFT	(67)
PPT	100	Equipo NF 1 min, vel. NF	30 ml H ₂ O + 40 ml EtOH 12% + 5 g/L H ₂ T, pH 3.6	2h	30°C	si (200 g con H ₂ O)	AT, CFT	(68, 69)
PPT	100	Ultra-Turrax 1 min, vel. NF	60 ml metanol:HCl 12M (99:1), 4h, 25°C + 60 ml metanol:HCl 12M (99:1), 12h, 25°C + 60 ml metanol:HCl 12M (99:1), 4h, 25°C	18h	25°C	Si (200 ml con metanol)	AT, CFT	(42)
PPT	128 g	Ultra-Turrax 1 y vel. NF	100 ml acetona. Re-ext: 100 ml H ₂ O:acetona (30:70) hasta pérdida de color	NF	20-25°C	si (100 ml con HCl 0.01%)	AT	(70)
PPT	90	NF	Proporción 100g piel/400 ml metanol:HCl 12M (99:1)	24h	4°C	no	AT, CFT, IC, To	(71)
PPT	50	NF	40 ml sol. (metanol + ácido fórmico 5%), 30 min, 20-25°C. Re-extracción con 40 ml sol., 1h, 20-25°C	1.5h	20-25°C	si (100 ml con sol.)	AT, CFT, TC, Cat., IC, To	(72, 73)
PCT	300	Ultra-Turrax 30 s, 24000 rpm	20 discos piel de 5 mm diámetro/100 ml sol (metanol 50% + HCl 1%, pH 1.0)	30 s	20-25°C	si (100 ml con sol.)	AT, CFT	(74, 75)
PCT	5-15	Licudadora 1 min, vel. NF	40 ml (metanol + HCl 0.1%) añadidos a la licudadora	1 min	20-25°C	no	AT	(76)
PCT	50	Ultra-Turrax 2 min, vel. NF	400 ml (metanol + HCl 0.1%) añadido a la licudadora	2 min	20-25°C	no	AT	(77)

Tabla III.1. Metodologías para evaluar el contenido fenólico de la uva tinta (Continuación)

Material analizado	Nº bayas	Trituración	Procedimiento de extracción	Tiempo	Tª	Vol. extracto constante	Parámetros analizados	Referencias
PCLT	250	Ultra-Turrax T y vel. NF	Triturado pieles 50 uvas/200 ml sol. (EtOH 80% + HCl 0.1%), 30 min., 30°C; 2ª ext: 200 ml sol., 30 min., 50°C 3ª y 4ª ext.: 200 ml HCl 2M, 30 min., 70°C	2h	30-70°C	si (100 ml con sol.)	AT, CFT	(62)
PCLT	100	NF	2.5 g/50 ml metanol:ácido fórmico (95:5)	NF	NF	no	AT, CFT, TC, Difénols	(78, 79)
PCLT	50	Ultra-Turrax t y vel. NF	1 g/20 ml sol. (EtOH 50%, pH 4.0) (x 4)	NF	20-25°C	si (100 ml con sol.)	AT, TC	(80)
PCLT	50	Licuadaora 8 min. vel. baja.	50 ml metanol:ácido fórmico:H ₂ O (50:1.5:48.5) añadidos a la licuadora	8 min	4°C	no	AT, CFT, TC.	(81)
PCLT	50	Mortero	1g/ 20 ml metanol:ácido fórmico (95:5) (x 5)	30 min.	30°C	no	AT	(82)
PCLT	30	Mortero	250 mg/30 ml metanol	noche	4°C	no	AT, TC	(83)
PCLT	50	Mortero	50 ml metanol:ácido fórmico: (98:2) Re-extracción hasta pérdida de color	24h	4°C	no	AT	(84)
PCLT	1	Molino de bolas 3 ráfagas de 20 s. máx. vel.(30 Hz)	1 ml sol. (metanol 50% + HCl 0.1%) (x3)	3 min.	20-25º	si (3 ml con sol.)	AT	(85)
P&Pp FE	20	-	Pieles/25 ml EtOH 95%:H ₂ O:HCl 12M (70:30:1), 12h, 20-25°C Pieles, pepitas/50 ml sol. pH 3.2. 7 días, 25°C	7 días	20-25°C	no	CFT, CFE, AT, TC	(86)

Tabla III.1. Metodologías para evaluar el contenido fenólico de la uva tinta (Continuación)

Material analizado	Nº bayas	Trituración	Procedimiento de extracción	Tiempo	Tª	Vol. extracto constante	Parámetros analizados	Referencias
P&Bp FE	50	-	CFT: Pielés/peptías 50 uvas/125 ml sol. (EtOH12% + Na ₂ S ₂ O ₅ (2 g/L), pH 3.2, 4h, 20-25°C CPE: Pielés/peptías 50 uvas/(peso 50 uvas) x 0,8 ml sol. pH 3.2 + Na ₂ S ₂ O ₅ (40 mg/l) + Na ₂ (50 mg/l), 48h, 30°C	48h	20-30°C	si (250 ml con sol., sólo la fracción CFT)	AT, AE, CFT, CPE, TC, Cat., IC, To	(87, 88)
P&Bp FE	200	-	Pielés/ 450 ml sol. EtOH 15%, pH 2.45 (x3. 1ª 5h con agít., 2ª 15h, sin agít., 3ª 24h sin agít.), 20-25°C. (x2 misma sol. 100°C). Enrase hasta 500 ml con sol. Peptías/ 150 ml sol. EtOH 15%, pH 2.45 (x3. 1ª 5h con agít., 2ª 15h, sin agít., 3ª 24h sin agít.), 20-25°C. (x2 misma sol. 100°C). Enrase hasta 200 ml con sol.	44h	20-100°C	si (200 y 500 ml con sol.)	AT, CFT	(61, 62, 89)
P&Bp FE	100	-	EtOH 96% + HCl 2% (vol NF), 5-7h pielés y 6-8 días peptías	8 días	20-25°C	no	AT, TC	(90)
P&Bp FE	200 g	-	250 ml sol. (EtOH 12%, 5 g/L, H ₂ T 100 mg/L SO ₂ , pH 3.2.	5 días	30°C	Si (300 ml pielés, 250 ml peptías con sol.)	AT, CFT, TC, Cat.	(50, 91, 92)
P&Bp FE	20	-	20 ml acetona 70%. Evaporación acetona 38°C.	noche	20-25°C	Si (100 ml con H ₂ O)	TC	(93)
P&Bp FE	NF	-	Acetona: H ₂ O:HCl 12M (70:30:0.1) + NaCl + éter petróleo + éter etílico + EtOAc (vol NF)	NF	20-25°C	no	AT, AF, TC, Cat, Epic.	(94)
P&Bp FE	100	-	Pielés/ peptías: vol. equivalente mosto uvas de sol. EtOH 12% + 5 g/L H ₂ T, pH 3.4, ultrasonidos (agua helada), 2h Pielés/ peptías: vol. equivalente mosto uvas de sol. EtOH 12% + 5 g/L H ₂ T, pH 3.4, 9 días, 20-25°C	9 días	20-25°C	no	IMC30, AT30, ATF, IDA%, IDT%	(95)

Tabla III.1. Metodologías para evaluar el contenido fenólico de la uva tinta (Continuación)

Material analizado	Nº bayas	Trituración	Procedimiento de extracción	Tiempo	Tª	Vol. extracto constante	Parámetros analizados	Referencias
P&Pp FE	100	-	125 ml sol. EtOH 13% + 4g/L H ₂ T + 80 mg/L K ₂ S ₂ O ₅ , pH 3.5.	7 días	28°C	no	AT, CFT, IC	(96)
P&Pp FE	NF	-	Lavado con acetona:H ₂ O (3:2)	NF	NF	no	TC	(97)
PFT& PpFE	10 g	Ultra-Turrax t y vel. NF	Pieles/25 ml sol. EtOH 12% + 600 mg/L Na ₂ S ₂ O ₅ + 50 mg/L Na ₂ N ₃ + 5 g/L H ₂ T, pH 3.2, 10 min., 20°C. Pepitas/50 ml sol. 7 días, 25°C.	7 días	20-25°C	no	CFT, TC, Cat.	(23)
U-PpFT & PpFE	100	Mortero	50 g (uvas sin pepitas y pepitas por separado)/100 ml sol. (metanol 90% + HCl 0.1% + 20g arena (lavado mortero con 50 ml sol. (x2)), 2h, 20-25°C. Re-extracción (x2) con 125 ml sol., 2h, 20-25°C (lavado filtro con 50 ml sol.)	6h	20-25°C	si (500 ml con sol.)	AT, TC, leucoantocianos	(98)
P&Pp CLT	100	NF	1g/240 ml metanol 50% +HCl 0.5%, 6h, 20-25°C. 2ª extracción con 240 ml acetona 50%, 4h, 20-25°C. Ambos extractos se juntan.	10h	20-25°C	si (500 ml con H ₂ O)	AT, TC	(99)
P&Pp CLT	200	Ultra-Turrax 1min. vel. NF	250 ml EtOH 12%, pH 3.2	6h	20-25°C	no	AL, TC, T-P, T-A, Cat.	(100)
P&Pp CLT	100	NF	0.1g/2 ml (1 ml acetona 70% + 1ml ácido ascórbico 0.1%)	24h	20-25°C	no	TC	(101)
PCLT & PpDesgt	100	Molinito de café t NF. Tp < 50 µm	2.5 g pieles trituradas/50 ml metanol:ácido fórmico (95:5), 12h, 20-25°C. 2 re-extracciones más. Concentración a 25 ml en rotavapor (Tª <35°C). Enrase a 50 ml con H ₂ O. 0.25 g pepitas trituradas desgrasadas con hexano (40 ml, 15 min.)/40 ml acetona:H ₂ O:ácido acético (70:29:50:5), 30 min ultrasónicos. Concentración a 5 ml en rotavapor (Tª <35°C), liofilización.	12h	20-25°C	si (pieles 50 ml con H ₂ O)	AT, CFT, TC, Cat.	(102)

Tabla III.1. Metodologías para evaluar el contenido fenólico de la uva tinta (Continuación)

Material analizado	Nº bayas	Trituración	Procedimiento de extracción	Tiempo	Tª	Vol. extracto constante	Parámetros analizados	Referencias
PpFT	NF	Molino de café 1 NF, Tp < 0,63 mm	0,5 g/20 ml EtOH 50%	200 min	80°C	si (20 ml con sol.)	CFT, TE, Parámetros CIELAB	(103)
PpFT	NF	Molino de café 8x15 s	0,5g/ 20 ml EtOH 50%	200 min	80°C	Si (25 ml con EtOH 50%)	CFT	(104)
PpFT	NF	Molino de café 8 x15 s	240 mg/10 ml metanol:H ₂ O (4:1), ultrasonidos	1h	< 30°C	no	Cat.	(105)
PpSeCT	NF	Molino de café 1 NF	100g/500 ml EtOH 100%	24h	20-25°C	no	TC	(106)
PpDesgT	NF	NF	50 g/150 ml EtOAc:H ₂ O (17:3)	5h	60-70°C	no	TC, Cat.	(107)
PpDesgT	NF	NF	100g/150 ml acetona:H ₂ O:ácido acético (90:9:5:0:5)	8h	60-80°C	no	CFT, TC, Cat.	(108)
PpDesgT	NF	Molino de café 1 NF	100g/200 ml acetona:H ₂ O:ácido acético (90:9:5:0:5)	8h	60°C	no	CFT	(109)

l.: tiempo; **vel.**: velocidad; **tp.**: tamaño de partícula; **NF.**: no facilitado; **EtOH.**: etanol; **H₂T.**: ácido tartárico; **EtOAc.**: acetato de etilo; **UFT.**: uva fresca triturada; **UCT.**: uva congelada triturada; **PV.**: pasta de vendimia; **PFE.**: pieles frescas enteras; **PCE.**: pieles congeladas enteras; **PFT.**: pieles frescas trituradas; **PCT.**: pieles congeladas trituradas; **PCLT.**: pieles congeladas y liofilizadas trituradas; **P&PFE.**: pieles y pepitas frescas enteras analizadas por separado; **PFT&PFE.**: pieles frescas trituradas y pepitas frescas enteras; **U-PpFT&PFE.**: Uvas sin pepitas frescas trituradas y pepitas frescas enteras; **P&PpCLT.**: pieles y pepitas congeladas y liofilizadas trituradas analizadas por separado; **PCLT&PDesgT.**: pieles congeladas y liofilizadas trituradas y pepitas desgrasadas trituradas; **PpFT.**: pepitas frescas trituradas; **PpSeCT.**: pepitas desecadas trituradas; **PpDesgT.**: pepitas desgrasadas trituradas; **AT.**: antocianos totales; **AE.**: antocianos extraíbles; **AL.**: antocianos libres; **AF.**: ácidos fenólicos; **CFT.**: compuestos fenólicos totales; **CPE.**: compuestos fenólicos extraíbles; **TC.**: taninos condensados; **TP.**: taninos polisacáridos; **TA.**: taninos-antocianos; **Cat.**: catequinas; **Epic.**: epicatequinas; **IC.**: intensidad colorante; **To.**: tonalidad; **EA%**: extractabilidad celular; **MP%**: madurez fenólica de las pepitas; **PMT.**: tendencia de la madurez fenólica; **CP.**: color probable; **IMF.**: índice de madurez fenólica; **IMC30.**: índice de madurez celular a los 30 min; **AE30.**: antocianos extraídos a los 30 min; **ATE.**: antocianos totales extraídos; **IDA%**: índice de difusión de los antocianos; **IDT%**: índice de difusión de los taninos.

III.2.1.1 Métodos que analizan la uva entera

Las bodegas, que deben llevar a cabo controles de maduración de la uva tinta durante toda la campaña estival, suelen utilizar este tipo de métodos para analizar la uva por su rápida y sencilla preparación.

Entre ellos, los más directos son aquellos que no utilizan ningún tipo de disolvente y eluden la etapa de extracción, como el método CASV (32), donde se tritura la uva entera en una licuadora y se analiza el mosto obtenido tras centrifugación, o el de Iñiguez (53), donde se analiza el mosto centrifugado de la pasta de vendimia. En esta misma línea encontramos los métodos de Franco e Iñiguez (52) y Celotti *et al.* (38), en los que analizan el color en el triturado de uva.

Mattivi *et al.* (49, 50) proponen un método rápido basado en la trituración de la pasta de uva estrujada y desecada añadiendo medio ácido a la licuadora. Sin embargo, no se considera un método de extracción entendido como una maceración, ya que se trata de una solubilización de 1 minuto de duración a temperatura ambiente.

Uno de los métodos más recientes es el de Celotti *et al.* (39), que además es un método muy rápido, simple y que tampoco requiere reactivos ni equipos sofisticados. Este método consiste en colocar las uvas en una bandeja e introducirla en un microondas convencional durante 5 minutos a 300w de potencia.

La radiación microondas provoca un movimiento de rotación en los enlaces de las moléculas de agua de dentro de las uvas, generando fricción y elevando la temperatura del agua hasta transformarse en vapor. El vapor aumenta la presión dentro de la baya y causa la explosión de las células de la piel, de manera que se facilita la liberación de la materia fenólica. A continuación, las uvas se sacan del microondas, se Trituran en una licuadora y el triturado centrifuga cuando alcanza la temperatura ambiente.

Respecto a los métodos que sí contemplan una fase de extracción con disolventes, la primera propuesta fue desarrollada por Glories y Augustin (9) y, aún hoy en día, sigue siendo el método más empleado por los enólogos (7,9-

25). Según el procedimiento descrito, se emplean dos soluciones ácidas a diferente pH para macerar fracciones de triturado obtenido con licuadora, una al pH del mosto/vino (pH 3.2) y la otra fuertemente ácida (pH 1.0), a temperatura ambiente y durante 4 horas, con el fin de conocer el porcentaje de compuestos fenólicos de la uva que se extraen durante la vinificación. Así, mientras que la solución a pH 1.0 disuelve la totalidad de los compuestos fenólicos de las pieles debido a que la alta acidez degrada las membranas de las células de la piel liberando su contenido fenólico, la de pH 3.2 sólo disuelve los fácilmente extraíbles, que son los que pasarán al vino durante la vinificación.

Existen diferentes adaptaciones del método de Glories, como el de Nadal (26), que emplea también una solución a pH 1.0 para extraer totalmente los compuestos fenólicos, pero la solución empleada para estimar los compuestos fenólicos extraíbles está ajustada a pH 3.6 en lugar de 3.2, ya que lo han adaptado al pH de los vinos que se obtienen en su región. A diferencia del método de Glories, el de Nadal dura 1 hora, lo que acorta considerablemente el tiempo de análisis.

Existen otros métodos que en lugar de emplear dos soluciones ácidas de diferente pH, emplean una única solución extractante ácida con un contenido etanólico similar al del vino, como es el caso del método ITV (27-30), con el fin de cuantificar el contenido fenólico de las pieles y las pepitas de manera objetiva. La fracción ácida degrada las membranas de las células de la piel y ayuda a extraer los antocianos y taninos de las pieles. La fracción etanólica, por su parte, facilita la extracción de los taninos de las pepitas porque disuelve la capa cerosa que las recubre (1), ya que éstas se mantienen intactas tras triturarlas con licuadora.

Por otro lado, hay métodos de extracción que emplean una mayor concentración de etanol del que se puede encontrar en el vino con el fin de extraer totalmente los compuestos fenólicos contenidos en la piel y pepitas de la uva, como es el método AWRI (43-48), que emplea etanol al 50%. Además, estos autores emplean un equipo homogeneizador Ultra-Turrax®, que tritura las pieles y pepitas hasta obtener partículas muy pequeñas, facilitando la

extracción de los compuestos fenólicos y pudiendo fijar la extracción en el tiempo razonable de 1 hora.

Si bien el método AWRI se desarrolla a temperatura ambiente, otros autores, como Bourzeix *et al.* (35), emplean etanol concentrado (95%) en una criextracción desarrollada a -24°C durante toda la noche. A esta temperatura se protege la integridad de los compuestos fenólicos en disolución.

El método desarrollado por Vanini *et al.* (41) emplea etanol en una elevada concentración (70%) a pH 2.0 para llevar a cabo una maceración a baja temperatura (4°C) durante toda la noche.

Por su parte, la metodología propuesta por Jensen *et al.* (51) utiliza una solución etanólica (25%) ácida, pero en lugar de emplear baja temperatura, la extracción tiene lugar a 40°C y dura tan sólo 5 minutos, por lo que resulta un método bastante rápido.

Otros autores optan por la utilización de disolventes diferentes al etanol para la extracción de los compuestos fenólicos, como el metanol, ya sea solo (36, 42, 55) o combinado con medio ácido (37, 42, 54-56).

Por último, existen otro tipo de métodos que combinan conjuntamente un disolvente ácido con el empleo de altas temperaturas (termoextracción), entre 70°C y 80°C , que degradan las membranas de las células de la piel y solubilizan los compuestos fenólicos contenidos en ellas (17, 34, 40).

Aunque, como se ha mostrado, existen numerosos métodos de extracción para analizar la uva entera, no todos han tenido el mismo éxito en su aplicación en el sector. Concretamente, los más utilizados son el método de Glories, el método ITV, el método AWRI y el método Cromoenos® por lo que, a continuación, se describen de manera más detallada. Cabe señalar que en la presente Tesis Doctoral fueron los tres primeros lo que se emplearon para realizar los distintos estudios, dado que el método Cromoenos® requiere una licencia de uso que, a nuestro entender, limita su aplicación en todas las bodegas.

Método de Glories

Nº de bayas: 100-200

Trituración: licuadora, 2 min, velocidad baja (1)

Extracción:

- 50 g triturado/50 ml sol. pH 1.0 (HCl 0.1M)
- 50 g triturado/50 ml sol. pH 3.2 (5 g/L ácido tartárico, ajuste de pH con NaOH 0.1M)

Tiempo de extracción: 4h

Temperatura de extracción: 20-25°C

Entre las metodologías que analizan la uva entera, muy probablemente, la más utilizada por los enólogos sea la de Glories (9, 10), por ser el que determina la riqueza fenólica de las uvas en términos de antocianos y taninos, pero también porque proporciona una idea de la capacidad que presentan estos compuestos de ser extraídos. Además facilita información sobre el papel que tienen las semillas en el aporte fenólico al vino tras la maceración.

El método emplea dos soluciones ácidas para extraer los compuestos fenólicos de la uva triturada en dos fracciones, de manera que en una se produzca una extracción suave, al pH del mosto/vino (pH 3.2) y en la otra una extracción más agresiva a pH muy ácido (pH 1.0). Estas soluciones de diferente pH producen una eficacia de extracción de los compuestos fenólicos distinta. La solución a pH 3.2 reproduce las condiciones industriales de la maceración pre-fermentativa para conocer los compuestos fenólicos fácilmente extraíbles durante la vinificación, ya que es en medio acuoso donde se disuelven más fácilmente los antocianos y taninos libres poco polimerizados procedentes de la piel (5).

Por su parte, el medio fuertemente ácido, a pH 1.0, altera la membrana fosfolípida de las células de la piel, rompiendo las uniones entre proteínas y liberando el contenido de las vacuolas. Esto hace que se produzca la extracción total de antocianos y taninos.

El procedimiento del método, resumido en el recuadro anterior, consiste en triturar 200 uvas y tomar dos fracciones de 50 g del triturado: una se macera con 50 ml de solución tampón a pH 3.2 y la otra con 50 ml de solución ácida a pH 1.0 durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, ambos macerados se centrifugan y a los extractos obtenidos se les mide el contenido antocianico mediante lectura de la absorbancia a 520 nm, tras decoloración con metabisulfito (110).

La diferencia entre ambos resultados es un reflejo del grado de fragilidad de la membrana celular de las pieles y, por tanto, de la madurez fenólica de la uva, la cual influirá en la capacidad de extracción de los antocianos. Según Glories, la fecha óptima de vendimia debería ser 10 días después de obtener el máximo de antocianos extraíbles (111).

Finalmente, se miden los compuestos fenólicos totales en el extracto a pH 3.2, mediante lectura de la absorbancia a 280 nm (112). De esta manera, se definen dos índices de madurez fenólica: la extractabilidad celular, también llamada extractabilidad antocianica (EA%) y la madurez fenólica de las pepitas (MP%).

Estos índices de madurez fenólica se calculan de la siguiente manera:

$$EA \% = \left[\frac{(A_{pH1.0} - A_{pH3.2})}{A_{pH1.0}} \right] \cdot 100 \quad \text{Ec. III.1}$$

$$MP \% = \left[\frac{(A_{280(pH3.2)} \cdot FD) - \left(A_{pH3.2} \cdot \frac{40}{1000} \right)}{(A_{280(pH3.2)} \cdot FD)} \right] \cdot 100 \quad \text{Ec. III.2}$$

donde,

$A_{pH1.0}$ = Antocianos totales (mg/L)

$A_{pH3.2}$ = Antocianos extraíbles (mg/L)

$(A_{280(pH3.2)} \cdot FD)$ = Compuestos fenólicos totales fácilmente extraíbles (IPT)

FD = factor de dilución

$$\left(A_{\text{pH}3.2} \cdot \frac{40}{1000} \right) = \text{Taninos de la piel estimados a partir de los antocianos extraíbles (g/L)}$$
$$\left(A_{280(\text{pH}3.2)} \cdot \text{FD} \right) - \left(A_{\text{pH}3.2} \cdot \frac{40}{1000} \right) = \text{Taninos de las pepitas (g/L)}$$

Los compuestos fenólicos fácilmente extraíbles corresponden a la suma de los antocianos de las pieles, de los taninos de las pieles y de los taninos de las pepitas. Asumiendo una extractabilidad similar para antocianos y taninos, es posible establecer que:

$$A_{280(\text{pH}3.2)} \cdot \text{FD} = \text{Antocianos piel} + \text{Taninos piel} = A_{\text{pH}3.2} \cdot \alpha \quad \text{Ec.III.3}$$

Por tanto, α es la ratio entre los compuestos fenólicos fácilmente extraíbles ($A_{280(\text{pH}3.2)}$) y los antocianos fácilmente extraíbles ($A_{\text{pH}3.2}$), que se corresponden con los taninos de la piel. Por tanto, los taninos de las pieles pueden calcularse a partir del contenido de antocianos fácilmente extraíbles ($A_{\text{pH}3.2}$), multiplicando por 40.

Experimentalmente, el valor de la constante α puede variar entre variedades y años. El valor de $\alpha=40$ es una media proporcionada por Glories, tras el análisis de diversas variedades de uva en Burdeos (12).

A modo de ejemplo, los valores de α pueden oscilar entre 32 y 36, en el caso de Merlot, y de 40 a 45, en el caso de Cabernet sauvignon, por lo que se considera que 40 es una media representativa de todas las variedades, aunque resulta incierta (113).

El valor de la constante α no se puede aplicar globalmente en todo el mundo, ya que las variedades y condiciones ambientales pueden hacerlo fluctuar bastante.

Por ello, otros autores han corregido este factor, como es el caso de Cagnasso *et al.* (7), por considerar que la constante $\alpha=40$ resultaba demasiado baja para las variedad de uva que estudiaban, la Nebbiolo, la cual es rica en taninos. En su lugar, α se sustituyó por 70.

Respecto a los índices de madurez fenólica, la extractabilidad antocianica representa el porcentaje de antocianos que no serán extraídos durante la vinificación, y por tanto, quedarán retenidos en las pieles. Una baja extractabilidad significa que los antocianos se extraen fácilmente y esto ocurre a medida que la uva va madurando y la piel se va haciendo cada vez más frágil. Según Glories (12), este parámetro puede oscilar entre el 70% y el 20% a lo largo de la maduración, presentando el valor más bajo en el momento de la vendimia.

Por su parte, la madurez fenólica de las pepitas representa el porcentaje de taninos aportados por las pepitas, y ayuda también a evaluar el nivel de maduración de la uva. Este dato se obtiene mediante la diferencia entre los compuestos fenólicos extraíbles y los taninos de las pieles, y estos últimos a su vez se han obtenido indirectamente a través de los resultados de los antocianos extraíbles.

El contenido tánico de las pepitas disminuye progresivamente durante la maduración debido al proceso de polimerización que tiene lugar y, en consecuencia, disminuye la sensación de astringencia. Su valor puede oscilar entre el 60% y el 10% desde el comienzo hasta el final de la maduración, según Glories (12).

A continuación (Tabla III.2) se presenta una comparación llevada a cabo por los autores entre los índices de madurez fenólica de algunas variedades pertenecientes a diferentes regiones de Francia y España en el momento de la vendimia (113).

En el momento de la vendimia es recomendable que el contenido total de antocianos, $A_{\text{pH}1.0}$, sea mayor de 1000 mg/L y que los valores de EA% y MP% sean inferiores al 30% (5). Sin embargo, no siempre es posible conseguirlo, puesto que estos valores dependen no sólo del potencial fenólico de cada variedad de uva, sino también de las condiciones edafoclimáticas particulares de la zona vitícola. Así pues, se debe ajustar la vinificación al nivel de maduración fenólica de la materia prima (12).

Tabla III.2. Índices de madurez fenólica de variedades cultivadas en diferentes regiones vitícolas de Francia y España en el momento de la vendimia (113)

	A_{pH1.0}	EA%	MP%
Merlot			
Graves	1549	63.5	14.5
Pomerol	2399	45.5	23
Médoc	1995	46.5	25
Entre-deux-mers	867	71.5	48.2
Cabernet sauvignon			
Médoc 1	1850	52	54
Médoc 2	1587	58	51
Médoc 3	1972	53.5	50
Médoc 4	1674	61.5	37
Tempranillo			
Rioja 1	1375	53	40
Rioja 2	1204	65	36
Rioja 3	1130	62.5	41
Rioja 4	1109	67	34

La validez de este método para determinar la madurez fenólica de la uva fue determinada evaluando la correlación existente entre los resultados obtenidos en uvas y en sus correspondientes vinos (113).

A partir de este estudio, se pudieron establecer correspondencias entre los parámetros de madurez fenólica de la uva y la calidad del vino, permitiendo predecir el contenido fenólico del vino a partir de los resultados de madurez fenólica de la uva mediante el uso de las siguientes expresiones:

$$\text{Antocianos totales en el vino (mg/L)} = 0.7 \cdot A_{pH3.2} + 130 \quad \text{Ec.III.4}$$

$$\text{Taninos pepitas en el vino (\%)} = 1.1 \cdot \text{MP\%} + 5 \quad \text{Ec.III.5}$$

Por tanto, se pueden emplear los resultados del método para evaluar la madurez fenólica de la uva a fin de conducir las vinificaciones en función de los vinos que se pretende elaborar.

El principal inconveniente que presenta esta metodología es el largo tiempo que requiere la extracción y la necesidad de preparar y analizar dos

extractos por cada muestra de uva en estudio. Por otra parte, los datos relativos a la concentración de taninos en las pieles y pepitas se obtienen indirectamente y, como se ha comentado anteriormente, el enólogo debe aplicar un valor de α adecuado a su cultivo en particular, si no podría obtener resultados de los índices de madurez fenólica erróneos.

Método ITV

Nº de bayas: 100

Trituración: licuadora, 2 min, velocidad baja

Extracción: 50 g triturado/85 ml HCl 0.1% + 15 ml EtOH 96%

Tiempo de extracción: 1-2h

Temperatura de extracción: 20-25°C

Otro de los métodos de extracción sugeridos para evaluar la madurez fenólica es el adoptado por el *Institut Technique de la Vigne et du Vin* en Francia y conocido como el método *ITV Standard*. Éste fue desarrollado por Lamadon (27) y más tarde optimizado por Cayla *et al.* para reducir el tiempo de maceración (30). En él se evalúa el contenido fenólico de la uva entera a partir de una extracción parcial del contenido fenólico de la baya utilizando una solución etanólica acidificada. Los parámetros que se analizan para observar el potencial fenólico de la uva son los antocianos totales (114) y los compuestos fenólicos totales (IPT) (112).

Para determinar el momento en el que la uva alcanza la madurez fenólica, se realiza la observación de la evolución del contenido de antocianos totales en una gráfica construida a lo largo de los controles de maduración. Cuando se observa un descenso inmediatamente posterior al pico máximo de concentración de antocianos totales, se establece que es el momento idóneo para vendimiar, ya que se ha llegado a la etapa de sobremaduración. La uva cosechada tras este máximo, que puede darse entre las siguientes 2 semanas, produce los vinos mejor puntuados por un panel de cata experto. Este método es sencillo, repetitivo y viable para ser aplicado en bodega, dado que emplea menos tiempo para la maceración que el de Glories.

Sin embargo, la fecha de la vendimia se establece a partir de las mejores notas de cata de los vinos obtenidos años atrás pero todavía no se ha podido establecer una relación directa entre el contenido fenólico de las uvas y sus correspondientes vinos, por lo que su capacidad de predicción de la composición del vino final sigue pendiente de verificar.

Método AWRI

Nº de bayas: 50

Trituración: Homogeneizador Ultra-Turrax®, 30 s, velocidad máx. (24000 r.p.m.)

Extracción: 1 g triturado/10 ml EtOH 50%

Tiempo de extracción: 1h

Temperatura de extracción: 20-25°C

Otro de los métodos de rutina que analiza la uva entera es el adoptado por el *Australian Wine Research Institute* (AWRI), desarrollado por Iland *et al.* (43, 44).

Este método se basa en la maceración del triturado de uva en un medio altamente etanólico (etanol 50%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Así se consigue una extracción total de los compuestos fenólicos. El método es especialmente eficaz en la extracción de los taninos de las semillas, pero también de los antocianos, puesto que el precipitado queda prácticamente sin color.

El potencial fenólico de la uva se mide a través del contenido en compuestos fenólicos totales y antocianos totales por dilución 1:25 del extracto con HCl 1M (44). También se determinan los taninos, mediante su precipitación con metilcelulosa (47, 48).

La ventaja de este método es que, al ser un método que extrae los compuestos fenólicos en su totalidad, desde el punto de vista analítico es bastante repetitivo. Ahora bien, desde el punto de vista enológico resulta un método de extracción tan agresivo que no pueden apreciarse diferencias en el

contenido fenólico de la uva en las últimas etapas de maduración, lo que no sirve de ayuda al enólogo para decidir el momento más adecuado para vendimiar.

Por otra parte, hay que decir que la validez de este método para determinar la composición del vino obtenido a partir de los datos del contenido fenólico de la uva no se ha determinado con ensayos de vinificación.

Una modificación del método AWRI es el propuesto por Jensen *et al.* (51), que emplea una solución etanólica ácida mezclando un volumen de etanol 50% con otro de HCl 0.1M, para obtener finalmente una concentración de etanol del 25%. Además, reduce el tiempo de maceración hasta los 5 minutos calentando la muestra a 40°C. Se analizan los compuestos fenólicos totales y antocianos totales por dilución 1:25 del extracto con HCl 1M (44). También se determinan los taninos, mediante su precipitación con metilcelulosa (47, 48).

El buen funcionamiento de esta variante del método AWRI se ha verificado mediante ensayos de vinificación (115). Sin embargo, hay que destacar que para establecer correlaciones entre los extractos de las uvas y sus vinos correspondientes se emplearon uvas maduras que fueron congeladas tras el muestreo sin comprobar el efecto de este método de conservación sobre las muestras, por lo que la extractabilidad de los compuestos fenólicos y la robustez de los modelos de predicción podrían haberse visto afectadas.

Método Cromoenos®

Peso de bayas: 1Kg

Trituración: licuadora, 1.5 min, 3600 r.p.m.

Extracción: 80-100 ml triturado/1 ml sol. A (enzimas pectolíticos) + 4 ml sol. B (medio ácido) + 40 ml H₂O, 900 r.p.m.

Tiempo de extracción: 2 min

Temperatura de extracción: 80°C

El método Cromoenos®, desarrollado y patentado en 2003 por la empresa Bioenos, S.L. (40), se basa en una termoextracción combinada con la adición de unos reactivos proporcionados por la empresa que favorecen la extracción de los compuestos fenólicos del triturado. Este método de extracción es bastante rápido comparado con los anteriores, ya que apenas dura un par de minutos.

Según el protocolo del método, hay que triturar las uvas para obtener una pasta homogénea, de la que se toman aproximadamente 100 ml y a la que se le añaden consecutivamente los diferentes reactivos.

Para aumentar el rendimiento de la extracción, la pasta se calienta en un baño de agua a 80°C durante 2 minutos bajo agitación. A continuación, se toma un pequeño volumen de pasta (1-2 ml) y, tras centrifugarlo, el sobrenadante se diluye 1:100 con una solución de HCl 2% y se miden las absorbancias a 520 y 280 nm.

A partir de estas medidas se definen los parámetros D520 y D280, que corresponden a la lectura de la absorbancia a 520 nm y 280 nm, respectivamente. Se multiplica por 100 en ambos casos.

Con este método se evalúa el Índice de Madurez Fenólica (IMF) de las uvas y el Color Probable (CP) del vino. El IMF se define como la ratio entre D280/D520, y conforme su valor se aproxima a 1.5-1.2 durante la maduración, indica que estamos en el mayor potencial fenólico de la uva (116).

El CP de las uvas se determina mediante la introducción en el software facilitado por la empresa de los datos relativos a la variedad de uva, D520, D280 y otros parámetros de madurez tecnológica como el peso de 100 uvas, grado alcohólico probable (GAP), acidez total y pH del mosto.

El color probable de las uvas se correlaciona bastante bien con la intensidad colorante (IC) del vino obtenido tras la fermentación maloláctica y el embotellado, ofreciendo un coeficiente de determinación (R^2) superior a 0.99 (116).

El método Cromoenos® es un método sencillo y rápido, lo que unido a su comprobada capacidad para predecir el color del vino final mediante ensayos de vinificación de diferentes variedades de uva en toda España, lo convierten en un método muy atractivo para ser usado en las bodegas de nuestro país.

Sin embargo, uno de los inconvenientes que plantea este método es la desconfianza que puede producir el empleo de una temperatura tan elevada sobre la estabilidad de los compuestos fenólicos que se van a analizar.

En otros ensayos donde se ha estudiado el empleo de diferentes temperaturas en la extracción de los compuestos fenólicos de macerados de uvas trituradas (117, 118), se ha observado que aunque el aumento de la temperatura favorece la extracción de los compuestos fenólicos, a temperaturas superiores a 55°C se favorece la oxidación de los compuestos fenólicos, afectando a su estabilidad, por lo que la temperatura no puede incrementarse indefinidamente.

Además, otra de las desventajas que presenta este método es la exigencia de adquirir la licencia de uso, junto con los equipos y reactivos necesarios, a través de un único proveedor, lo que encarece su coste.

III.2.1.2 Métodos que analizan las diferentes partes de la uva

Los métodos que analizan pieles y pepitas por separado han sido desarrollados en centros de investigación pero, por lo general, no se aplican en bodega por resultar tediosos y largos.

Se pueden distinguir dos grandes grupos dentro de esta familia de métodos: los que analizan las pieles y pepitas enteras, y los que Trituran ambas fracciones antes de macerar.

Dentro de las metodologías que mantienen íntegras las pieles y pepitas se encuentran aquellos que emplean medios con una elevada concentración de etanol y ácido (64, 86, 90) y los que emplean un vino sintético con una

concentración de etanol, SO₂ y pH similar al que podemos encontrar en un vino real (8, 50, 87-89, 91, 95, 96) .

En el método propuesto por Torchio *et al.* (23), se da la circunstancia de que las pieles se trituran finamente con un homogeneizador Ultra-Turrax®, y las pepitas se analizan sin triturar empleando el mismo vino sintético en ambos casos.

Los métodos denominados Angers (33, 57) y Roson (34) maceran únicamente las pieles enteras de la uva usando como medio de extracción un vino sintético, pero mientras que el método de Roson se desarrolla a 35°C durante 6 horas, el de Angers se acorta a 3 horas subiendo la temperatura a 70°C. Por otro lado, el método de Delgado *et al.* (58) macera las pieles enteras en un vino sintético empleando un tiempo y temperatura intermedios, 4 horas a 50°C.

También en la metodología propuesta por Margheri *et al.* (98), la piel junto con la pulpa se tritura en un mortero tras separar las pepitas y las dos fracciones pero en este caso éstas se extraen empleando metanol acidificado.

Existen, sin embargo, trabajos realizados por otros autores que han optado por emplear otros disolventes como la acetona como medio de extracción de los compuestos fenólicos de pieles y pepitas enteras (93, 94, 97) y también encontramos estudios en los que combinan el uso de alcohol y acetona, como el de Roson y Moutonet (99), que proponen triturar las pieles y pepitas tras ser congeladas y liofilizadas y macerarlas en un medio compuesto por metanol y HCl, aunque después se hace una nueva extracción con acetona.

En lo que respecta a los métodos que tras congelar y liofilizar las pieles optan por triturarlas, existen variantes que las maceran en medios con unos niveles de etanol y de pH similares al del vino (66, 100) y otros que las maceran en un medio altamente etanólico y ácido (62) o bien en un medio etanólico y moderadamente ácido, como el de Mateus *et al.* (80), que emplea etanol al 50% y pH 4.0.

Otros disolventes empleados en la maceración de pieles trituradas son el metanol (64, 78, 79, 81, 83, 84), metanol combinado con ácido fórmico (82, 102), metanol y HCl (0.1%) (76, 77, 85) o acetona (70, 101).

Como ya se ha dicho, también las pepitas han sido el objeto de estudio de varios autores, siendo trituradas, en algunos casos, antes de la etapa de extracción. Los métodos de extracción se pueden agrupar entre los que maceran las pepitas trituradas directamente y los que las someten a una etapa previa de desgrasado para eliminar la cutícula cerosa que las recubre.

Los medios de extracción utilizados para macerar el triturado de las pepitas sin desgrasar abarcan el etanol puro (106), etanol al 50% combinado con una temperatura de 80°C (termoextracción) (103, 104) o una solución metanólica (105), esta última comparada con una extracción llevada a cabo mediante CO₂ supercrítico.

Entre los métodos que desgrasan previamente las pepitas trituradas existe un método que emplea para la extracción una solución compuesta por acetato de etilo y agua en diferente proporción (107) y otro en el que se emplean sucesivamente dos disoluciones compuestas por acetona: agua: ácido acético y metanol: agua: ácido acético (108), pero ambos emplean una elevada temperatura (> 60°C).

III.3 Determinaciones espectrofotométricas en el análisis del color y de los compuestos fenólicos

El color es la primera cualidad que se percibe de un vino y en cierta manera prejuzga y condiciona su análisis sensorial global. Por ello, es de gran ayuda para las bodegas definir, de manera objetiva, dicho color y valorarlo según sus componentes.

A continuación se abordan las metodologías comúnmente empleadas para esta evaluación basada en determinaciones parametrizadas, y que también son aplicables en el análisis de los extractos de uva obtenidos en los controles de maduración.

III.3.1 Parámetros cromáticos

Los métodos de medida del color se basan en la medida de la absorbancia que presentan los vinos (y extractos) en el espectro visible, la cual expresa el porcentaje de luz que ha sido transmitida por una muestra cuando sobre ella incide una radiación a una determinada longitud de onda.

III.3.1.1 Intensidad colorante

La intensidad colorante (IC) se define como la cantidad de color y depende de la concentración de las sustancias colorantes presente en la muestra que se está analizando (119).

Ciertas longitudes de onda son particularmente indicativas del color de los vinos tintos. Así, a 420 nm se mide la cantidad de amarillo, a 520 nm la cantidad de rojo y a 620 nm la cantidad de azul.

El valor de la intensidad colorante (IC) de la muestra se determina espectrofotométricamente mediante la suma de las absorbancias a estas longitudes de onda utilizando cubetas de 1 mm de paso óptico, aunque el resultado se corrige para ser referido a cubetas de 10 mm, y se expresa en unidades de absorbancia (u.a.).

$$IC \text{ (u.a.)} = (A_{420} + A_{520} + A_{620}) \quad \text{Ec.III.6}$$

No se realiza la medida en cubetas de 10 mm para no salir de la escala cuando se analizan vinos tintos. De esta manera se obtienen absorbancias medibles, del orden de 0.1-0.8. El hecho de medir en este tipo de cubeta, con un camino óptico 10 veces menor que una cubeta evita tener que diluir el vino para poder hacer la lectura dentro de un rango de absorbancias adecuado, lo cual afectaría al pH de la muestra y con él al equilibrio de los antocianos y al color.

Los vinos tintos jóvenes poseen un color rojo intenso con tonos violáceos, presentando a 520 nm (rojo-púrpura) un valor máximo de absorbancia, característico de los antocianos coloreados rojos, ya sean libres o combinados con los taninos, en las condiciones naturales del vino. Además, a

620 nm, donde se registra el color azul, el valor de la absorbancia es también relativamente importante. En cambio, cuando el vino envejece durante la crianza, el color evoluciona hacia colores teja o anaranjados, reduciéndose el valor de absorción a 520 nm y 620 nm, al mismo tiempo que aumenta la absorbancia a 420 nm, donde se mide el color amarillo.

En la Figura III.2 se muestra la diferencia entre los espectros de un vino tinto joven, un vino envejecido de 10 años y un vino totalmente oxidado de 60 años.

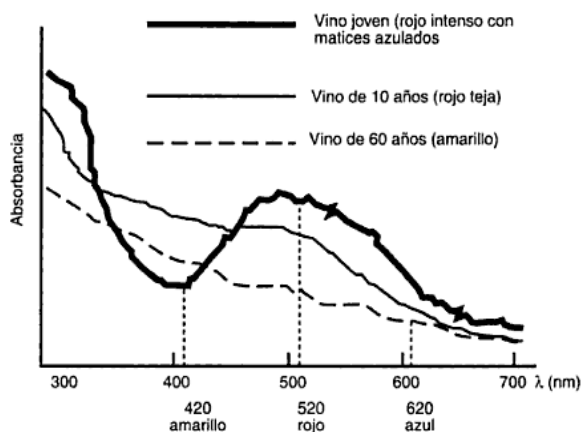


Figura III.2. Espectro de absorción visible de los vinos tintos (120)

Hay que tener en cuenta también que las maceraciones largas producen una disminución de la IC de los vinos por la pérdida de antocianos monoméricos, ya que éstos polimerizan con otras moléculas, como los taninos (121).

Los enólogos consideran que un valor normal de IC es 1/5 del IPT antes de la fermentación maloláctica y 1/8 tras ella (122).

Las normas que regulan la producción y características de ciertos vinos dictaminan los valores de este parámetro en función del tiempo de crianza (123, 124), lo que proporciona una idea de la información que puede aportar la medida del mismo.

III.3.1.2 Tonalidad

La tonalidad, también llamada matiz, indica la importancia relativa del amarillo sobre el rojo y ésta crece a medida que envejece un vino, por lo tanto es un indicador de su edad (125). Se calcula mediante el cociente entre las absorbancias a 420 nm (componente amarilla) y 520 nm (componente roja) (119). La tonalidad es adimensional:

$$\text{Tonalidad} = A_{420} / A_{520} \quad \text{Ec.III.7}$$

La tonalidad de los vinos tintos jóvenes presenta los valores más bajos (126), entorno a 0.5-0.6, ya que predominan los tonos rojos y violáceos. Valores de tonalidad superiores a 0.8 ya indican suficiente envejecimiento. Los vinos que presentan valores de tonalidad entre 1-1.5 corresponden a vinos muy envejecidos, donde predominan los tonos anaranjados (127).

III.3.1.3 Componentes del color

Las componentes amarilla, roja y azul del color se determinan como el cociente de cada una de ellas respecto a la intensidad de color (IC) expresadas en tanto por ciento (119). Estos parámetros proporcionan una idea de la importancia relativa de cada uno de los colores que representan en el global de la muestra.

$$\text{Componente amarilla (A420\%)} = (A_{420}/IC) \cdot 100 \quad \text{Ec.III.8}$$

$$\text{Componente roja (A520\%)} = (A_{520}/IC) \cdot 100 \quad \text{Ec.III.9}$$

$$\text{Componente azul (A620\%)} = (A_{620}/IC) \cdot 100 \quad \text{Ec.III.10}$$

III.3.2 Análisis de los compuestos fenólicos

El color del vino depende directamente de su composición fenólica, por lo que resulta muy adecuada su evaluación a lo largo del proceso de producción. Aunque actualmente existen técnicas que permiten identificar y cuantificar individualmente los componentes fenólicos de un vino, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), estas técnicas no son

prácticas en bodega y quedan reservadas únicamente para la investigación por su complejidad, coste y elevado tiempo de análisis.

Sin embargo, también es posible realizar analíticas sencillas utilizando un espectrofotómetro para determinar los compuestos fenólicos más importantes. A continuación se describen las metodologías que habitualmente emplean las bodegas.

III.3.2.1 Compuestos fenólicos totales

Existen diferentes métodos para determinar los compuestos fenólicos totales presentes en una muestra de extracto de uva o vino, si bien la mayoría de los enólogos suelen referirse al índice de Folin-Ciocalteu (IFC) (1) o al índice de polifenoles totales (IPT)(112).

- Índice de Folin-Ciocalteu

El fundamento del método de Folin-Ciocalteu se basa en la oxidación de los grupos hidroxilo de los compuestos fenólicos en medio básico a través del reactivo de Folin-Ciocalteu, compuesto por una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$), que se reduce produciendo una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}) (128, 129).

Para determinar el Índice de Folin-Ciocalteu el procedimiento difiere ligeramante dependiendo del tipo de vino que se va a analizar: 1 ml de vino blanco se diluye con 50 ml de agua destilada, se añaden 5 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu, 20 ml de una solución de Na_2CO_3 al 20% (p/v) y se enrasa con agua destilada hasta 100 ml.

En el caso del vino tinto, el procedimiento es el mismo, pero se diluye previamente la muestra (1:5 ó 1:10) con agua destilada y se emplea 1 ml de esta dilución. Después de 30 minutos, se mide la absorbancia a 760 nm con una cubeta de 10 mm, ya que la coloración azul obtenida por formación de los óxidos de tungsteno y molibdeno posee una absorción máxima a esta longitud de onda y es proporcional al contenido fenólico total.

El IFC se calcula multiplicando la absorbancia obtenida por el factor de dilución, considerando la dilución previa de la muestra (1:5 o 1:10) y la dilución final en el matraz (130):

$$\text{IFC (u.a.)} = A_{760} \cdot 100 \cdot \text{FD} \quad \text{Ec.III.11}$$

El IFC se expresa en unidades de absorbancia (u.a.) y su valor está comprendido entre 10 y 100, aunque los valores más habituales para vinos blancos son entre 3 y 5, para rosados entre 5 y 10 y entre 20 y 50 para tintos (131).

Sin embargo, se acostumbra a dar el resultado en mg ácido gálico/L mediante el método de patrón externo, interpolando en una recta de calibrado construida a partir de las absorbancias proporcionadas por soluciones de patrón de diferente concentración.

El método de Folin-Ciocalteu fue adoptado por la *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* (OIV), el organismo internacional que certifica determinados procedimientos para el análisis de vinos, como el procedimiento estándar para el análisis de los compuestos fenólicos totales en el vino, y además es el método oficial de la Unión Europea (132). Sin embargo, hay que tener en cuenta que en la muestra puede haber sustancias interferentes (133,134). En el vino, los principales interferentes son el SO₂ y el ácido ascórbico (129), aunque también el ion ferroso (Fe²⁺), cisteína y aminoácidos de proteínas (135). En vinos dulces, mostos y extractos de uva, además hay que tener en cuenta los azúcares reductores (glucosa y fructosa) (136), ya que éstos también se oxidan. En estos casos, es más recomendable determinar el contenido fenólico total a través del IPT.

- Índice de Polifenoles Totales

El fundamento del método del Índice de Polifenoles Totales (IPT) se basa en que los anillos bencénicos característicos de los compuestos fenólicos de vinos, mostos y extractos de uva absorben fuertemente la luz ultravioleta, con un máximo a 280 nm. Las proteínas y aminoácidos también absorben, pero

dado que están presentes en muy bajas concentraciones, el error de la medida que se pueda cometer es muy pequeño (137).

El IPT se determina a partir de la dilución 1:50 ó 1:100 de una muestra de vino o extracto de uva con agua destilada (1,112). En el caso de mostos y vinos blancos la dilución con agua será 1:10. Sobre la muestra diluida se realiza la lectura de la absorbancia a 280 nm con una cubeta de cuarzo de 10 mm. El IPT se calcula multiplicando la absorbancia obtenida por el factor de dilución, y se expresa en unidades de absorbancia (u.a.).

$$\text{IPT (u.a.)} = A_{280} \cdot \text{FD} \quad \text{Ec.III.12}$$

En un vino blanco o rosado, el valor del IPT oscila entre 5 y 20, en un clarete entre 25 y 30, en un tinto joven entre 30 y 50, y en un vino tinto con cuerpo, por encima de 50 (137). Hay que decir también que, las vendimias ricas en compuestos fenólicos pueden ser aptas para elaborar vinos tintos de guarda cuando el IPT alcanza valores entre 60 y 70 (120). También en este caso, las normas que regulan la producción y características de ciertos vinos definen los valores mínimos de IPT que debe tener un vino antes del embotellado para merecer su calificación (138, 139), lo proporciona una idea de la información que puede aportar la medida de este parámetro.

El contenido de polifenoles totales se puede expresar como g/L de tanino refiriéndolo al tanino extraído de la uva (27):

$$\text{Taninos (g/L)} = \text{IPT} \cdot 0.08 \quad \text{Ec.III.13}$$

Sin embargo, también en este caso se acostumbra a dar el resultado de contenido de polifenoles totales en mg ácido gálico/L mediante el método de patrón externo, interpolando en una recta de calibrado preparada en cada laboratorio.

Por el abundante número de reseñas bibliográficas, ambos métodos son perfectamente válidos para el análisis de los compuestos fenólicos totales en vinos, en mostos o extractos de uva, proporcionando resultados equivalentes (140). Sin embargo, se suele optar por el IPT porque es más directo y no

requiere reactivos, siempre y cuando se disponga de un espectrofotómetro UV-visible.

Por su parte, una ventaja importante del procedimiento de Folin-Ciocalteu es que tiene una respuesta bastante similar para diferentes sustancias fenólicas, siendo adecuado para medir los niveles del contenido total de sustancias fenólicas (141), circunstancia que no se da en el método de IPT ya que cada sustancia fenólica tiene una absorptividad molar diferente a 280 nm y sus picos de absorción máxima se producen a una longitud de onda diferente (142). Por lo tanto, no se pueden establecer comparaciones entre resultados obtenidos mediante la utilización de diferentes patrones químicos, pero sí entre los resultados expresados en unidades de absorbancia (u.a.)(143).

III.3.2.2 Antocianos totales

Como se ha comentado anteriormente, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) permite un estudio pormenorizado de la fracción colorante de una muestra, separando gran variedad de pigmentos y cuantificar cada uno de ellos. De hecho, existe un método oficial de análisis de los antocianos de la OIV que permite separar e identificar 9 antocianos en vino tinto y rosado sin tratamiento previo de la muestra (144) aunque se han descrito muchos más para el análisis de vino y uvas (145-153).

Sin embargo, la HPLC presenta ciertos inconvenientes que hacen que la aplicación de esta técnica esté muy restringida en bodega, como son el elevado precio del equipo y de los patrones antociánicos, la preparación de la muestra en muchos casos y los elevados tiempos de análisis.

Como alternativa a los métodos cromatográficos, las bodegas emplean métodos espectrofotométricos para elucidar la composición antociánica de una muestra de manera sencilla, ya sea directa o indirectamente, mediante el cálculo de índices.

El parámetro más empleado por enólogos para conocer la cantidad de pigmentos presentes en una muestra de vino o extracto de uva es el de antocianos totales, que engloba los antocianos libres y los antocianos unidos a

taninos. No existe un método exacto para medir los antocianos totales, por lo que este valor sólo se puede estimar.

Los métodos químicos de análisis de los antocianos se basan en las propiedades específicas de estas moléculas para cambiar de color cuando se les añade una solución ácida que desplaza el equilibrio entre las diferentes formas antociánicas hacia la forma flavilio (A⁺) de color rojo, o por decoloración con bisulfito, como ya se ha explicado en el Capítulo II (apartado II.2.3).

- Métodos de análisis de antocianos totales por variación de pH

El primer método de análisis de los antocianos totales por variación de pH fue desarrollado por Puissant y Léon (114). En él, la concentración de estos compuestos se determina a partir de la absorbancia a 520 nm tras la adición de una solución ácida al vino o extracto de uva para desplazar el pH de la muestra a pH 1.

El procedimiento del método de Puissant y Léon consiste en diluir la muestra de vino o extracto de uva 1:20 con HCl 1% p/v (0.1M) y medir la absorbancia a 520 nm (A_{520}) en una cubeta de 10 mm. La concentración de antocianos totales se determina interpolando esta absorbancia en una curva patrón preparada con malvidina-3-glucósido de concentración conocida o bien aplicando la ecuación de Puissant-Léon:

$$\text{Antocianos totales (mg/L)} = A_{520} \cdot 22.76^* \cdot \text{FD} \quad \text{Ec.III.14}$$

* El valor 22.76 es la inversa de la pendiente de la recta obtenida por los autores empleando soluciones patrón de malvidina-3-glucósido a diferente concentración para expresar el resultado en mg/L de muestra.

El segundo método de medida de los antocianos totales basados en la variación del pH es el de Ribéreau-Gayon y Stonestreet (1, 110). En él la concentración de estos compuestos se determina por la diferencia entre la absorbancia a 520 nm de la muestra cuando se encuentra a su pH natural y la absorbancia de la muestra, medida también a 520 nm, cuando su pH desciende por debajo de 1. En este caso es necesaria la preparación de dos tubos de ensayos a los que se adiciona 1 ml de muestra (ya sea de vino o de

extracto de uva) y 1 ml de una solución de etanol 96% acidificado con HCl 0.1% (50:50). A la primera muestra se le añaden 10 ml de HCl 2% (pH = 0.7) y a la segunda 10 ml de solución tampón a pH 3.5. Se mide la absorbancia a 520 nm de ambas soluciones en una cubeta de 10 mm y se obtiene la concentración de antocianos totales mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianos totales (mg/L)} = \Delta A_{520} \cdot 388^* \cdot \text{FD} \quad \text{Ec.III.15}$$

* El valor 388 es la inversa de la pendiente de la recta de calibrado obtenida por los autores empleando soluciones patrón de malvidina-3-glucósido a diferente concentración para expresar el resultado en mg/L de muestra.

El tercer método de este grupo es el conocido como el de Paronetto (154). Éste también requiere la preparación de dos tubos de ensayo a los que se adicionan 1 ml de vino o extracto de uva. A uno de los tubos se le añaden 10 ml de HCl 0.1M y al otro 10 ml de solución tampón fosfato-citrato a pH 3.5. Se mide la absorbancia de ambas soluciones a 520 nm en una cubeta de 10 mm y la concentración de antocianos totales se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Antocianos totales (mg/L)} = \Delta A_{520} \cdot 375^* \cdot \text{FD} \quad \text{Ec.III.16}$$

* El valor 375 es la inversa de la pendiente de la recta de calibrado obtenida por los autores empleando soluciones patrón de malvidina-3-glucósido a diferente concentración para expresar el resultado en mg/L de muestra.

- Método de análisis de antocianos totales por decoloración con bisulfito

El método de Ribéreau-Gayon y Stonestreet (110) se basa en la diferencia de color entre una muestra control y otra a la que se añade bisulfito, de manera que la parte decolorada de la muestra es proporcional al contenido antocianico.

El procedimiento consiste en mezclar 1 ml de vino o extracto de uva con 1 ml de una solución compuesta por etanol 96% y HCl 0.1% (50:50). A la mezcla se le adicionan 20 ml de HCl 2 % y la solución resultante se divide en dos alícuotas de 10 ml, repartidas en dos tubos de ensayo. A uno de los tubos

se añaden 4 ml de agua destilada y al otro 4 ml de una solución saturada de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$. Después de 10 min, se mide la diferencia entre las absorbancias medidas a 520 nm en una cubeta de 10 mm de las soluciones de ambos tubos. La concentración de antocianos totales se obtiene mediante la siguiente ecuación:

$$\text{AT (mg/L)} = \Delta A_{520} \cdot 875^* \quad \text{Ec. III.17}$$

* El valor 875 es la inversa de la pendiente de la recta de calibrado obtenida por los autores empleando soluciones patrón de malvidina-3-glucósido a diferente concentración para expresar el resultado en mg/L de muestra.

III.3.2.3 Taninos

La cuantificación y caracterización de los taninos sigue siendo uno de los grandes retos analíticos de la química de los productos naturales. Este desafío deriva del hecho de que los taninos son moléculas anfipáticas, es decir, poseen extremos hidrofílicos e hidrofóbicos, lo que les convierte en moléculas muy reactivas. Además, presentan una amplia variedad de estructuras, con grupos funcionales muy similares a los de otros compuestos fenólicos presentes en la matriz de la uva y el vino, como la catequina o ácidos fenólicos (47, 48), lo cual dificulta la selectividad de los métodos de análisis.

Aunque la HPLC es muy útil para solventar el problema, ya que permite separar y cuantificar este tipo de compuestos (60, 88, 101, 145, 146, 148), tal y como ya se ha dicho, ésta es una técnica que está fuera del alcance de la mayoría de los usuarios de la industria del vino. Por este motivo, en la presente Tesis Doctoral, nos centraremos en la alternativa que constituyen los métodos espectrofotométricos.

Actualmente, tal y como se comenta a continuación, existen diversos métodos para determinar la cantidad de taninos, ya sea determinando los taninos condensados procedentes de la uva por un lado y los taninos hidrolizables procedentes de la bodega de roble por otro lado, o bien de manera conjunta, como taninos totales.

Conviene aclarar que todos los métodos de cuantificación de los taninos totales se pueden emplear en la cuantificación de los taninos condensados de la uva, así como del vino que no ha sido sometido a crianza en barrica, pero sin embargo, no son selectivos para los taninos hidrolizables.

Entre los métodos de cuantificación de taninos condensados y totales, se pueden encontrar métodos de análisis indirectos que primero contabilizan el contenido polifenólico total mediante la oxidación de los compuestos fenólicos con reactivo de Folin-Ciocalteu o cloruro férrico (FeCl_3) (155) y, más tarde, añaden una sustancia que precipite los taninos, de manera que la diferencia de absorbancias a 760 nm se corresponde con la fracción tánica de la muestra. Las sustancias precipitantes utilizadas son tan variadas como el formaldehído (156), el polímero polietilenglicol (157), la polivinilpirrolidona (PVP) y su forma reticular insoluble, polivinilpolipirrolidona (PVPP) (158), que son polímeros con mucha afinidad por los taninos. Los inconvenientes que presentan estos métodos son la falta de especificidad, lo cual implica un segundo tratamiento que alarga el tiempo de análisis, así como la generación de una cantidad importante de residuos químicos.

Un procedimiento alternativo para el análisis de los taninos totales y condensados es el de Moya *et al.* (159), que se basa en la reducción de los iones Cu^{2+} por parte de los taninos. El exceso de iones Cu^{2+} se reduce a Cu^+ en presencia de BCA (4,4'-dicarboxi-2, 2'-biquinoline) dando un complejo BCA/ Cu^+ de color violeta que presenta un máximo de absorción a 558 nm. El valor de la absorbancia a esta longitud de onda es proporcional a la concentración de taninos totales presentes en la muestra. A pesar de que es un método relativamente rápido, tiene como interferencias el ácido tartárico, porque puede complejar al Cu^{2+} , así como el ácido ascórbico y el bisulfito, porque reducen el Cu^{2+} . Además, la BCA es un producto irritante, por lo que serán preferibles otros métodos que empleen reactivos más cómodos de manipular.

Otro gran grupo de métodos para la determinación de taninos lo constituyen aquellos basados en la precipitación con proteínas como la seroalbúmina bovina (BSA)(155, 160), la gelatina (119), la caseína (161) o la

ovalmúnina (162) y posterior medida colorimétrica. En general, estos métodos se basan en la capacidad que tienen las proteínas para combinarse mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas con los taninos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la magnitud de estas interacciones depende de las condiciones del medio (pH, fuerza iónica o temperatura) (163), así como el punto isoeléctrico y conformación de la proteína (164), lo que hace que intervengan muchas fuentes de variabilidad en la medida analítica. Además, presentan el inconveniente de que los taninos presentan su máximo de absorción a 280 nm, la misma longitud de onda a la que también absorben la mayoría de proteínas, por lo que han tenido que idearse metodologías para eliminar esta interferencia. Así por ejemplo, el precipitado proteína-tanino se disocia añadiendo medio alcalino y se añaden sustancias cromóforas, como la trietanolamina o el FeCl_3 , que reaccionan con los taninos desplazando el máximo de absorción a 510 nm, o con el azul brillante de Remazol, que lo desplaza a 590 nm (160, 165,-167).

En una variante de este método, se precipitan los taninos con dos proteínas combinadas: BSA y la enzima fosfatasa alcalina (168). Tras la precipitación del tanino con la BSA unida a la enzima, se disocia el precipitado con un tampón alcalino para resuspenderlo. Se mide la actividad de la fosfatasa alcalina con el sustrato enzimático nitrofenilfosfato y posterior medida de la absorbancia a 405 nm. La cantidad de la actividad del enzima será proporcional a la cantidad de taninos de la muestra.

Cambiando de registro y centrándonos ahora en los métodos propuestos para medir específicamente los taninos condensados de la uva y el vino, destaca el de Ribéreau-Gayon y Stonestreet (170). Éste se basa en la propiedad que tienen los taninos condensados, también llamados procianidinas, de hidrolizarse en antocianidinas en medio ácido caliente (HCl 12M, 100°C, 30 min.). Tras la hidrólisis, se añade una pequeña cantidad de etanol 95% para solubilizar el color rojo que aparece, y seguidamente se mide la absorbancia a 550 nm para cuantificar las antocianinas como reflejo de la cantidad de taninos condensados. Cabe decir que existe un método muy parecido que también se basa en la despolimerización de los taninos en medio ácido caliente, pero empleando butanol: HCl 12M (95:5) a 95°C durante 40 minutos.

Tras esto, se produce una coloración roja por generación de las unidades de antocianidinas, y seguidamente se mide la absorbancia a 550 nm como reflejo de la cantidad de taninos condensados (171).

No obstante, estos métodos presentan algunas deficiencias. En primer lugar, la transformación de los taninos condensados a antocianidinas no es completa y la generación de color de las antocianidinas depende tanto de la estructura como del grado de polimerización de los taninos (172). En segundo lugar, son frecuentes las reacciones secundarias durante la transformación, que conducen a la formación de polímeros de color teja que absorben alrededor de 450 nm. Este hecho produce una subestimación de la cantidad de taninos condensados, de manera que la aplicación de estos métodos para fines cuantitativos es limitada (172).

Otro método a tener en cuenta para la cuantificación de los taninos condensados es el de la vainillina (172). El fundamento lo encontramos en la reacción de la vainillina en metanol ácido con el sustituto meta del anillo flavanólico para formar un compuesto cromóforo, cuya absorbancia a 500 nm es proporcional a la concentración de taninos condensados. Además, permite cuantificar tanto monómeros como oligómeros y polímeros siempre que haya una separación previa mediante cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) C18 y elución con distintos disolventes orgánicos, aunque esto alargará el tiempo de análisis. Las interferencias que hay que considerar cuando se utiliza esta metodología son las que provocan el ácido ascórbico y, sobretudo, los antocianos. Estos compuestos en medio ácido absorben entre 490-540 nm por lo que debe hacerse un blanco en ausencia de vainillina (173).

Por último, hay que citar también el método de cuantificación de taninos condensados por precipitación con metil-celulosa (47, 48). En este caso la formación de puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre ambas sustancias, genera un complejo insoluble de tanino polimérico que termina por precipitar. La cantidad de taninos condensados se obtiene mediante la diferencia de la absorbancia a 280 nm de una muestra control y la precipitada con metil-celulosa, por lo que se considera un método de análisis indirecto.

Este método no precipita ni monómeros ni dímeros de flavanol, comenzando a contabilizar los taninos condensados a partir de 3 unidades de flavanol (47).

Respecto al análisis de los taninos hidrolizables, los cuales incluyen los galotaninos y elagitaninos procedentes de la madera de las barricas, éstos se pueden cuantificar específicamente por diversos métodos.

Entre ellos, el método de la rodanina (174) hidroliza los galotaninos en medio ácido caliente (H_2SO_4 2N, 100°C, 26h), de manera que el ácido gálico resultante se analiza con rodanina. Este compuesto reacciona con los grupos hidroxilo del ácido gálico para dar un complejo de color rojo, que tiene su máximo de absorción a 520 nm. La cuantificación de este tipo de taninos se realiza por el método de patrón externo empleando ácido gálico.

El color rojo formado sólo lo produce el ácido gálico, por lo que no se contabilizan los ésteres de ácido gálico, ácido elágico ni demás compuestos fenólicos, siendo un método muy específico para los galotaninos.

Sin embargo, presenta los inconvenientes del largo tiempo de análisis, el empleo de rodanina, que es una sustancia nociva y que no contabiliza la fracción de elagitaninos que compone los taninos hidrolizables. Se debe hacer un blanco sin hidrolizar para eliminar la fracción de ácido gálico libre y antocianos presentes en la muestra (por tener su máximo de absorción a la misma longitud de onda que el complejo coloreado), por lo que se duplican los análisis.

El método del nitrito sódico (175), por el contrario, cuantifica específicamente los elagitaninos. Para ello, hace una hidrólisis ácida en caliente de los elagitaninos (H_2SO_4 2N, 100°C, 10h), generando ácido elágico. Las moléculas de ácido elágico poseen dos átomos de carbono susceptibles de ser atacados por un electrófilo, como el NO^+ , formando un producto nitrosilado de color rojo que tiene su máximo de absorción a 538 nm.

El inconveniente de este método es su elevado tiempo de análisis, puesto que la máxima absorbancia se alcanza a los 36 minutos tras haber comenzado la reacción, unido al tiempo invertido en la hidrólisis.

Además, la reacción entre el ácido elágico y el nitrito está favorecida si hay piridina en el medio, que es una sustancia considerada carcinógena e introduce un riesgo de toxicidad elevado si este método se emplea rutinariamente en el análisis de muchas muestras. También en este caso se debe hacer un blanco sin hidrolizar para eliminar la fracción de ácido elágico libre y antocianos presentes en la muestra, duplicándose los análisis.

Un método que cuantifica simultáneamente los galotaninos y elagitaninos del vino es el del yodato potásico (176). La etapa previa es la metanolisis, que es la reacción de los taninos hidrolizables con metanol acidificado (H_2SO_4 18M, 85°C, 20h) para dar metil-galato. Así, los ésteres de ácido gálico reaccionan con KIO_3 en presencia de acetona o etanol a 30°C, produciendo un producto intermedio coloreado con un máximo de absorbancia a 525 nm, que se determina espectrofotométricamente. Se debe preparar un blanco para eliminar la fracción de antocianos presentes en la muestra, teniendo que realizar análisis por duplicado. Sin embargo, la reacción entre los metil-galato y el KIO_3 tarda 1 hora en producirse, lo que unido al tiempo de la metanolisis, alarga considerablemente el tiempo de análisis.

Los taninos hidrolizables sólo los encontraremos en los vinos de crianza, por lo que los anteriores métodos no son aplicables para medir los taninos condensados de la uva.

Dado que nuestro estudio se centró en el contenido de taninos condensados procedentes de la uva, se debía escoger un método de cuantificación apropiado.

Tras analizar las ventajas e inconvenientes de los diferentes métodos, se prefirió el de precipitación con metil-celulosa por ser una sustancia precipitante selectiva, no tóxica, que reacciona rápidamente con los taninos condensados, lo que la convierte en una metodología fácil de implementar en bodega.

III.4 Parte experimental

III.4.1 Presentación

El estudio bibliográfico efectuado permite establecer las bases sobre las que se desarrolla la parte experimental de la presente Tesis Doctoral.

Es evidente que la determinación del momento óptimo de la vendimia es un factor clave para la obtención de vinos tintos de calidad. Tradicionalmente la fecha de vendimia se ha decidido por el grado de madurez tecnológica de la uva, la cual se puede determinar de forma rápida y simple midiendo los azúcares del mosto por refractometría y su acidez total por valoración con una solución patrón alcalina.

Actualmente, en el caso de las variedades tintas, es necesario evaluar, también, su madurez fenólica. La madurez fenólica determina tanto la concentración como la extractabilidad de antocianos y taninos, que son los compuestos responsables del color y propiedades gustativas del vino que determinan su aptitud para la crianza. Ambos parámetros varían a lo largo de la maduración de la uva, por lo que es necesario someterlas a control.

Sin embargo, al no existir un método de análisis de la uva tinta oficial y universalmente aceptado para el seguimiento de la madurez fenólica, las bodegas y los centros de investigación enológica aplican métodos diferentes para llevar a cabo el control de la madurez fenólica, según su criterio particular.

Estos métodos requieren la obtención de extractos de las uvas. Para obtenerlos, emplean diferentes disolventes, trabajan en distintos rangos de pH y los tiempos de maceración tampoco son iguales, dando lugar a una eficacia de extracción variable en cada caso. Este hecho impide que las bodegas y los centros de investigación enológica que, como hemos dicho, aplican diferentes metodologías en los controles de maduración y que, en teoría, presentan la misma validez desde el punto de vista enológico, puedan contrastar sus resultados de manera directa.

Así pues, se decidió comenzar el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral comparando tres de los métodos más utilizados por el sector enológico, con el objetivo de establecer correspondencias entre los valores obtenidos con cada uno de ellos.

Los métodos seleccionados fueron los de Glories y Augustin (9,10), tradicionalmente empleado por los enólogos, el método adoptado por el Instituto Australiano de Investigación del Vino (AWRI) (44) y el método adoptado por el Instituto Técnico de la Viña y el Vino en Francia (ITV Estándar)(30). Todos analizan la uva entera triturada, debido a que, para poder tener una aplicación real en bodega, se requieren métodos sencillos y rápidos.

Para llevar a cabo la comparación entre el contenido fenólico de los extractos obtenidos con cada una de las tres metodologías, se determinaron espectrofotométricamente los antocianos totales y los compuestos fenólicos totales, y con los resultados obtenidos se construyeron modelos de regresión lineal estableciendo correlaciones dos a dos.

El procedimiento seguido para llevar a acabo este estudio, así como los resultados y discusión de los mismos, se recogen en el artículo *Comparison of three extraction methods used to evaluate phenolic ripening in red grapes*, publicado en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (2010) 4071-4076, cuyo original puede encontrarse en el Anexo 1 de la presente Tesis.

De estos tres métodos, había que escoger uno para emplearlo como método de rutina en los controles de maduración fenólica con el que poder establecer la fecha de vendimia óptima.

De entre ellos, el método ITV resultaba el más atractivo por ser rápido, directo, preciso y sencillo. Además, su capacidad de extracción de los compuestos fenólicos permitía observar claramente la evolución del contenido fenólico de la uva durante la maduración. Sin embargo, la poca información existente hasta el momento respecto a la influencia de las distintas variables sobre el rendimiento de la extracción así como la falta de parámetros analíticos

de calidad del método, hicieron que el siguiente objetivo fuera la optimización del mismo.

Así pues, se realizaron diferentes ensayos que evaluaran el efecto de las principales variables que influyen en el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos del triturado de uva y que son el tamaño de partícula, la temperatura, tiempo de maceración, y lavado del residuo de extracción. Todo este estudio, junto con los resultados obtenidos, dieron lugar al artículo *Estudio y optimización de un método analítico para la estimación de los parámetros de madurez fenólica de la uva tinta*, publicado en la revista *Enólogos*, 58 (2009) 38-43, cuyo original puede encontrarse en el Anexo 2 de la presente Tesis.

Por otra parte, en los ensayos que nos propusimos hacer para el control de la maduración fenólica se debían muestrear diversas variedades de uva tinta de la finca experimental “Mas dels Frares” con la que cuenta la Facultad de Enología de Tarragona con una frecuencia semanal a lo largo de toda la campaña estival. Esto suponía un volumen de trabajo considerable, por lo que se tendrían muchas muestras para analizar disponiendo de un tiempo limitado. Ante esta situación, surgía la necesidad de conservar las muestras unos días hasta su análisis, siendo necesario preservar las características de las muestras durante este tiempo.

Quedaba, pues, por comprobar si el uso de muestras frescas o conservadas en refrigeración o congelación influía sobre el recuento de los compuestos fenólicos, y por tanto, en la fiabilidad del resultado para establecer el estado de madurez fenólica de las uvas, puesto que en la bibliografía se encontraron resultados contradictorios. Por ello se realizó un estudio de conservación de uvas y extractos bajo refrigeración y también bajo congelación, a lo largo de 1 año. Este estudio debía servir para tomar una decisión sobre la conveniencia de aplicar métodos de conservación sobre las muestras o no.

Tras optimizar el método de extracción con el que determinar el contenido fenólico de la uva en los controles de maduración, era necesario conocer si además los extractos eran capaces de predecir la composición

fenólica y color de los vinos correspondientes, lo cual sería definitivo para emplearse como método de rutina en los controles de maduración fenólica con el que determinar la fecha de vendimia. Esto se conseguiría si los resultados aportados por los extractos de uva mostrasen una buena correlación con los correspondientes vinos.

Así pues, se decidió continuar el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral con la obtención simultánea de extractos a partir del método anteriormente optimizado y de vinos a partir de microvinificaciones estándar, empleando las mismas muestras de uva que para el control de maduración, y teniendo en cuenta que la cantidad de muestras debía ser suficientemente alta y representativa como para poder construir buenos modelos predictivos.

Todas las etapas del estudio realizado para construir y validar los modelos de predicción de las características del vino final se recogen en el artículo *Prediction of red wine colour and phenolic parameters from the analysis of its grape extract*, publicado en la revista *International Journal of Food Science and Technology*, cuyo original puede encontrarse en el Anexo 3 de la presente Tesis.

III.4.2 Materiales y métodos

En este apartado se detallan las muestras empleadas en cada uno de los tres estudios recogidos en el presente capítulo, dedicando especial atención al número de variedades y añadas utilizadas en cada uno de ellos. Además, se describen los métodos de extracción de los compuestos fenólicos empleados para determinar los distintos parámetros estudiados.

Selección de las bayas en la parcela

El conocimiento fiable del estado de madurez fenólica de la uva se consigue mediante la realización de un muestreo riguroso, que debe hacerse completamente al azar sobre un elevado número de puntos para asegurar una muestra representativa de la viña, y debe ser siempre idéntico: mismas cepas, adecuadamente identificadas, muestreadas a primera hora del día por el mismo analista.

El muestreo se realizó teniendo en cuenta la variabilidad de la posición de la uva en el racimo, del racimo en la cepa y de la cepa en el viñedo, considerando también su distinta exposición solar. Siguiendo esta premisa, se tomaron muestras de calles centrales, combinando sol y sombra y distintas partes del racimo (hombros, parte central y puntas), posicionado en distintas partes de la cepa (Figura III.3).



Figura III.3. Esquema del muestreo de uvas en controles de maduración, teniendo en cuenta la posición de la cepa en la viña, alternando cepas al sol y a la sombra (a), y la baya dentro del racimo: hombros (b), centro (c) y punta (d)

Los ensayos se prolongaron durante los años 2006, 2007, 2008 y 2009 y se emplearon hasta siete variedades de uva tinta (Pinot noir, Merlot, Tempranillo, Syrah, Garnacha, Cariñena y Cabernet sauvignon), todas ellas obtenidas de la finca experimental “Mas dels Frares” perteneciente a la Facultad de Enología de Tarragona, que está situada en Constantí (Tarragona).

A continuación, las muestras se transportaron inmediatamente al laboratorio para su análisis en bolsas de plástico dentro de pequeñas neveras

portátiles. En la Figura III.4 se muestra un esquema de la finca con las variedades estudiadas marcadas en rosa.

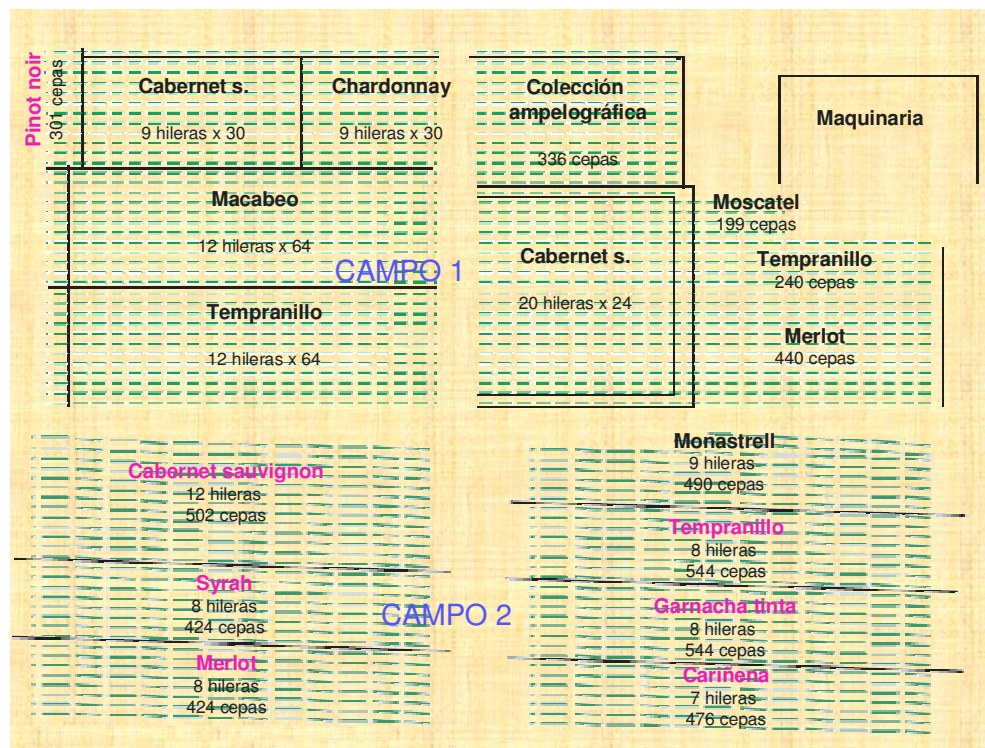


Figura III.4. Mapa de la finca experimental "Mas dels Frares". En rosa las variedades estudiadas en la presente Tesis

Muestras para la comparación de tres métodos de extracción

Las variedades empleadas en este estudio fueron seis: Merlot, Tempranillo, Syrah, Garnacha, Cariñena y Cabernet sauvignon, muestreando cada variedad con una frecuencia semanal desde el final del envero hasta la vendimia.

El estudio de la comparación de los tres métodos de extracción se extendió durante las campañas de 2006, 2007 y 2008.

En 2006 se aplicaron las metodologías Glories e ITV para obtener los extractos, en 2007 las de ITV y AWRI, y en 2008 se aplicaron los tres simultáneamente.

El muestreo de cada variedad, realizado siguiendo el muestreo detallado en el punto anterior, dió lugar a una muestra constituida por 200 uvas, las cuales se trituraron hasta obtener una pasta homogénea. Esta pasta se repartió en diferentes recipientes para ser macerada por duplicado en las condiciones que cada método establecía.

Muestras para la optimización de un método de extracción

Las variedades empleadas en este estudio fueron siete: Pinot noir, Merlot, Tempranillo, Syrah, Garnacha, Cariñena y Cabernet sauvignon, muestreando cada variedad con una frecuencia semanal desde el final del invierno hasta la vendimia. Este ensayo, que comenzó mucho más al principio que el resto, permitió disponer de una variedad adicional, Pinot noir, ya que es la primera variedad que se vendimia de la finca.

Cada muestra consistió en 200 uvas, tras recogerlas al azar siguiendo el muestreo detallado en el punto anterior, las cuales se trituraron hasta obtener una pasta homogénea. La pasta obtenida se repartió en diversos recipientes, donde fue macerada por duplicado empleando distintos tiempos y temperaturas.

Debido a la gran cantidad de ensayos realizados en este estudio para evaluar los distintos parámetros que influyen en la extracción, no se trabajó con todas las variedades en todos los ensayos.

Así, para el ensayo de trituración con diferentes equipos homogeneizadores se empleó uva de Pinot noir y Tempranillo, por ser variedades que presentan bayas de tamaño y contenido fenólico muy diferente.

Para el ensayo de tiempo de maceración se emplearon uvas de Pinot noir, Tempranillo, Merlot y Syrah.

Para el ensayo con diferentes temperaturas de maceración se empleó la variedad Tempranillo.

Para el ensayo de repetitividad de los métodos de Puissant y Léon, y Ribéreau-Gayon y Stonestreet de medida de antocianos, se emplearon las variedades de Pinot noir y Syrah.

Para la comparación de los resultados de antocianos totales proporcionados con ambas metodologías se emplearon los extractos obtenidos con las siete variedades.

Finalmente, para el ensayo de conservación de muestras se hizo un seguimiento de los extractos obtenidos con cinco variedades (Pinot noir, Tempranillo, Garnacha, Syrah y Cabernet sauvignon) conservados en refrigeración y de cuatro variedades (Tempranillo, Syrah, Garnacha y Cabernet sauvignon) conservados en congelación durante 1 año.

El estudio de optimización del método de extracción basado en el ITV se extendió durante los años 2006 y 2007. En el verano de 2006 se puso a punto el método de extracción de la uva, pero no finalizó hasta 2007, que fue cuando se completó el estudio paralelo de conservación de las muestras.

Muestras para la correlación extractos de uva-vinos

Las variedades empleadas en este estudio fueron cinco: Merlot, Tempranillo, Syrah, Cariñena y Cabernet sauvignon, muestreando cada variedad en tres momentos de maduración diferentes: tras el envero, sobre la mitad de la maduración y en el momento de la vendimia. En esta ocasión no se pudo disponer de la variedad Pinot noir por haberse vendimiado tempranamente para la elaboración del cava Blanc de noirs de la Facultad de Enología de Tarragona ni de la variedad Garnacha, porque las viñas fueron arrancadas ese año para su renovación. El estudio de correlación entre la composición fenólica de la uva y el vino tuvo lugar en el año 2009.

Cada muestra consistió en 300 uvas recogidas al azar siguiendo el muestreo detallado en el punto anterior, de las cuales 100 se destinaron a determinar los parámetros de madurez tecnológica en el mosto y las 200 restantes fueron utilizadas para determinar los parámetros de madurez fenólica en el extracto obtenido (por duplicado) a partir del método optimizado.

Además, se recogieron unos 15 Kg de uva de cada variedad para obtener las muestras de vino, en el mismo momento que las uvas empleadas en el control de la madurez fenólica. Estas muestras consistieron en algunos racimos cuidadosamente recogidos al azar. Se tomó un racimo de cada cepa, de cepas marcadas con anterioridad y expuestas al sol y a la sombra alternativamente. Todos los racimos fueron recogidos en una caja de 20 Kg de capacidad y transportados inmediatamente hasta el laboratorio para su vinificación (por triplicado).

Reactivos y patrones

Los patrones de malvidina-3-glucósido (pureza $\geq 90\%$) y (+)-catequina (pureza $\geq 96\%$) fueron suministrados por Fluka (Madrid, España). El ácido gálico monohidratado (99.5%) fue suministrado por Scharlab (Barcelona, España). La metil-celulosa (M-0387) fue suministrada por Sigma Aldrich (Madrid, España).

Las levaduras seleccionadas (AWRI 596) fueron facilitadas por Agrovin (Ciudad Real, España). Los activadores de fermentación (Actiferm 1 y 2) y el metabisulfito potásico (pureza $\geq 95\%$), fueron suministradas por Martin Vialatte Oenologie (Epernay, Francia).

El resto de los productos químicos utilizados para el estudio eran de calidad analítica y fueron suministrados por Scharlab (Barcelona, España).

Instrumentación

Las uvas se trataron con un homogeneizador de alta velocidad Ultra-Turrax T-18® (IKA, Wilmington, EE.UU.) equipado con un eje de rotación S18N-19G. En el estudio de optimización del método ITV, también se empleó una Batidora Taurus® Bapi600 de 10 velocidades para triturar las uvas. La centrifugación de las muestras se realizó con una centrífuga Hettich Universal 32R (Tuttlingen, Alemania). La absorbancia de los extractos y vinos se determinó mediante un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Spectronic UV-Vis modelo Helios γ (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK).

Condiciones de maceración

Cada conjunto de uvas se despalilló y homogeneizó (incluidas las pepitas) con el homogeneizador Ultra-Turrax® a 24000 r.p.m. a temperatura ambiente, durante aproximadamente 2 minutos, hasta obtener una fina pasta. Este homogeneizado se sometió a una maceración por duplicado de acuerdo con los siguientes procedimientos, y que se han descrito anteriormente en el apartado III.2.1.1:

- Método de Glories

Se maceraron cuatro replicados de 25 g de pasta durante 4 horas a temperatura ambiente, dos de ellos con 25 ml de la solución a pH 1.0 y los otros dos con 25 ml de la solución a pH 3.2, en vasos de precipitados de 250 ml, con agitación cada 15 minutos. Luego, las muestras se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 10 minutos. Cada sobrenadante obtenido se decantó en un matraz aforado de 50 ml y se enrasó con solución extractante para garantizar un volumen final constante y exacto.

- Método AWRI

En dos tubos de centrifuga de plástico se colocaron 2 g de pasta y se maceraron con 20 ml de etanol 50%.

Los tubos se agitaron en un agitador automático rotativo a 30 r.p.m. durante 1 hora a temperatura ambiente. Por último, los tubos se centrifugaron y los sobrenadantes se decantaron en matraces de 25 ml, los cuales se enrasaron con la misma solución extractante para garantizar un volumen final constante y exacto.

- Método ITV estándar

En dos vasos de precipitados de 250 ml se maceraron 50 g de pasta con 100 ml de una solución hidroalcohólica ácida (85 ml de HCl 0.1% + 15 ml de etanol 96%) durante 1 hora con agitación manual cada 15 minutos.

Transcurrido este tiempo, los macerados se centrifugaron y los sobrenadantes se decantaron en matraces de 200 ml, los cuales se enrasaron

con la misma solución extractante para garantizar un volumen final constante y exacto.

Como se puede observar, se introdujo una modificación en todos los métodos, que ha consistido en añadir solución extractante al extracto obtenido hasta obtener un volumen perfectamente conocido mediante el empleo de matraces aforados. Así, el volumen de muestra que se obtuvo con cada método de extracción se mantuvo constante.

Microvinificaciones

A continuación (Figura III.5) se resume gráficamente el protocolo de vinificación empleado en el estudio de correlación entre la composición fenólica de las uvas y sus correspondientes vinos.



Figura III.5. Esquema de los pasos seguidos en la vinificación estándar

Como ya se ha indicado, se vinificaron individualmente alrededor de 15 Kg de uva de cada variedad, en tres estadios de maduración diferentes (desde

el envero hasta la vendimia). Las uvas se despalillaron a mano y se estrujaron mediante una estrujadora manual de rodillos de acero inoxidable. A continuación, se introdujeron 4 Kg de uva estrujada en recipientes de plástico de 6L de capacidad (triplicados), a los que se añadieron 0.12 g de $K_2S_2O_5$ por kilogramo de uva estrujada.

La fermentación alcohólica fue llevada a cabo por las levaduras seleccionadas (AWRI 596), que fueron inoculadas (0.2 g/Kg uva) el mismo día del muestreo. Los activadores de fermentación se añadieron a las 24 horas después de la inoculación de levaduras (Actiferm 1), y posteriormente, cuando la densidad del mosto alcanzó valores entre 1040-1050 g/L (Actiferm 2).

La temperatura del mosto durante la fermentación se controló en todo momento, manteniendo los recipientes de plástico en una sala con control de temperatura, de manera que ésta no superase los 30°C. Para constatar que la fermentación se desarrollaba adecuadamente, diariamente se hacía una lectura de la densidad del mosto, a fin de comprobar que ésta descendía progresivamente a medida que las levaduras transformaban los azúcares en etanol.

Cuando la fermentación alcohólica terminó (entre el 5º y 7º día), la maceración se extendió hasta el 10º día. Durante todo este tiempo se realizó un bazuqueo diario para sumergir el sombrero. Finalmente, los vinos fueron obtenidos por sangrado y se añadió $K_2S_2O_5$ (0.02g/L) para estabilizarlos.

Determinaciones analíticas

En los estudios que se han desarrollado en este Capítulo III se han evaluado la composición fenólica y los parámetros cromáticos de los extractos de uva y vinos, así como los parámetros enológicos clásicos del mosto de uvas obtenido.

Composición fenólica

Los parámetros utilizados para seguir la madurez fenólica de la uva fueron los compuestos fenólicos totales y los antocianos totales. En el estudio

de correlación entre los parámetros fenólicos de la uva y el vino, además de los parámetros enológicos anteriores, se midieron los taninos condensados tanto en los extractos de uva como en los vinos obtenidos.

Cabe decir que las muestras debían estar perfectamente limpias y transparentes para proceder con su análisis espectrofotométrico. Esto se verificó previamente midiendo su absorbancia a 700 nm. Los extractos o vinos con A_{700} superior a 0.01 volvieron a centrifugarse, porque mostraban turbidez.

Análisis de los compuestos fenólicos totales

- Procedimiento

En los extractos de uva obtenidos mediante el método ITV y Glories, así como en los vinos obtenidos en los ensayos de microvinificación, el contenido de compuestos fenólicos totales se midió siguiendo el método del IPT (1, 112).

Dicho método se basa en diluir la muestra en agua destilada (1:50) y a continuación medir la absorbancia a 280 nm en una cubeta de cuarzo de 10 mm, tras realizar un blanco con agua destilada.

Para los extractos de uva obtenidos mediante el método AWRI, el contenido de los compuestos fenólicos totales se midió siguiendo el método de Iland *et al.* (44). Dicho método se basa en diluir la muestra en HCl 1M (1:25) y a continuación medir la absorbancia a 280 nm en una cubeta de cuarzo de 10 mm, tras realizar un blanco con HCl 1M.

- Calibración y fórmulas

La cuantificación de los compuestos fenólicos totales se realizó a través del método de patrón externo, mediante la interpolación de la medida de la absorbancia a 280 nm de la muestra de extracto o vino en una recta de calibrado construida con ácido gálico como patrón y utilizando una matriz adecuada en cada caso.

Para obtener la recta de calibrado con la que cuantificar los compuestos fenólicos totales en los extractos ITV, se preparó una solución madre de 8000 mg/L de ácido gálico empleando como disolvente una solución hidroalcohólica ácida, compuesta por un 85% de HCl 0.1% y un 15% de etanol 96%.

Por dilución de esta solución madre se prepararon una serie de disoluciones patrón de concentración entre 2 y 20 mg/L. De acuerdo con el procedimiento, tras dilución 1:50 con agua destilada de estas disoluciones, se midió la absorbancia a 280 nm y se ajustaron los resultados a una recta.

Esta misma recta fue la empleada para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales en los vinos obtenidos de los ensayos de microvinificación, puesto que el contenido etanólico del extracto ITV es el más semejante al del vino.

Para obtener las rectas de calibrado con la que cuantificar los compuestos fenólicos totales en los extractos de Glories, se prepararon dos soluciones madre de 8000 mg/L de ácido gálico, empleando en una de ellas una solución a pH 1.0 (HCl 0.1 M) como disolvente y en la otra una solución a pH 3.2 (5g/L ácido tartárico).

Por dilución de esta solución madre se prepararon una serie de disoluciones patrón de concentración entre 2 y 20 mg/L, para a su vez, tras diluirlas 1:50 con agua destilada, medir la absorbancia a 280 nm y ajustar los resultados a una recta.

Para construir la recta de calibrado con la que cuantificar los compuestos fenólicos totales en los extractos obtenidos por el método AWRI se preparó una solución madre de 4000 mg/L de ácido gálico empleando como disolvente etanol 50%.

Por dilución de ésta se obtuvieron soluciones patrón comprendidas entre 2 y 25 mg/L. Tras dilución 1:25 con HCl 1M se midió su absorbancia a 280 nm y se ajustaron los resultados a una recta.

La Tabla III.4 recoge los parámetros de calibración de las rectas de calibrado de los compuestos fenólicos totales construidas para cada medio de extracción.

Tabla III.4. Parámetros de calibración de las rectas de calibrado de los compuestos fenólicos totales construidas para cada disolución

Medio extracción	Soluciones patrón	Rango (mg/L)	Pendiente (± I.C.)	Intercepto (± I.C.)	R ²	LOL (%)
AWRI	6	2.9-23.6	0.0501 ± 0.0004	0.0070 ± 0.0054	1.000	99.72
ITV	6	2.2-18.0	0.0495 ± 0.0003	-0.0002 ± 0.0036	1.000	99.77
Glories (pH 1.0)	6	2.1-17.0	0.0501 ± 0.0004	0.0018 ± 0.0038	1.000	99.73
Glories (pH 3.2)	6	2.2-17.8	0.0459 ± 0.0006	0.0020 ± 0.0068	1.000	99.51

* **I.C.**, intervalo de confianza, considerando un nivel de significancia (α) = 0.05; **R²**, coeficiente de determinación; **LOL (%)**, linealidad del modelo de regresión. Se calcula como 100-RSD, siendo **RSD** la desviación estándar relativa de la pendiente de la recta.

Las fórmulas que se han empleado para la cuantificación de los compuestos fenólicos totales (CFT) en mg/Kg de uva, son:

$$\text{ITV: } CFT(\text{mg ácido gálico/Kguva}) = \left(\frac{A_{280} + 0.0002}{0.0495} \right) \cdot \frac{FD \cdot V_e}{M_t} \quad \text{Ec.III.18}$$

$$\text{Glories pH 1.0: } CFT(\text{mg ácido gálico/Kguva}) = \left(\frac{A_{280} - 0.0018}{0.0501} \right) \cdot \frac{FD \cdot V_e}{M_t} \quad \text{Ec.III.19}$$

$$\text{Glories pH 3.2: } CFT(\text{mg ácido gálico/Kguva}) = \left(\frac{A_{280} - 0.0020}{0.0459} \right) \cdot \frac{FD \cdot V_e}{M_t} \quad \text{Ec.III.20}$$

$$\text{AWRI: } CFT(\text{mg ácido gálico/Kguva}) = \left(\frac{A_{280} - 0.0070}{0.0501} \right) \cdot \frac{FD \cdot V_e}{M_t} \quad \text{Ec.III.21}$$

donde FD es el factor de dilución empleado en la medida de la absorbancia (50 en el caso de ITV y Glories, 25 en el de AWRI), V_e el volumen de extracto obtenido, expresado en mililitros (nosotros empleamos 200 en el caso de ITV, 50 en el de Glories y 25 en el de AWRI) y M_t es la masa de

triturado empleada en la maceración, expresada en gramos (nosotros empleamos 50 en el caso de ITV, 25 en el de Glories y 2 en el de AWRI).

Para la cuantificación de los CFT en los vinos, sólo se consideró el factor de dilución (FD) empleado en la medida de la absorbancia, de manera que el resultado se expresó en mg/L de ácido gálico.

Análisis de los antocianos totales

- Procedimiento

Los métodos empleados para la medida de los antocianos totales se basan en la propiedad que tienen los antocianos de desplazar su equilibrio hacia la forma flavilio e intensificar su color cuando se añade una solución ácida con la que alcanzar un pH por debajo de 1.0.

Para los extractos de uva obtenidos mediante el método ITV y Glories, el contenido de antocianos totales se midió siguiendo el método de Puissant y Léon (114,126), descrito anteriormente en el apartado III.3.2.2. Los antocianos totales en los vinos obtenidos en el ensayo de microvinificación, también se analizaron a partir de esta metodología. Dicho método se basa en diluir la muestra en HCl 0.1M (1:25) y a continuación medir la absorbancia a 520 nm en una cubeta de 10 mm, tras realizar un blanco con HCl 0.1M.

Para los extractos de uva obtenidos mediante el método AWRI, el contenido de los antocianos totales se midió siguiendo el método de Iland *et al.* (44). Dicho método se basa en diluir la muestra en HCl 1M (1:25) y a continuación medir la absorbancia a 520 nm en una cubeta de 10 mm, tras realizar un blanco con HCl 1M.

- Calibración y fórmulas

La cuantificación de los antocianos totales se realizó a través del método de patrón externo, mediante interpolación de la medida de la absorbancia a 520 nm de la muestra de extracto o vino en una recta de calibrado construida para cada matriz.

Para obtener la recta de calibrado con la que cuantificar los antocianos totales en los extractos ITV, se preparó una solución madre de 2000 mg/L de malvidina-3-glucósido empleando como disolvente una solución hidroalcohólica ácida, compuesta por un 85% de HCl 0.1% y un 15% de etanol 96%. Por dilución de esta solución madre se obtuvieron soluciones patrón entre 2 y 20 mg/L. Tras dilución 1:25 con HCl 0.1M de cada una de ellas, se midió la absorbancia a 520 nm y se ajustaron los resultados a una recta.

Esta misma recta fue la empleada para la cuantificación de los antocianos totales en los vinos obtenidos de los ensayos de microvinificación, puesto que el contenido etanólico del extracto ITV es el más semejante al del vino.

Para obtener la recta de calibrado con la que cuantificar los antocianos totales en los extractos de Glories, se preparó esta vez una única solución madre de 2000 mg/L de malvidina-3-glucósido, empleando una solución a pH 1.0 (HCl 0.1M). A partir de esta solución madre se obtuvieron soluciones patrón entre 2 y 20 mg/L. Tras dilución 1:25 con HCl 0.1M, de cada una de ellas, se midió su absorbancia a 520 nm y se ajustaron los resultados a una recta.

En este caso no se preparó la solución de Glories a pH 3.2 puesto que posteriormente se realiza dilución 1:25 con HCl 0.1M, obteniéndose en la medida espectrofotométrica un pH muy similar al de la solución preparada a pH 1.0, independientemente del pH del disolvente empleado en la disolución del patrón de malvidina-3-glucósido. Así se evitó consumir innecesariamente patrón de malvidina-3-glucósido (se comercializa en cantidades de 1mg).

Para construir la recta de calibrado con la que cuantificar los antocianos totales en los extractos obtenidos por el método AWRI se preparó una solución madre de 2000 mg/L de malvidina-3-glucósido empleando como disolvente etanol 50%, a partir de la cual se obtuvieron soluciones patrón comprendidas entre 2 y 25 mg/L. Tras dilución 1:25 con HCl 1M, se midió la absorbancia a 520 nm y se ajustaron los resultados a una recta.

La Tabla III.5 recoge los parámetros de calibración de las rectas de calibrado de los antocianos totales construidas para cada medio de extracción.

Tabla III.5. Parámetros de calibración de las rectas de calibrado de los antocianos totales construidas para cada disolución

Medio extracción	Soluciones patrón	Rango (mg/L)	Pendiente ± (I.C.)	Intercepto ± (I.C.)	R ²	LOL (%)
AWRI	6	2.4-20.0	0.0641 ± 0.0005	0.0392 ± 0.0063	1.000	99.70
ITV	6	2.4-20.0	0.0635 ± 0.0007	0.0430 ± 0.0086	1.000	99.58
Glories	6	2.4-20.0	0.0617 ± 0.0003	0.0061 ± 0.0035	1.000	99.82

* **I.C.**, intervalo de confianza, considerando un nivel de significancia (α) = 0.05; **R²**, coeficiente de determinación; **LOL (%)**, linealidad del modelo de regresión. Se calcula como 100-RSD, siendo **RSD** la desviación estándar relativa de la pendiente de la recta.

Las fórmulas que se han empleado para la cuantificación de los antocianos totales (AT) en mg/Kg de uva, son:

$$\text{ITV:} \quad AT(\text{mg M3G/Kguva}) = \left(\frac{A_{520} - 0.0430}{0.0635} \right) \cdot \frac{FD \cdot V_e}{M_t} \quad \text{Ec.III.22}$$

$$\text{Glories pH 1.0 y pH 3.2:} \quad AT(\text{mg M3G/Kguva}) = \left(\frac{A_{520} - 0.0061}{0.0617} \right) \cdot \frac{FD \cdot V_e}{M_t} \quad \text{Ec.III.23}$$

$$\text{AWRI:} \quad AT(\text{mg M3G/Kguva}) = \left(\frac{A_{520} - 0.0392}{0.0641} \right) \cdot \frac{FD \cdot V_e}{M_t} \quad \text{Ec.III.24}$$

donde, FD es el factor de dilución empleado en la medida de la absorbancia (nosotros empleamos 25 en todos los casos), V_e el volumen de extracto obtenido, expresado en mililitros (nosotros empleamos 200 en el caso de ITV, 50 en el de Glories y 25 en el de AWRI) y M_t es la masa de triturado empleada en la maceración, expresada en gramos (nosotros empleamos 50 en el caso de ITV, 25 en el de Glories y 2 en el de AWRI).

Para la cuantificación de los AT en los vinos, sólo se consideró el factor de dilución (FD) empleado en la medida de la absorbancia, de manera que el resultado se expresó en mg/L de malvidina-3-glucósido.

Análisis de los taninos condensados

La medida de los taninos condensados en este Capítulo III se empleó únicamente en el estudio de correlación entre la composición fenólica de la uva y el vino, por lo que sólo se determinaron en los extractos ITV y en los vinos obtenidos por microvinificación.

- Procedimiento

La medida de estos compuestos fenólicos se llevó a cabo a través de la diferencia entre las absorbancias a 280 nm de un blanco de extracto o vino y la misma muestra a la que se han precipitado los taninos con metil-celulosa (47, 48). Ambas soluciones se preparan en tubos de ensayo de 10 ml, a los que se añaden los reactivos mostrados en la Tabla III.6:

Tabla III.6. Reactivos empleados en el método de cuantificación de taninos condensados por el método de precipitación con metil-celulosa

	Blanco	Muestra a precipitar
Muestra	1 ml	1ml
Metil-celulosa 0.04% p/v	-	3 ml
Solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2 ml	2 ml
H ₂ O destilada	7 ml	4 ml

Ambas soluciones se dejan reposar 10 minutos y después se centrifuga la solución que contiene la metil-celulosa (8000 r.p.m.; 5 min) para aislar el precipitado. Tras esto, el sobrenadante de la muestra y el control se traspasan a una cubeta de cuarzo de 10 mm para realizar la medida, tras llevar a cabo un blanco instrumental con agua destilada.

- Calibración y fórmulas

La cuantificación de los taninos condensados se realizó mediante el método de patrón externo, por interpolación de la diferencia de las medidas de la absorbancia a 280 nm antes y después de la precipitación con metilcelulosa de los extractos o vinos en una recta de calibrado construida con soluciones patrón de (+)-catequina y empleando el disolvente que emplea el método ITV.

Para obtener la recta de calibrado con la que cuantificar los taninos condensados en los extractos ITV y en los vinos, se preparó una solución madre de 2500 mg/L de (+)-catequina empleando como disolvente una solución hidroalcohólica ácida, compuesta por un 85% de HCl 0.1% y un 15% de etanol 96%, a partir de la cual se obtienen disoluciones comprendidas entre 15 y 80 mg/L. Tras aplicar la dilución que aplica el método de análisis anteriormente descrito, se miden las absorbancias de las soluciones patrón ajustando los resultados obtenidos a una recta.

Esta misma recta fue empleada para la cuantificación de los taninos condensados en los vinos obtenidos de los ensayos de microvinificación, puesto que el contenido etanólico del extracto ITV es muy semejante al del vino.

La Tabla III.7 recoge los parámetros de calibración de la recta de calibrado de los taninos condensados construida para el medio de extracción que emplea el método ITV:

Tabla III.7. Parámetros de calibración de la recta de calibrado de los taninos condensados construida para la disolución ITV

Medio extracción	Soluciones estándar	Rango (mg/L)	Pendiente ± (I.C.)	Intercepto ± (I.C.)	R ²	LOL (%)
ITV	6	19.2-76.9	0.0136 ± 0.0001	0.0041 ± 0.0061	1.000	99.61

* **I.C.**, intervalo de confianza, considerando un nivel de significancia (α) = 0.05; **R²**, coeficiente de determinación; **LOL (%)**, linealidad del modelo de regresión. Se calcula como 100-RSD, siendo **RSD** la desviación estándar relativa de la pendiente de la recta.

El contenido de taninos condensados (TC) se expresa en mg de (+)-catequina por kilogramo de uva según la Ec. III.25:

$$\text{ITV:} \quad TC \text{ (mg catequina / Kg uva)} = \left(\frac{\Delta A_{280} - 0.0041}{0.0136} \right) \cdot \frac{FD \cdot V_e}{M_t} \quad \text{Ec.III.25}$$

donde, FD es el factor de dilución empleado en la medida de la absorbancia (10), V_e el volumen de extracto obtenido, expresado en mililitros (nosotros empleamos 200 en el caso de ITV) y M_t es la masa de triturado empleada en la maceración, expresada en gramos (nosotros empleamos 50 en el caso de ITV).

Para la cuantificación de los TC en los vinos, sólo se consideró el factor de dilución (FD) empleado en la medida de la absorbancia, de manera que el resultado se expresó en mg/L de (+)-catequina.

Parámetros colorimétricos

Los parámetros de color que se midieron en los extractos de uva y vinos fueron la intensidad colorante (IC), tonalidad (T_o), componente amarilla (%), componente roja (%) y componente azul (%), que se detallaron en el apartado III.3.1.

Parámetros enológicos clásicos

La evolución de los parámetros de madurez tecnológica de las uvas a lo largo de la maduración se evaluó mediante:

- peso (g) correspondiente a 100 bayas.
- sólidos solubles totales del mosto medidos por refractometría en °Brix.
- acidez total del mosto determinada por valoración con NaOH 0.1M (132).
- pH del mosto medido con un pH-metro (132).

El contenido total de sólidos solubles a través de la medida de los °Brix se relacionó directamente con el contenido de azúcar (g/L) del mosto y el grado alcohólico probable (% vol) del vino empleando las transformaciones de

Fournand *et al.* (66), facilitándose también los resultados de estos parámetros. Las ecuaciones de transformación fueron las siguientes (131):

$$\text{Azúcares (g/L)} = (^\circ\text{Brix} \cdot 11.4) - 35.6 \quad \text{Ec.III.26}$$

$$\text{Grado alcohólico probable (\% vol)} = (^\circ\text{Brix} \cdot 0.68) - 2.1 \quad \text{Ec.III.27}$$

Análisis estadístico

La calidad de las rectas de regresión construidas para correlacionar los resultados de los compuestos fenólicos totales y los antocianos totales obtenidos con los métodos de extracción AWRI, ITV y Glories, se evaluaron por el coeficiente de determinación (R^2) y la linealidad en línea (LOL) (177). Todos los parámetros estadísticos de las rectas de regresión lineal se han calculado con el software informático ULC 2.0 (178).

El coeficiente de determinación (R^2) es una herramienta para determinar la linealidad de la recta de regresión y el grado de ajuste de los puntos experimentales a la misma (relación entre los resultados obtenidos por los diferentes métodos comparados dos a dos).

El parámetro LOL indica el grado de dispersión de los datos alrededor de la línea de calibración, lo que ayuda a evaluar la linealidad del modelo. El LOL se calcula como $100 - \text{RSD}$, donde RSD es la desviación estándar relativa de la pendiente ($\text{SD pendiente} / \text{pendiente}$) $\cdot 100$. La RSD es la medida de la precisión de la calibración, estima el error medio sobre la línea de regresión.

Un modelo se considera lineal cuando el LOL toma valores superiores al 85% (179), por tanto, cuando la RSD no supere el 15%.

Para evaluar la calidad de las predicciones se empleó el parámetro de recuperación, definido como el cociente entre el valor predicho a partir de las ecuaciones de los modelos y el valor medido, expresado en porcentaje.

En este mismo sentido, se evaluó también el parámetro *bias* (sesgo), que se define como el promedio de las diferencias entre el valor predicho y el valor medido de todas las muestras empleadas en el modelo. La predicción será más

satisfactoria cuanto más se aproxime a 0 el valor de *bias*. Para saber si el valor de *bias* difiere estadísticamente de 0 se procede a hacer un *test t* para un nivel de significancia (α) de 0.05. Sin embargo, dado que el parámetro que proporciona una información más directa sobre los resultados obtenidos es el error de predicción, también se evaluó mediante la relación (*bias*/media valor calculado), expresado en porcentaje.

Respecto al estudio de correlación entre la composición de la uva y el vino medida en tres estadios de maduración diferentes, se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) y el test de mínima diferencia significativa (LSD) considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Estos análisis fueron llevados a cabo mediante Statgraphics Plus 5.1.

Las correlaciones entre los valores medios de color y de parámetros fenólicos de las uvas y los vinos se establecieron mediante regresión por mínimos cuadrados usando de nuevo el software ULC 2.0. La calidad de las líneas de regresión se evaluó también mediante el coeficiente de determinación (R^2) y linealidad en línea (LOL). El ajuste de los datos al modelo y la calidad de las predicciones fue evaluada esta vez por el error medio del modelo (RMSE), parámetro expresado en porcentaje (% RMSE) (Ec.III.28):

$$RMSE \% = \frac{100}{y_i} \left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \right) \quad \text{Ec.III.28}$$

donde, N es el número de muestras, y_i es el valor de referencia para la muestra i , \hat{y}_i es el valor predicho para la muestra i , y \bar{y}_i es la media de los valores de las muestras.

Con los parámetros fenólicos y cromáticos medidos espectrofotométricamente en los extractos de uva y vinos, se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para conocer si con estas variables se podía obtener una diferenciación entre variedades tintas considerando estados de maduración diferentes.

El PCA es una técnica estadística de síntesis de la información que transforma un conjunto de variables originales intercorrelacionadas en un conjunto más pequeño de variables no correlacionadas denominadas componentes principales (CP's) o factores, que contienen la información relevante que caracteriza las muestras (180, 181). El objetivo de la técnica es explicar la mayor cantidad de la varianza de las variables originales a través del menor número de componentes principales. Así, el primer componente principal se calcula de forma que recoja la máxima varianza posible de los datos, el segundo que explique la varianza no explicada por el primer componente principal, y así sucesivamente.

Los nuevos componentes principales son las combinaciones lineales de las variables originales, y los coeficientes de estas combinaciones lineales se denominan *loadings*. Estos *loadings* indican el peso que cada variable asigna a cada componente principal, mostrando valores de 0 a 1 en valor absoluto. Cuanto mayor sea el valor del *loading*, significa que esa variable es la que mejor explica la varianza contenida en el CP (182).

III.4.3 Resultados y discusión

III.4.3.1 Estudio comparativo de tres métodos de extracción de uva

En los siguientes apartados se detalla la metodología seguida para llevar a cabo la comparación de tres métodos de extracción de la uva empleados en el control de la maduración fenólica (Glories, ITV estándar y AWRI) con el objetivo de establecer correspondencias que permitan la transformación de sus resultados.

Precisión de los métodos de extracción comparados

El procedimiento de extracción de la uva empleado en los controles de maduración condiciona el rendimiento de extracción de los compuestos fenólicos, por lo que no se pueden comparar directamente los resultados obtenidos con diferentes metodologías porque pueden dar lugar a conclusiones erróneas. Por tanto, para establecer equivalencias entre los resultados obtenidos con diferentes métodos de extracción, es esencial la evaluación de la

precisión de los métodos ensayados, ya que es imprescindible que todas las metodologías tengan una incertidumbre equivalente. De lo contrario, si el error asociado a la medida de alguno de ellos fuera muy superior al de los demás, limitaría el grado de concordancia entre los métodos.

Con el fin de estimar la precisión de los tres métodos considerados en este estudio, se cosechó suficiente cantidad de uva (de una variedad y fecha concretas) para ser triturada y obtener un solo homogeneizado de uva. Este homogeneizado se dividió en 24 porciones. De este modo, se dispuso de 6 réplicas idénticas para ser maceradas en las condiciones específicas de cada uno de los tres métodos estudiados.

Después de obtener los diferentes extractos, se midieron las absorbancias a 280 y 520 nm para determinar las cantidades de compuestos fenólicos totales (CFT) y antocianos totales (AT), respectivamente, mediante el método de patrón externo. La Tabla III.8 muestra la media y la desviación estándar relativa de los CFT y los AT cuantificados en las réplicas de triturados macerados según los métodos de extracción.

Tabla III.8. Estimación de la precisión de los métodos de extracción

Método	Replicados	Parámetro	Media	R.S.D. %
AWRI	6	CFT ^a	1471	3.9
		AT ^b	679	4.6
ITV	6	CFT	1107	2.2
		AT	642	0.7
Glories pH 1.0	6	CFT	887	1.4
		AT	653	1.6
Glories pH 3.2	6	CFT	570	1.4
		AT	318	1.6

^a **CFT** = Compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/Kg);

^b **AT** = Antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido/Kg)

R.S.D.= Desviación estándar relativa

Los resultados mostraron que aunque los valores promedio eran muy distintos según el método empleado debido a su distinta capacidad de

extracción, los valores de la desviación estándar relativa fueron comparables para todos los métodos evaluados e inferiores al 5% para los parámetros estudiados. Por lo tanto, teniendo en cuenta la alta precisión obtenida para los tres métodos de extracción, se pudo llevar a cabo la comparación entre los resultados obtenidos a lo largo de la maduración fenólica.

Estudio comparativo de los métodos estudiados

Después de medir la precisión de los métodos de extracción, se procedió a determinar los CFT y los AT en un número elevado de muestras diferentes, procedentes de 6 variedades de uva (Merlot, Tempranillo, Syrah, Garnacha, Cariñena y Cabernet sauvignon) recolectadas en diferentes estadios de maduración y a lo largo de tres campañas (2006, 2007 y 2008). Este muestreo tan exhaustivo garantizaba que los resultados obtenidos consideraran la variabilidad natural de la uva y que, por lo tanto, fueran representativos.

En la Tabla III.9 se muestran los rangos de concentración de los CFT y los AT obtenidos a partir del análisis de estas muestras. Tal y como se puede ver, los valores de concentración para ambos parámetros fueron los que normalmente se esperan encontrar en las uvas tintas, incluyendo tanto variedad de uva como estado de maduración. Como se puede observar, mientras que el método AWRI proporciona la extracción más eficaz de los CFT, el método ITV proporciona la extracción más eficaz de los AT.

Tabla III.9. Rangos de concentración de compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/Kg uva) y antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido/Kg uva) determinados mediante el uso de los métodos de extracción estudiados

Métodos	Número de muestras	Rango (mg/Kg)	
		Compuestos fenólicos totales	Antocianos totales
ITV	120	1042-2097	350-1310
AWRI	66	1323-2869	255-1307
Glories pH 1.0	58	719-1587	265-1227
Glories pH 3.2	58	500-1082	151-597

La diferente eficacia de extracción obtenida con cada metodología podría deberse a dos factores: la diferente capacidad de extracción del disolvente utilizado y los diferentes tiempos empleados en la maceración.

El aumento en el contenido de etanol implica una mayor disolución de la cutícula cerosa de las pepitas y facilita la extracción de los compuestos fenólicos de las pepitas (51), lo que explica que el método AWRI extraiga más CFT. Sin embargo, aunque un medio ácido no proporcione una extracción tan relevante de los compuestos fenólicos sobre las pepitas como lo hace el medio etanólico, cuando aumenta la concentración de ácido, se produce una mayor degradación de la membrana vacuolar y por lo tanto se logra una mayor extracción de las pieles. Todos estos efectos están más favorecidos cuanto mayor es el tiempo de maceración.

Para continuar con el estudio comparativo, se calcularon y evaluaron los parámetros de regresión (Tabla III.10) de las rectas obtenidas al representar los resultados proporcionados con los métodos estudiados. Los satisfactorios resultados de LOL (> 90%) y R^2 (> 0.85) expresan la calidad de las funciones de regresión calculadas para los CFT. Las pendientes de los modelos de calibración representan los diferentes rendimientos de extracción de los métodos. Así, la cantidad de CFT en los extractos de Glories a pH 1.0 representa el 56% de los obtenidos en los de AWRI, mientras que el contenido de CFT en los extractos de Glories a pH 3.2 representan el 36% de los obtenidos en los de AWRI.

Tabla III.10. Parámetros de regresión del estudio comparativo de los tres métodos de extracción para el caso de los compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/Kg uva)

Métodos comparados (método 1 (x) frente al método 2 (y))	Pendiente ± (I.C.)	Intercepto ± (I.C.)	R^2	LOL (%)
AWRI-Glories pH 1.0	0.56 ± 0.08	-17 ± 165	0.870	93.16
AWRI-Glories pH 3.2	0.36 ± 0.03	25 ± 57	0.964	96.30
ITV-Glories pH 1.0	0.67 ± 0.07	36 ± 113	0.874	94.93
ITV-Glories pH 3.2	0.47 ± 0.03	53 ± 47	0.953	96.97
ITV-AWRI	1.32 ± 0.07	66 ± 121	0.953	97.17
Glories pH 1.0-Glories pH 3.2	0.61 ± 0.06	115 ± 76	0.869	94.66

*I.C.= Intervalos de confianza con un nivel de significancia (α) = 0.05

La Figura III.6 muestra gráficamente las regresiones entre los resultados de los CFT.

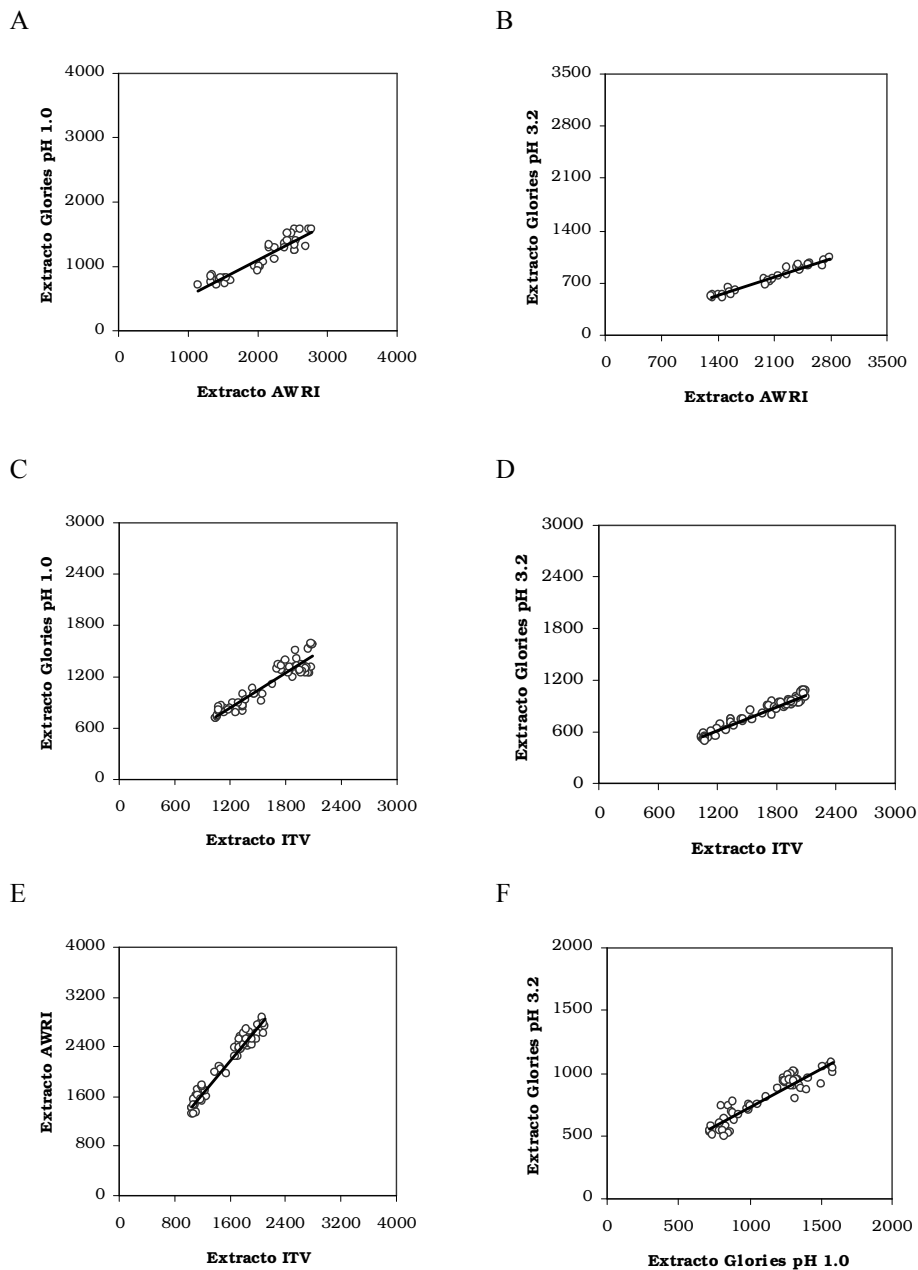


Figura III.6. Representación gráfica de la regresión lineal entre los compuestos fenólicos totales cuantificados en todos los extractos

Los resultados de correlación correspondientes a los AT obtenidos por los tres métodos fueron incluso mejores que los obtenidos para los CFT, con valores de $LOL > 95\%$ y $R^2 > 0.95$, lo que demuestra la excelente calidad de las funciones de regresión calculadas (Tabla III.11).

Las pendientes de los modelos obtenidos reflejan la diferencia de extracción de AT según el método empleado.

Tabla III.11. Parámetros de regresión del estudio comparativo de los tres métodos de extracción para el caso de los antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido/Kg uva)

Métodos Comparados (método 1 (x) frente al método 2 (y))	Pendiente (\pm I.C.)	Intercepto (\pm I.C.)	R ²	LOL (%)
AWRI-Glories pH 1.0	0.98 \pm 0.04	27 \pm 34	0.988	97.90
AWRI-Glories pH 3.2	0.43 \pm 0.03	42 \pm 22	0.972	97.01
ITV-Glories pH 1.0	1.01 \pm 0.03	-72 \pm 24	0.989	98.58
ITV-Glories pH 3.2	0.46 \pm 0.02	-24 \pm 16	0.977	97.94
ITV-AWRI	1.08 \pm 0.05	-118 \pm 39	0.971	97.84
Glories pH 1.0-Glories pH 3.2	0.46 \pm 0.02	16 \pm 13	0.982	98.13

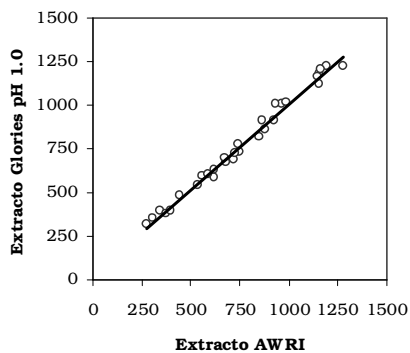
* I.C.= Intervalos de confianza con un nivel de significancia (α) = 0.05

Por un lado, las pendientes de ITV-AWRI, ITV-Glories pH 1.0 y AWRI-Glories pH 1.0 son muy próximas a 1, por lo que la eficacia de la extracción de antocianos obtenidos por los tres métodos es comparable. Este comportamiento se debe al hecho de que los tres métodos llevan a cabo una extracción casi completa de los antocianos.

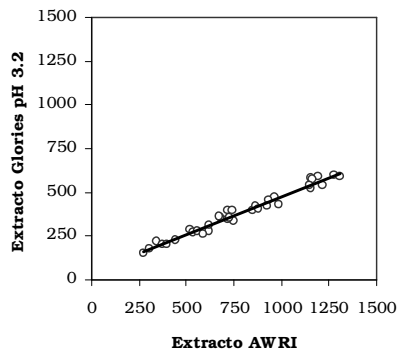
Por otra parte, los valores de la pendiente de los AT obtenidos en los extractos de Glories a pH 3.2 indican que la eficacia de extracción de este extracto representa aproximadamente la mitad de lo que se extrae con los otros tres.

La Figura III.7 muestra gráficamente las regresiones entre los resultados de los AT.

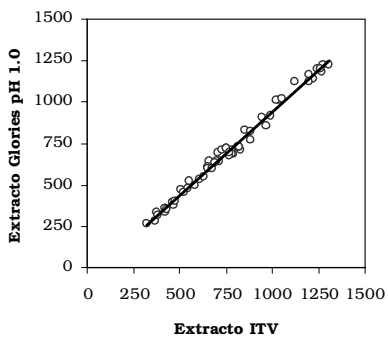
A



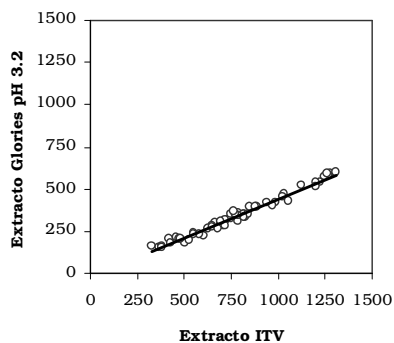
B



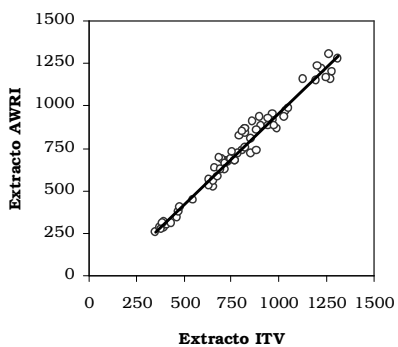
C



D



E



F

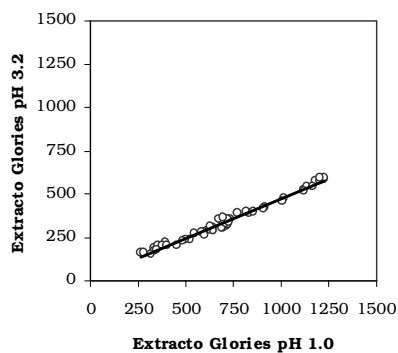


Figura III.7. Representación gráfica de la regresión lineal entre los antocianos totales cuantificados en todos los extractos

Medida de los Índices de Madurez Fenólica

Para demostrar la viabilidad de la aplicación de las correlaciones encontradas en este estudio, se utilizaron los modelos de regresión para predecir los índices más empleados en enología para determinar la madurez fenólica de la uva: el índice de extractabilidad celular o índice de antocianos extraíbles (EA%) y el índice de madurez fenólica o índice de madurez de las pepitas (MP%).

El índice EA% representa el porcentaje de antocianos que no son extraídos durante la vinificación y, por lo general, disminuye durante la maduración. El índice MP% representa el porcentaje de compuestos fenólicos proporcionado por las pepitas, conocido comúnmente como taninos astringentes y su valor también disminuye con la maduración.

Ambos índices son determinados de forma empírica y nos permiten conocer el estado de madurez fenólica de la uva y, por tanto, establecer la fecha de vendimia. Estos parámetros, que dan una idea del potencial fenólico (en mg/L), se calculan a través de las fórmulas presentadas como Ec.III.1 y Ec.III.2 al comienzo del presente capítulo.

Dado que estos índices provienen de la medida de los extractos obtenidos con el método de Glories, el reto consistía en predecirlos a partir de la medida de los CFT y AT en los otros dos extractos, ITV y AWRI, que son métodos muchos más rápidos, pero en lugar de expresar su contenido en mg/Kg, se expresaron en mg/L, que son las unidades que emplean las fórmulas de Glories para calcular dichos índices.

Para ello, se determinaron los índices EA% y MP% en los extractos obtenidos a partir del método de Glories en las muestras pertenecientes a las distintas variedades y diferentes estados de maduración. De este modo se dispuso de una amplia gama de muestras para comprobar la capacidad de predicción de estos índices a partir del análisis de los extractos ITV y AWRI.

La Tabla III.12 muestra los valores medios de ambos índices calculados según el método de Glories y los valores pronosticados a través del análisis de los extractos ITV y AWRI.

Tabla III.12. Valores medios de los índices EA% y MP% calculados en los extractos obtenidos por el método de Glories y los valores predichos con las líneas de regresión

Muestras		EA% cal.	EA% pred.	Recup. EA (%)	Bias EA	MP% cal.	MP% pred.	Recup. MP (%)	Bias MP
ITV	58	51.96	52.33	100.71	0.36	64.22	64.04	99.72	0.18
AWRI	35	51.76	51.63	99.75	0.13	58.46	58.22	99.59	0.24

Los porcentajes de los índices se expresan como media de los valores de las muestras

Recuperación EA (%): (Media EA% predicha/Media EA% calculada)·100

Bias EA: Media de las diferencias entre EA% predicha y EA% calculada

Recuperación MP (%): (Media MP% predicha/Media MP% calculada)·100

Bias MP: Media de las diferencias entre MP% predicha y MP% calculada

Para evaluar la calidad de las predicciones se determinó el parámetro de recuperación, calculado como el cociente entre el valor predicho y el valor medido, expresado en porcentaje. En todos los casos la recuperación fue muy satisfactoria, cercana al 100%.

Debido a que los valores indicados corresponden a la media de varias muestras, fue interesante examinar también el valor de sesgo que se obtuvo por la media de los residuales (diferencia entre valor predicho y calculado), lo que debería ser lo más próxima posible a 0. El test estadístico t para ambos índices obtenidos a partir de los dos extractos mostró que los valores de *bias* eran comparables a 0 para un nivel de significancia (α) de 0.05.

Sin embargo, el parámetro que proporciona información más directa sobre los resultados obtenidos es el error de predicción (*bias*/media valor calculado), expresado en porcentaje.

Cuando se predijeron los valores a partir del método AWRI, el error de predicción para EA% fue inferior a 0.3%, e inferior al 0.5% en el caso de MP%. En la predicción con el método ITV, los resultados también fueron muy

satisfactorios, ya que el error de predicción para EA% fue inferior a 0.7%, e inferior a 0.3% para MP%.

Dado que los errores de predicción obtenidos fueron inferiores al 1%, se pudo concluir que las diferencias entre los valores predichos y medidos no difirieron estadísticamente y que resultaron comparables.

III.4.3.2 Optimización de un método de extracción de la uva

Este estudio consta de dos partes. En una primera etapa se procedió al estudio y optimización de un método analítico para la estimación de los parámetros de madurez fenólica más utilizados en uvas tintas y el establecimiento de sus parámetros de calidad analítica. En la segunda parte se realizó el seguimiento de la estabilidad de las muestras en el tiempo.

Se tomó como método de partida el ITV estándar por presentar más ventajas que los métodos de Glories y AWRI. Este parecía un método adecuado porque presentaba una alta precisión ($CV < 3\%$) y su desarrollo era relativamente rápido.

El método de Glories se descartó debido a la necesidad de duplicar los análisis para obtener los resultados de los polifenoles totales y los fácilmente extraíbles y porque la maceración se prolonga durante 4 horas, lo que lo limita bastante su uso en bodega cuando se deben realizar muchos controles de maduración diarios.

Por otra parte, el método AWRI producía un rendimiento de extracción tan elevado que no se apreciaban diferencias de extractabilidad de los compuestos fenólicos de la uva a lo largo de la maduración fenólica, resultando un método poco útil para determinar la fecha de vendimia.

Optimización del método analítico

Las variables estudiadas para llevar a cabo este estudio fueron: modo y tiempo de trituración de las uvas, temperatura de maceración y lavado del residuo de centrifugación.

Trituración de las uvas

La primera variable de la etapa de extracción que se consideró fue el tipo de homogeneizador empleado en la trituración de las uvas, ya que en el mercado existen diversos tipos de homogeneizadores que consiguen tamaños de partícula diferentes.

El pretratamiento de la muestra es una etapa crucial del análisis puesto que debe garantizar una muestra homogénea para que se produzca una extracción eficaz. Así pues, se compararon dos equipos homogeneizadores muy distintos (Figura III.8) que producían tamaños de partículas diferentes para saber si los parámetros de maduración fenólica de las uvas podrían estar influenciados por el diferente grado de trituración de las mismas:

- Homogeneizador Ultra-Turrax® T18 a 24000 r.p.m., diseñado para uso en laboratorio.
- Batidora Taurus® Bapi600 de 10 velocidades (a velocidad máxima), de uso doméstico.

Se trituraron cuatro lotes de 50 uvas de las variedades Tempranillo y Pinot noir con cada uno de los equipos.



Figura III.8. Equipos homogeneizadores utilizados: homogeneizador de alta velocidad para uso analítico Ultra-Turrax® T-18 (izquierda) y batidora doméstica Taurus® Bapi600 (derecha)

Se escogieron estas dos variedades en particular con el objetivo de comparar la extracción de los compuestos fenólicos en uvas que presentasen por una parte diferente tamaño de las bayas, y por tanto, diferente proporción de piel/pulpa, y, además, diferentes grados de maduración en el mismo momento de muestreo, puesto que ambas variedades tienen ciclos de maduración diferentes. En la misma fecha de muestreo Pinot noir ya ha completado su maduración, por ser una variedad muy temprana, mientras que Tempranillo está comenzando a madurar.

La influencia del tamaño de partícula sobre la eficacia de extracción de las uvas se estudió mediante la medida de los parámetros intensidad colorante (IC), índice de polifenoles totales (IPT) y antocianos totales (AT).

El análisis de la varianza ANOVA de los datos y la comparación del valor crítico teórico con el valor experimental, mostró que no existían diferencias estadísticamente significativas entre utilizar homogeneizador o batidora sobre los parámetros medidos, en concordancia con los resultados de Cynkar *et al.*(45). Así pues, cada laboratorio debe optar por el que considere más conveniente en términos de coste, facilidad de manejo y de limpieza.

En la Tabla III.13 se muestran los resultados de IC, IPT y AT del ensayo:

Tabla III.13. Influencia de la trituración de las muestras sobre la extracción. Variedad: Pinot noir (1ª columna, en azul) y Tempranillo (2ª columna, en verde) muestreadas el 31.07.06.

Muestra	50 uvas (g)		Extracto						
			Volumen (ml)	IC		IPT		AT (mg/kg)	
U-T (1)	74.4	91.7	130	9.38	6.12	30.85	32.10	508.30	139.30
U-T (2)	75.1	92.7	130	9.93	5.95	35.55	30.55	551.98	139.07
U-T (3)	74.6	92.1	130	10.17	6.62	35.13	30.63	593.32	156.82
U-T (4)	74.8	92.1	130	10.26	6.58	37.55	33.65	581.10	152.27
Batidora (1)	74.6	85.7	130	9.98	7.02	33.25	30.35	536.12	152.50
Batidora (2)	74.8	85.5	130	9.71	6.85	34.48	30.20	499.98	154.55
Batidora (3)	73.0	85.8	130	9.10	6.62	34.50	30.05	494.78	148.17
Batidora (4)	75.2	85.5	130	9.29	6.61	35.23	30.38	523.64	148.85
Análisis de la Varianza			<i>F (experimental)</i>	2.18	5.56	0.08	4.09	4.48	0.76
			<i>F (valor crítico)</i>	5.99	5.99	5.99	5.99	5.99	5.99

Tiempo de maceración

Uno de los factores más determinantes a la hora de realizar cualquier análisis es el tiempo necesario para llevarlo a cabo. En el caso que nos ocupa, la etapa más crítica, en términos de tiempo, es la extracción de los compuestos fenólicos, por lo que la siguiente variable que se estudió fue el tiempo de maceración necesario.

Para llevar a cabo este estudio de la cinética de extracción de los compuestos fenólicos se utilizaron 4 variedades de nuestra finca (Tempranillo, Merlot, Pinot noir y Syrah) y se realizaron maceraciones de 2 horas tomando submuestras cada 15 minutos a las que se midieron los parámetros de intensidad colorante (IC), índice de polifenoles totales (IPT) y antocianos totales (AT), con el fin de establecer un compromiso entre tiempo y eficacia de extracción.

Para obtener valores lo más fiables posible, se comprobó esta cinética sobre las distintas variedades de uva estudiadas por duplicado y en diferentes estadios de maduración, ya que la madurez es un factor a tener en cuenta sobre la extractabilidad de polifenoles (11, 100, 183).

Los resultados que se obtuvieron mostraron la misma tendencia cualquiera que fuera el parámetro medido.

A modo de ejemplo, en las Figuras III.9 y III.10 se presentan las evoluciones de la concentración de los compuestos fenólicos totales y los antocianos totales, respectivamente, en el homogenizado de uva a lo largo de 2 horas.

Valorando el compromiso entre el tiempo de maceración y la eficacia de extracción, se puede fijar el tiempo de maceración en 1 hora para extraer la mayoría de los compuestos fenólicos.

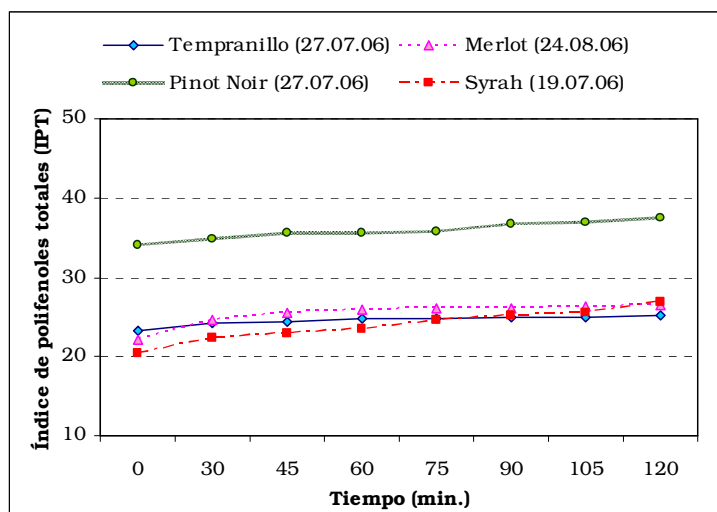


Figura III.9. Cinética de extracción de compuestos fenólicos totales

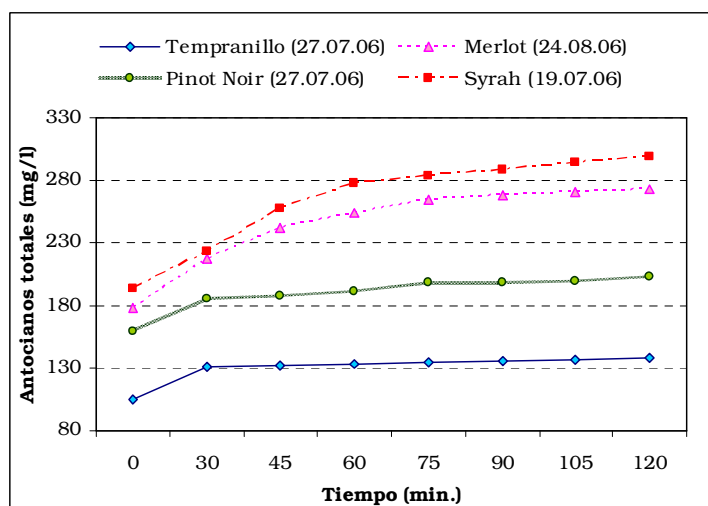


Figura III.10. Cinética de extracción de antocianos totales

Temperatura de maceración

Por otra parte, teniendo en cuenta que, aparte del momento de maduración de la uva, la temperatura también podría influir sobre la extracción de los compuestos fenólicos, se hizo necesario evaluar el efecto de este parámetro.

Así pues, se estudió el efecto del empleo de tres temperaturas diferentes, a 25°C (temperatura ambiente), a 40°C y 60°C, sobre la extracción de los compuestos fenólicos.

Con el fin de conseguir unos resultados lo más representativos posible, se realizaron ensayos con diferentes variedades de uva y estadios de madurez. En cada ensayo se tomaron 300 uvas y después de triturar se repartieron entre 6 erlenmeyers (50g de triturado en cada uno), de manera que las 3 maceraciones (a 25°C, 40°C y 60°C) se hicieron por duplicado. Las submuestras se tomaron a $t = 0, 1, 5, 10, 15, 30$ y 60 minutos.

Tras centrifugarlas y filtrarlas se midió la intensidad colorante (IC), el índice de polifenoles totales (IPT) y los antocianos (AT) de cada una de ellas.

Los resultados obtenidos con todas las variedades indicaron que un incremento de la temperatura de maceración favorecía la extracción de los analitos, como muestran las Figuras III.11, III.12 y III.13 para la variedad Tempranillo.

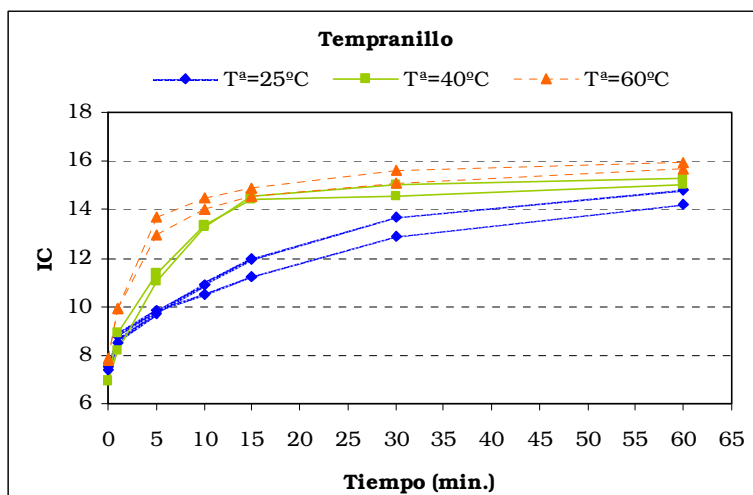


Figura III.11. Cinética de extracción del color en uva Tempranillo a tres temperaturas diferentes (25°C, 40°C y 60°C)

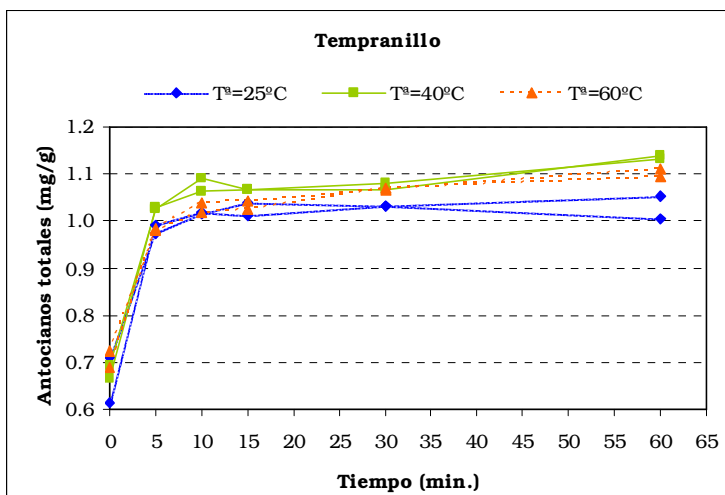


Figura III.12. Cinética de extracción de antocianos en uva Tempranillo a tres temperaturas diferentes (25°C , 40°C y 60°C)

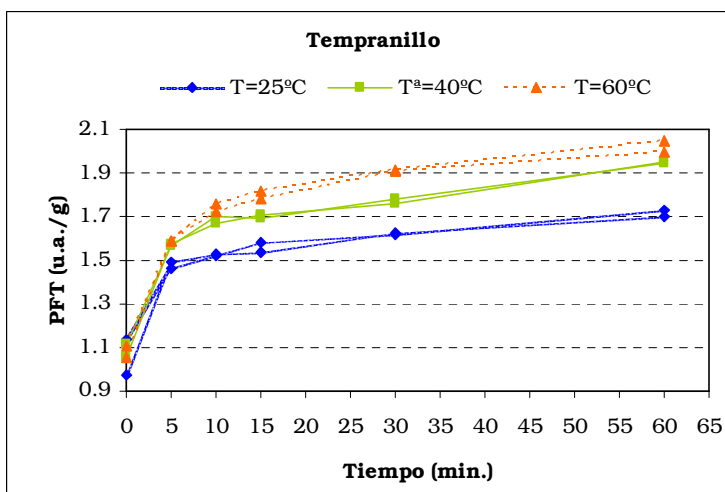


Figura III.13. Cinética de extracción de polifenoles totales en uva Tempranillo a tres temperaturas diferentes (25°C , 40°C y 60°C)

La explicación a estos resultados está en el hecho de que temperaturas elevadas hacen más frágiles las paredes celulares de los hollejos, favoreciéndose el rendimiento de la extracción.

A 60°C se obtuvieron resultados similares que a 40°C pero, según otros autores (184, 185), temperaturas superiores a 40°C degradan los antocianos, que evolucionan hacia otros compuestos que ya no poseen color rojo, por lo

que no es recomendable alcanzar los 60°C, fijándose como temperatura máxima de maceración los 40°C.

Así pues, de entre las opciones evaluadas, la mejor resulta ser la de 40°C, ya que esta temperatura permite obtener en sólo 15 minutos de maceración, el mismo rendimiento de extracción de compuestos fenólicos que el que se obtiene con 1 hora de maceración a temperatura ambiente.

Centrifugación y lavado del residuo

El macerado se puede filtrar o bien centrifugar, y en la bibliografía están contempladas ambas posibilidades.

Sin embargo, durante los ensayos anteriores, se observó que si la filtración se realizaba sobre papel de filtro, quedaba retenida parte de la materia colorante, influyendo en la exactitud y precisión de los resultados de maduración fenólica.

Para minimizar la pérdida de materia colorante se optó por la centrifugación, decantando el sobrenadante sobre un tapón de lana de vidrio (por si se desprendía el residuo), que más tarde se lavaba con unas gotas de solución extractante.

Así pues, el estudio de optimización del método de extracción, también comprendió las pruebas de lavado del residuo de centrifugación para analizar su influencia sobre la extracción de los compuestos fenólicos, intentando disminuir las pérdidas de color durante la etapa de filtrado.

En este sentido, se compararon los resultados de un extracto al que no se lavó su residuo con el de uno al que no se lavó el residuo pero se enrasó a un volumen exacto (en un matraz aforado de 200 ml), con otros dos extractos a los que se había lavado su residuo con la misma solución extractante (lavando una vez con 50 ml y dos veces con 25 ml).

Los resultados revelaron que lavando el residuo una vez con 50 ml de solución extractante se cuantificaron entre un 15-25 % más de antocianos que sin el lavado, por lo que el rendimiento de extracción fue mayor.

Por otra parte, es más correcto referir los resultados a un volumen exacto y constante de extracto que al obtenido después de centrifugar el triturado, ya que en este último puede haber variaciones según el tamaño de la uva que hayamos muestreado incluso tratándose de la misma variedad, por lo que éste sería el procedimiento a seguir en el futuro.

Determinación de antocianos totales (AT)

La optimización del método para determinar la madurez fenólica de la uva también incluyó la selección de un método de cuantificación de los antocianos totales precisa, sencilla y rápida.

Por ello, se compararon los dos principales métodos de medida de antocianos totales: el método de Puissant y Léon (114), basado en la acidificación del medio con HCl 0.1M (el empleado hasta ahora), y el método de Ribéreau-Gayon y Stonestreet (110), basado en la decoloración con SO₂.

El primer aspecto que se comparó fue la repetitividad de ambos métodos de análisis y para ello se analizó el mismo extracto de uva 10 veces empleando ambas metodologías. Para el ensayo se analizaron los extractos de dos variedades de uva diferentes, Pinot noir y Syrah (Tabla III.14).

Los resultados mostraron que el método de Puissant y Léon es más preciso, con un coeficiente de variación bajo (CV< 1%), mientras que el método de Ribéreau-Gayon y Stonestreet presenta un coeficiente de variación algo mayor (CV≈ 3%).

Ambos métodos muestran una precisión aceptable, pero aun con una fiabilidad equivalente, se ha decidido adoptar siempre el método de cuantificación de antocianos totales de Puissant y Léon por ser más directo, rápido y cómodo (se evita el manejo de Na₂S₂O₅, que es irritante).

Por otra parte, también se compararon los métodos para conocer el grado de concordancia entre los resultados.

Tabla III.14. Prueba de repetibilidad de los métodos Puissant y Léon y Ribéreau-Gayon y Stonestreet con uvas de la variedad Pinot noir del 31/07/06 (Muestra A) y de la variedad Syrah del 17/08/06 (Muestra B)

Muestra A	Ant.P-L	Ant.SO ₂	Muestra B	Ant.P-L	Ant.SO ₂
1	266.3	326.8	1	248.1	306.2
2	268.6	335.6	2	250.8	318.9
3	267.7	320.2	3	253.7	311.9
4	264.6	340.4	4	253.2	309.3
5	268.6	334.2	5	253.7	304.1
6	270.2	342.6	6	247.9	299.7
7	268.9	347.4	7	249.3	310.2
8	266.3	349.1	8	251.6	315.9
9	270.2	337.3	9	252.0	288.7
10	269.9	337.3	10	253.9	308.9
Media	268.1	337.1	Media	251.4	307.4
SD	1.89	8.76	SD	2.32	8.56
RSD	0.01	0.03	RSD	0.01	0.03
CV (%)	0.71	2.60	CV (%)	0.92	2.78
Varianza	3.6	76.8	Varianza	5.4	73.2

SD: desviación estándar; **RSD:** desviación estándar relativa (SD/Media); **CV:** coeficiente de variación (SD · 100/Media); **Varianza:** SD²

En ambos métodos, para expresar el resultado de antocianos totales referido a Kg de uva, empleamos la fórmula:

$$AT \text{ (mg/ Kg)} = AT \text{ (mg/L)} \cdot (Ve/Mt) \quad \text{Ec.III.29}$$

donde, Ve es el volumen de extracto obtenido (en ml) y Mt es la masa de triturado analizado (en g).

Para llevar a cabo esta comparación, se analizaron por ambos métodos los antocianos totales de 200 extractos de uva procedentes de diferentes variedades y estados de maduración.

Tal y como se refleja en la Figura III.14, los resultados obtenidos con uno y otro método presentaron buena correlación, aunque cabe destacar que difirieron en términos de magnitud.

Concretamente, con el método de Puissant y Léon se obtuvieron resultados un 20-25% más bajos que por el de Ribéreau-Gayon y Stonestreet, aunque hay que tener en cuenta que el primero es más sencillo y directo.

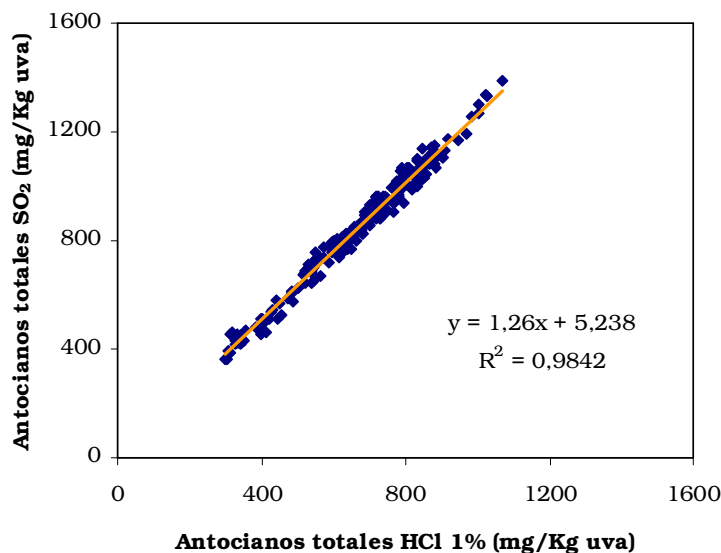


Figura III.14. Contenido de antocianos según el método de Puissant y Léon vs el de Ribéreau-Gayon y Stonestreet

El hecho de tener una respuesta distinta según el método utilizado, nos llevó seguidamente a calcular el factor que habría que aplicar sobre el coeficiente 22.76 de la fórmula original del método de Puissant y Léon para obtener un resultado comparable al del método de Ribéreau-Gayon y Stonestreet. Tras la corrección, la fórmula a emplear queda de la siguiente manera:

$$\text{Antocianos totales (mg/L)} = A_{520} \cdot 28.6 \cdot \text{FD} \quad \text{Ec.III.30}$$

Estudio de la estabilidad de las muestras

Como se ha indicado anteriormente, en estudios de investigación sobre la maduración fenólica, a menudo se requiere conservar la uva para evitar su deterioro hasta el momento de procesarla, desconociéndose el impacto sobre el recuento de los compuestos fenólicos.

Para evaluar la estabilidad de las muestras, se estudió el efecto sobre el color (IC) y el contenido fenólico (IPT y AT) que tiene una conservación prolongada de las uvas tintas en distintas condiciones.

Se midieron los valores de los anteriores parámetros en muestras de 5 variedades de uva diferentes (Pinot noir, Cabernet sauvignon, Syrah, Tempranillo y Garnacha) conservadas en refrigeración y de 4 variedades (Cabernet sauvignon, Syrah, Tempranillo y Garnacha) conservadas en congelación durante 1 año. Los valores obtenidos en los diferentes periodos analizados se compararon con los valores de las mismas muestras recién recolectadas.

Estabilidad de las uvas refrigeradas y congeladas

El primer estudio que se llevó a cabo consistió en comprobar el efecto que tenía sobre el color y el recuento de los compuestos fenólicos la conservación de las uvas en refrigeración (4°C) y congelación (-20°C).

En el caso de la conservación de las uvas en el refrigerador a lo largo de 2 semanas, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la ineficacia de dicho tipo de conservación. A esta conclusión se llegó al correlacionar los valores de IC, IPT y AT de las muestras frescas con las refrigeradas, ya que sólo se obtuvieron unos coeficientes de regresión de 0.90, 0.83 y 0.75, respectivamente.

Estas diferencias pudieron estar debidas a que la uva pierde agua y firmeza con el tiempo, lo cual influyó en el recuento de los compuestos fenólicos.

En el estudio del efecto de la congelación de las uvas, se observó algo parecido. En este caso, el coeficiente de regresión entre uvas frescas y congeladas fue de 0.73 en AT, de 0.84 en IPT y de 0.78 en IC. Estas variaciones se debieron, muy probablemente, a que en las uvas congeladas los cristales de hielo rompieron las membranas de las células de los hollejos facilitando la salida de los antocianos, lo que pudo falsear el resultado (11, 45, 100, 183, 186).

A la vista de los resultados obtenidos, se hizo patente que un análisis de uva refrigerada más de 24 horas o un análisis de uva congelada no reflejaban

la realidad de la uva en la cepa en un estudio de seguimiento de madurez fenólica, por lo que debían descartarse estas opciones.

Estabilidad de los extractos

Prosiguiendo con el estudio, se decidió comprobar la estabilidad en el tiempo de extractos refrigerados y congelados, obtenidos mediante el método optimizado a partir de muestras recién recolectadas.

Así pues, extractos de las 5 variedades de uva estudiadas, se repartieron en 10 alícuotas, destinando 1 para ser conservada en refrigeración (4°C) y las otras 9 en congelación (-20°C), durante 12 meses. De esta manera los extractos congelados sólo sufrieron una descongelación antes de ser analizados.

Los parámetros de color de los extractos refrigerados mostraron una correlación lineal perfecta a las 24 horas respecto al extracto fresco ($R^2 > 0.99$). Al prolongarse el estudio de la conservación de los extractos refrigerados a lo largo del tiempo (48 horas, 15 días, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 12 meses), se comprobó que esta correlación se mantuvo hasta los 2 meses ya que, a partir de aquí, el valor del coeficiente de correlación comenzó a descender hasta que, a los 12 meses, llegó a un valor de 0.93. La refrigeración del extracto mantuvo las propiedades de la muestra original dentro de los 2 primeros meses de conservación a 4°C.

Por otro lado, se quiso también comprobar los resultados obtenidos congelando el extracto y midiendo los parámetros de color y fenólicos a lo largo del tiempo (24 horas, 48 horas, 15 días, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 12 meses).

En este caso, se comprobó que los extractos congelados fueron mucho más estables que los refrigerados, ya que la correlación de éstos con los frescos presentó un $R^2 = 0.99$, valor que se mantuvo a lo largo de los 12 meses que se prolongó el estudio (Figura III.15).

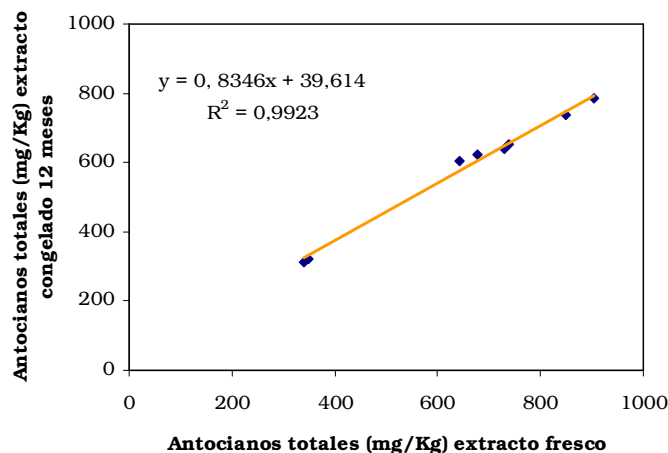


Figura III.15. Relación entre los antocianos medidos en el extracto fresco y en el congelado transcurridos 12 meses

Estos resultados demostraron que el extracto congelado no sufrió una variación significativa en su composición, manteniéndose más estable que el refrigerado a lo largo del tiempo. Por tanto, estas muestras siempre ofrecerán una información fiable del estado de la uva en la cepa, sea cual sea el momento de su análisis.

El extracto congelado es pues, la herramienta perfecta para conservar intactos los parámetros de color y fenólicos de la uva en el momento del muestreo, permitiendo el seguimiento de la maduración fenólica de forma fiable.

Influencia del tiempo en la calidad de los extractos

Con los estudios presentados en los párrafos anteriores, se demostró que los parámetros de color y fenólicos medidos en los extractos no variaban con el tiempo si se mantenían en unas determinadas condiciones. Sin embargo, para comprobar la validez real de este método de conservación, se hacía necesario comprobar también la conservación de la calidad del extracto, es decir, comprobar si se mantenía el color original de la muestra recién recolectada.

Se sabe que con el tiempo, el color rojo (A_{520}) de los antocianos se pierde por oxidación o por combinaciones con otros compuestos, que hacen aumentar

la componente amarilla (A_{420}) del color. Así pues, en esta parte del estudio se hizo un seguimiento de las componentes roja ($\%A_{520}$), amarilla ($\%A_{420}$) y tonalidad (To), importancia relativa del amarillo sobre el rojo (A_{420}/A_{520}), de los extractos refrigerados y congelados.

La Figura III.16 muestra la evolución de la tonalidad de los extractos conservados en refrigeración y la Figura III.17 muestra la evolución de la tonalidad de los extractos conservados en congelación.

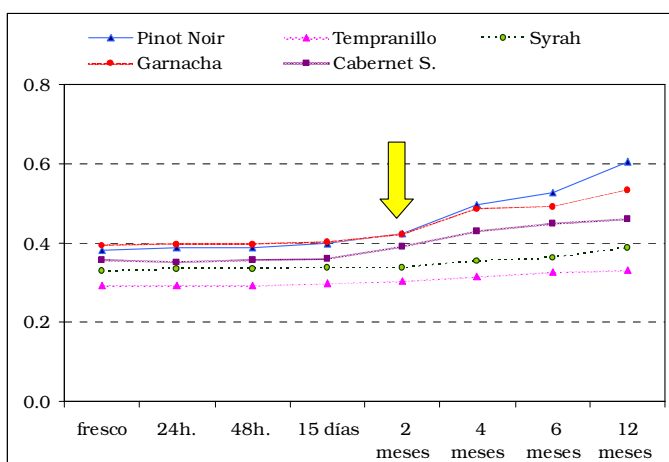


Figura III.16. Evolución de la tonalidad (A_{420}/A_{520}) de extractos conservados en refrigeración (4°C) a lo largo de 1 año

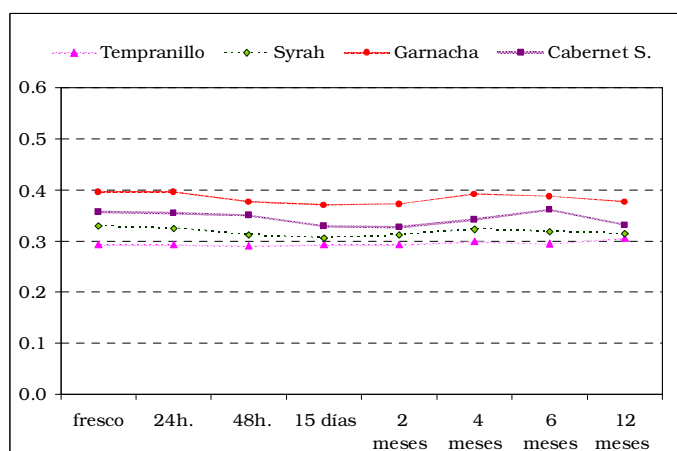


Figura III.17. Evolución de la tonalidad (A_{420}/A_{520}) de extractos conservados en congelación (-20°C) a lo largo de 1 año

Tal y como se puede observar, se produjo un crecimiento progresivo de la componente amarilla en los extractos refrigerados, que se hizo patente a partir de los 2 meses, mientras que este comportamiento no se apreció en los extractos congelados.

El estudio de la evolución de la componente roja a lo largo del tiempo confirmó que los extractos refrigerados pierden su color rojo con el tiempo.

Se puede decir que el extracto refrigerado refleja el comportamiento que un vino: crece ligeramente su componente amarilla en detrimento de la roja. Esto se explica por las combinaciones directas entre taninos y antocianos que disminuyen el color rojo y elevan la tonalidad anaranjada del extracto.

La congelación evita este tipo de reacciones, de manera que los extractos congelados se mantienen estables durante más tiempo, permitiendo un análisis más fiable que el de los extractos refrigerados.

III.4.3.3 Predicción del color y de la composición fenólica del vino a partir del análisis de uvas

En esta sección se describe el estudio llevado a cabo para determinar la posibilidad de predecir la composición fenólica del vino final a partir del análisis de la uva, de manera que se pudiera llegar a fijar la fecha de vendimia más adecuada en base a la predicción de las características de los vinos.

Método de extracción de la uva empleado

El método de extracción utilizado en este trabajo para el seguimiento de la maduración fenólica fue el optimizado en el apartado anterior y que consistió en una micro-maceración en medio hidroalcohólico ácido termostatzado. Para ello, después de triturar convenientemente las uvas con un Ultra-Turrax® a 24000 r.p.m. durante 2 minutos, se pesaron exactamente 50 g de pasta (por duplicado) y se llevaron a un recipiente de vidrio estanco de 300 ml donde se maceraron con 100 ml de solución extractante (85 ml de ácido clorhídrico 0.1% + 15 ml de etanol 96 %) durante 15 minutos a 40°C, bajo agitación constante. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifugó y el sobrenadante se filtró sobre lana de vidrio. El residuo de centrifugación fue

lavado con 50 ml de solución extractante para asegurarnos de extraer todo el color y, a continuación, se centrifugó de nuevo y se añadió el líquido de lavado al sobrenadante obtenido anteriormente. Para acabar, el extracto obtenido se llevó a un matraz aforado de 200 ml y se enrasó con la misma solución extractante. La Figura III.18 muestra los pasos del método de extracción optimizado.



Figura III.18. Método de extracción optimizado basado en el ITV Estándar

Composición de las uvas

Los parámetros experimentales relativos a la madurez tecnológica medidos fueron: peso de 100 bayas (g) y °Brix, contenido de azúcar (g/L), grado alcohólico probable (% vol), acidez total (g ácido tartárico/L) y pH medidos en el mosto (Tabla III.15).

Por su parte, los parámetros fenólicos y cromáticos medidos relativos a la madurez fenólica fueron: compuestos fenólicos totales (CFT), antocianos totales (AT), taninos condensados /TC), intensidad colorante (IC), tonalidad (To), % amarillo, % rojo y % azul (Tabla III.16).

Como puede verse en las tablas, las muestras cubrieron un amplio rango de valores para los parámetros medidos, normales para la región vitícola estudiada. Este amplio rango permitió construir un modelo que proporcionaba conclusiones generales sobre el comportamiento de las variedades a lo largo de la maduración.

Respecto a los parámetros relacionados con la madurez tecnológica, puede observarse que el tamaño de la uva disminuyó debido a la pérdida de agua que tiene lugar durante la maduración, en concordancia con otros estudios (6, 101, 76, 187).

Tabla III.15 Valores correspondientes a los parámetros de madurez tecnológica de las uvas en las tres fechas de muestreo

	Syrah			Merlot			Tempranillo			Carñena			Cabernet sauvignon		
	10 Ago	24 Ago	7 Sep	11 Ago	1 Sep	14 Sep	12 Ago	26 Ago	9 Sep	27 Ago	3 Sep	10 Sep	28 Ago	11 Sep	21 Sep
Peso de 100 bayas (g)	188.4	186.0	163.6	173.6	162.0	155.7	253.9	244.8	247.2	303.6	283.3	303.0	158.3	142.3	154.2
^a Brix	19.0	22.0	23.1	18.3	22.5	24.0	18.5	20.1	20.5	19.5	20.0	21.0	20.0	20.0	21.0
Contenido de azúcar (g/L)	181.0	215.1	227.6	173.0	220.8	237.9	175.3	193.5	198.1	186.7	192.4	203.7	192.4	192.4	203.7
Grado alcohólico probable (vol%)	10.8	12.8	13.5	10.3	13.1	14.1	10.4	11.5	11.8	11.1	11.4	12.1	11.4	11.4	12.1
Acidez total (g/L ácido tartárico)	8.44	5.97	4.81	7.55	5.38	4.89	6.89	4.65	4.23	6.87	6.30	5.72	7.49	6.10	6.35
pH	3.16	3.46	3.56	3.26	3.54	3.67	3.20	3.43	3.50	3.35	3.40	3.51	3.31	3.37	3.38

Por otra parte, fue también importante considerar el tamaño de las uvas porque, dado que los antocianos se localizan en la piel de uva, un tamaño de uva grande se traduce en una baja proporción piel/pulpa.

Por tanto, las variedades con las bayas más pequeñas (como Cabernet sauvignon y Merlot) deberían proporcionar los mayores contenidos de antocianos por kilogramo de uva, mientras que las bayas más grandes (como Cariñena y Tempranillo), los menores.

En cuanto a los parámetros fenólicos y cromáticos, la Tabla III.16 recoge los resultados obtenidos para los extractos de uva estudiados junto con los resultados del test de la mínima diferencia significativa (LSD), que permitió determinar la influencia de la fecha de recogida para cada variedad de uva.

Como puede verse, los parámetros cromáticos (To, % amarillo, % rojo y % azul) de los extractos de uva no mostraron una tendencia claramente definida a lo largo de la maduración en ninguna de las variedades. De hecho, sólo la IC mostró una tendencia creciente durante la maduración, que fue especialmente significativa durante el primer período, es decir, entre la primera y la segunda fecha de muestreo.

Sin embargo, aunque los parámetros cromáticos no parezcan ser buenos indicadores de la madurez fenólica, fue importante su medida para comprobar si se correlacionaban con la de los vinos obtenidos.

Respecto a los parámetros cromáticos, debe remarcar el hecho de que, como ya se ha dicho, se trabajó con un amplio rango de valores a causa de la variabilidad entre variedades de uva y distintos estados de maduración, a diferencia de otros estudios similares donde sólo se consideraban uvas maduras (115), lo cual se tradujo en la obtención de modelos más robustos.

Los datos experimentales hallados mostraron un crecimiento notable de los CFT y AT entre el primer y segundo punto de muestreo, seguido de una estabilización o ligero decrecimiento en el tercero.

Tabla III.16 Valores medios (n=2) correspondientes a los parámetros de los extractos de uva de las tres fechas de muestreo

	Syrah			Merlot			Tempranillo			Carriena			Cabernet sauvignon			
	10 Ago	24 Ago	7 Sep	11 Ago	1 Sep	14 Sep	12 Ago	26 Ago	9 Sep	27 Ago	3 Sep	10 Sep	28 Ago	11 Sep	21 Sep	
Parámetros fenólicos	CFI	1692 ^a	1970 ^b	1807 ^a	1844 ^a	1937 ^a	1941 ^a	1529 ^a	1780 ^b	1650 ^c	1009 ^a	1068 ^b	1052 ^b	1389 ^a	1649 ^b	1627 ^b
	AT	917 ^a	996 ^b	885 ^b	844 ^a	991 ^b	959 ^b	600 ^a	730 ^b	665 ^c	487 ^a	526 ^b	554 ^c	720 ^a	707 ^a	714 ^a
	TC	2512 ^a	2636 ^{ab}	2227 ^{ac}	2776 ^a	2662 ^a	2761 ^a	3206 ^a	3079 ^a	2739 ^b	1349 ^a	1400 ^a	1386 ^a	2894 ^a	2576 ^b	2634 ^b
Parámetros cromáticos	IC	13.14 ^a	13.56 ^b	11.66 ^c	11.87 ^a	13.15 ^b	13.04 ^b	8.38 ^a	9.70 ^b	9.27 ^b	7.17 ^a	7.37 ^a	7.95 ^b	9.56 ^a	8.67 ^b	8.74 ^b
	To	0.279 ^a	0.288 ^b	0.286 ^{ab}	0.287 ^a	0.305 ^b	0.315 ^c	0.257 ^a	0.262 ^b	0.288 ^c	0.288 ^a	0.291 ^{ab}	0.275 ^c	0.292 ^{ab}	0.296 ^a	0.292 ^b
Parámetros cromáticos Amarillo	% Rojo	75.79 ^a	75.07 ^b	74.90 ^b	75.41 ^a	73.94 ^b	73.47 ^b	77.27 ^a	76.50 ^b	75.47 ^c	75.47 ^a	74.94 ^b	76.37 ^c	75.03 ^a	74.84 ^a	75.11 ^a
	% Azul	3.10 ^a	3.32 ^b	3.69 ^c	2.93 ^a	3.54 ^b	3.41 ^b	2.86 ^a	3.43 ^b	2.83 ^a	2.79 ^a	3.22 ^b	2.61 ^a	3.03 ^a	3.03 ^a	2.97 ^a
		21.11 ^a	21.61 ^b	21.41 ^{ab}	21.67 ^a	22.52 ^b	23.12 ^c	19.87 ^a	20.07 ^a	21.70 ^b	21.74 ^a	21.84 ^a	21.02 ^b	21.94 ^a	22.13 ^{ab}	21.91 ^{ac}

CFI: compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/Kg); AT: antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido /Kg); TC: taninos condensados (mg catequina/Kg); IC: intensidad colorante (unidades absorbancia, u.a.); To: tonalidad. Valores con diferente letra entre fechas de muestreo, para cada variedad, fueron significativamente diferentes según el test LSD ($\alpha = 0.05$).

Este comportamiento concuerda con lo observado en otros estudios (96) que relacionaban las caídas de concentración de los antocianos con el comienzo del proceso de post-maduración (6), lo cual podría deberse a la combinación de antocianos con taninos (188).

Además, los valores de CFT y AT obtenidos concuerdan con los esperados, excepto para el caso de la Cabernet sauvignon, que mostró un comportamiento atípico. Aunque la Cabernet sauvignon está considerada una variedad rica en color por su alta proporción piel/pulpa, presentó un valor bajo e invariable de AT. Ésto se debió a que la zona de la finca experimental de “Mas dels Frares” donde crece esta variedad acumula mucha agua, dificultando una adecuada maduración en términos de enriquecimiento en materia colorante. Sin embargo, incluso con este atípico comportamiento, las muestras de Cabernet sauvignon fueron adecuadas para construir los modelos de regresión, ya que aumentaron la variabilidad natural del conjunto de muestras.

Respecto a los TC, los análisis de las uvas enteras, incluyendo las pepitas pulverizadas, no mostraron una clara tendencia porque, mientras que la concentración de taninos aumentó en las pieles durante la maduración, esta concentración disminuyó en las pepitas durante esta etapa (1). Por tanto, cuando se consideró la uva en conjunto, estas concentraciones se equilibraron a lo largo de la maduración y permanecieron casi constantes.

En cuanto a la correlación entre los parámetros de madurez fenólica y tecnológica, tal y como se muestra en la Tabla III.17, y de acuerdo a estudios previos (19, 91, 115), no se encontró ninguna correlación entre ambos tipos de madurez. Esta falta de correlación entre ambos tipos de madurez hace esencial la determinación de ambos parámetros para garantizar una buena calidad de los vinos tintos, y especialmente, los de crianza. De hecho, sólo se observó cierta correlación entre los azúcares (expresados como °Brix) y el contenido antociánico. Este comportamiento podría ser debido al hecho de que la acumulación gradual de azúcares a menudo favorece la síntesis de metabolitos secundarios, como los antocianos (188).

Tabla III.17 Coeficientes de correlación entre la madurez tecnológica y la madurez fenólica medidas en la uva

Madurez tecnológica	Madurez fenólica		
	CFT	AT	TC
°Brix	0.400	0.522*	-0.034
Acidez total	-0.263	-0.090	-0.048
pH	0.234	0.269	-0.157

Acidez total (g ácido tartárico/L); **CFT**, compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/Kg); **AT**, antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido/Kg); **TC**, taninos condensados (mg catequina/Kg).

* P<0.05

Composición del vino

Una vez obtenidos los distintos vinos por microvinificación de una parte de las uvas muestreadas a lo largo del proceso de maduración, se determinaron los valores de los parámetros cromáticos y fenólicos de éstos. Los resultados se recogen en la Tabla III.18, donde también se muestran las diferencias estadísticamente significativas entre vinos.

Como puede verse, los vinos de Syrah, Merlot y Tempranillo, mostraron los valores más elevados de IC, CFT y AT, mientras que los mayores contenidos de TC fueron proporcionados por los vinos Tempranillo, Cariñena y Cabernet sauvignon, pero, en todos los casos, los valores estuvieron dentro del rango normal esperado empleando vinificación tradicional. Sin embargo, aunque la tendencia de los parámetros de los vinos fue similar a la de los correspondientes parámetros en uvas, las magnitudes de concentración fueron diferentes. Estas diferencias se debieron al hecho de que durante la vinificación las pepitas no se trituran, a diferencia de lo que ocurre en el procedimiento para determinar los parámetros fenólicos en la uva, donde, además, la extracción se fuerza para ser más rápida y más efectiva. Este hecho hizo que existiese una mayor concentración de taninos condensados en los extractos de uva que en los vinos obtenidos por vinificación tradicional.

Tabla III.18 Valores medios (n=3) correspondientes a los parámetros de los vinos en las tres fechas de muestreo

	Syrah			Merlot			Tempranillo			Cabernet sauvignon						
	10 Ago	24 Ago	7 Sep	11 Ago	1 Sep	14 Sep	12 Ago	26 Ago	9 Sep	27 Ago	3 Sep	10 Sep	28 Ago	11 Sep	21 Sep	
Parámetros fenólicos	CFT	781 ^a	963 ^b	979 ^b	915 ^a	1039 ^b	1064 ^b	717 ^a	923 ^b	897 ^b	509 ^a	485 ^a	524 ^a	733 ^a	769 ^b	789 ^b
	AT	375 ^a	450 ^b	410 ^c	387 ^a	446 ^b	467 ^c	200 ^a	288 ^b	300 ^b	169 ^a	143 ^b	170 ^a	281 ^a	300 ^b	305 ^b
	TC	433 ^a	349 ^b	439 ^a	473 ^a	279 ^b	385 ^a	764 ^a	553 ^b	672 ^a	461 ^a	567 ^b	620 ^b	604 ^a	632 ^a	614 ^a
	IC	13.90 ^{ab}	15.14 ^a	13.55 ^b	13.53 ^a	15.68 ^b	15.65 ^b	6.66 ^a	9.34 ^b	9.37 ^b	5.71 ^a	4.83 ^b	5.75 ^a	9.08 ^b	8.85 ^a	9.44 ^b
	To	0.373 ^a	0.435 ^b	0.473 ^c	0.408 ^a	0.459 ^b	0.480 ^c	0.461 ^a	0.489 ^b	0.507 ^c	0.453 ^a	0.487 ^b	0.469 ^c	0.463 ^a	0.490 ^b	0.478 ^c
Parámetros cromáticos	% Amarillo	25.20 ^a	27.56 ^b	28.86 ^c	26.72 ^a	28.64 ^b	29.44 ^c	29.16 ^a	29.90 ^b	30.45 ^c	28.97 ^a	30.43 ^b	29.63 ^c	29.11 ^a	30.12 ^b	29.63 ^c
	% Rojo	67.62 ^a	63.32 ^b	60.98 ^c	65.55 ^a	62.43 ^b	61.40 ^c	63.23 ^a	61.15 ^b	60.09 ^c	64.02 ^a	62.54 ^b	63.24 ^c	62.85 ^a	61.44 ^b	62.01 ^c
	% Azul	7.18 ^a	9.11 ^b	10.16 ^c	7.74 ^a	8.93 ^b	9.16 ^c	7.61 ^a	8.95 ^b	9.46 ^c	7.01 ^a	7.03 ^a	7.13 ^a	8.04 ^a	8.43 ^b	8.37 ^b

CFT, compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/Kg); **AT**, antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido/Kg); **TC**, taninos condensados (mg catequina/Kg); **IC**, intensidad colorante (unidades absorbancia, u.a.); **To**, tonalidad. Valores con diferente letra entre fechas de muestreo, para cada variedad, fueron significativamente diferentes según el test LSD ($\alpha = 0.05$).

La Figura III.19 muestra el cociente entre el contenido fenólico medido en vinos y en los extractos de uva de las cinco variedades a lo largo del muestreo, lo que proporciona una idea del rendimiento de transferencia de los compuestos fenólicos de la uva al vino durante la maduración.

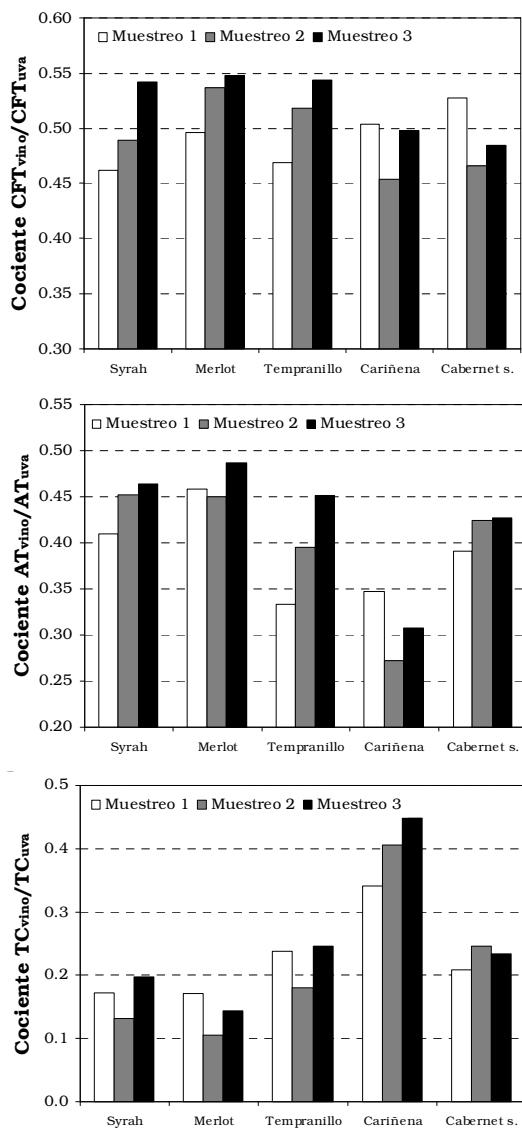


Figura III.19. Evolución de los cocientes de transferencia entre los compuestos fenólicos totales CFT (a), antocianos totales, AT (b) y taninos condensados, TC (c) de las uvas al vino para las cinco variedades de uva a lo largo del proceso de maduración.

Así, se puede observar que las cantidades de los tres compuestos fenólicos en el vino aumentaron a lo largo de la maduración de la uva.

Este comportamiento se debió, no sólo a la acumulación de compuestos fenólicos durante la maduración, sino también al incremento de su solubilidad.

Este incremento de la solubilidad se atribuyó, por una parte, al debilitamiento de la estructura de la pared celular de las pieles a medida que fue madurando la uva, lo cual favoreció la difusión de los compuestos fenólicos de las pieles dentro del vino (1,10) y, por otra, a la acumulación progresiva de azúcares. Ésta se tradujo en un contenido creciente de etanol tras la fermentación, proporcionando una mayor extracción de compuestos fenólicos de pieles y pepitas (96).

Correlación entre la composición de uva y vino

Para determinar si existía una correlación entre los parámetros fenólicos y cromáticos de las uvas y los de los correspondientes vinos, se construyó un modelo de regresión para cada parámetro estudiado mediante la representación de la respuesta en uva frente a la respuesta en vino.

Teniendo en cuenta el amplio rango de valores considerados para construir estos modelos (incluyendo 5 variedades diferentes de uva y 3 estados de maduración), los resultados desprendidos de este estudio se consideraron muy representativos.

Dado que las regresiones establecidas fueron lineales, el ajuste de los modelos de regresión fue evaluado no sólo por el coeficiente de correlación, sino también por el valor de LOL.

Como se muestra en la Tabla III.19, se observó una buena correlación entre la IC de los extractos de uva y los CFT y AT de los vinos, y viceversa. Así, los CFT y AT de los extractos de uva se correlacionaron muy significativamente con la IC de los vinos.

Tabla III. 19 Coeficientes de correlación entre los parámetros fenólicos y cromáticos de los extractos de uva y vinos

Uvas	Vinos									
	CFT	AT	TC	IC	To	% Amarillo	% Rojo	% Azul		
CFT	0.964***	0.917***	-0.462	0.885***	-0.167	-0.342	-0.122	0.730**		
AT	0.869***	0.976***	-0.729**	0.986***	-0.395	-0.548*	0.110	0.585*		
TC	0.670**	0.521*	0.092	0.476	-0.040	-0.153	-0.134	0.481		
IC	0.813***	0.942***	-0.761***	0.977***	-0.510*	-0.650**	0.239	0.485		
To	0.315	0.480	-0.526*	0.447	0.123	0.075	-0.198	0.271		
% Amarillo	0.262	0.434	-0.486	0.401	0.117	0.079	-0.175	0.221		
% Rojo	-0.444	-0.590*	0.630*	-0.557*	-0.124	-0.047	0.247	-0.406		
% Azul	0.662**	0.645**	-0.631*	0.636*	-0.066	-0.070	-0.289	0.656**		

CFT, compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico); **AT**, antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido); **TC**, taninos condensados (mg catequina) expresados por Kg de uvas y por litro de vino; **IC**, intensidad colorante (unidades de absorbancia, u.a.); **To**, tonalidad.
 * P<0.05; ** P<0.01; *** P<0.001

Por el contrario, se obtuvo una falta de correspondencia entre los contenidos de TC medidos en los extractos de uva y los medidos en los correspondientes vinos.

Este diferente comportamiento mostrado por los TC se atribuyó a la diferente cantidad y tipo de compuestos extraídos cuando las pepitas se trituran (tal y como sucede en la metodología de extracción acelerada propuesta en este estudio) respecto a cuando se mantienen intactas (como normalmente ocurre durante la vinificación).

Así pues, pudimos concluir que, de los parámetros fenólicos evaluados, los valores de TC no parecen adecuados para predecir la calidad del vino a través del método de extracción empleado.

Otra observación interesante fue el desajuste encontrado entre los valores de los parámetros cromáticos de los extractos de uva y los de los correspondientes vinos, a excepción de la IC. Esta divergencia pudo atribuirse al diferente pH de ambas soluciones (en los extractos el $\text{pH} < 2.0$ y en los vinos el $\text{pH} \approx 3.4$), lo cual afectó al equilibrio de los pigmentos que determinan su color (17).

Así pues, nos centramos en los parámetros fenólicos para predecir las propiedades de los vinos a partir de los extractos de uva, procediendo a evaluar los parámetros de regresión de los modelos obtenidos.

La Tabla III.20 muestra la pendiente e intercepto de las líneas de regresión, junto con el coeficiente de regresión (R^2), la linealidad (LOL %) y el error de predicción (RMSE %). Como puede verse, se obtuvieron buenos resultados de regresión excepto para los TC, como ya se ha comentado anteriormente.

Las pendientes de los diferentes modelos obtenidos proporcionaron información muy interesante. Así, los valores de la pendiente para los CFT (0.55) y los AT (0.62), sugirieron que la tasa de extracción de los CFT y AT de la uva durante el proceso de vinificación, fue del 55% y 62%, respectivamente.

Tabla III.20 Parámetros de regresión de los modelos construidos para el cálculo de las características del vino a partir del análisis del extracto de uva (n=15)

Extracto (x) vs. vino (y)	Pendiente ± I.C.	Intercepto ± I.C.	LOL (%)	R ²	RMSE (%)
CFT	0.55 ± 0.09	-79.14 ± 149.03	92.35	0.929	5.99
AT	0.62 ± 0.08	-152.87 ± 63.31	93.85	0.953	7.23
TC	0.02 ± 0.13	473.72 ± 331.77	-198.92	0.009	24.38
IC*	1.64 ± 0.21	-6.30 ± 2.24	93.94	0.954	7.58

CFT: Compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico); **AT:** Antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido); **TC:** Taninos condensados (mg catequina) expresados por kilogramo en uvas y por litro en vinos; **IC*:** Intensidad colorante (unidades de absorbancia: u.a.). **I.C.:** intervalos de confianza. **RMSE:** raíz del error cuadrático (en inglés, root mean square error), que representa el error de predicción de los parámetros de los vinos a partir del análisis de uva.

Por otra parte, el valor de la pendiente correspondiente a la IC (1.64) sugirió que la cantidad de color de los vinos obtenidos fue un 64% mayor que la cantidad de color medida en los extractos de uva.

Que los vinos presenten una IC mayor que los extractos de uva choca con el hecho de que en los vinos exista una menor concentración de antocianos totales que en los extractos. Esto es debido a que la IC se mide directamente en los extractos sin considerar su dilución, a diferencia de lo que ocurre con los antocianos totales que se cuantifican refiriéndolos al volumen de extracto obtenido, y recordemos que está ligeramente diluido con solución extractante para poder alcanzar un volumen exacto (200 ml).

La Figura III.20 muestra gráficamente los modelos de regresión entre los valores IC, CFT, AT y TC obtenidos de los extractos de uva y sus correspondientes vinos.

Para evaluar la capacidad predictiva de estos modelos, que era un aspecto sin resolver en este tipo de estudios, se calculó el error de predicción (RMSE %). Así pues, cuando se predijeron los resultados en vinos a partir de los valores determinados en las uvas, los valores de error de predicción obtenidos fueron de 5.99% para CFT, 7.23% para AT y 7.58% para IC.

A partir de estos resultados se pudo concluir que el método de extracción empleado en este estudio proporcionó extractos de uva adecuados para predecir los correspondientes parámetros en vinos (excepto para TC).

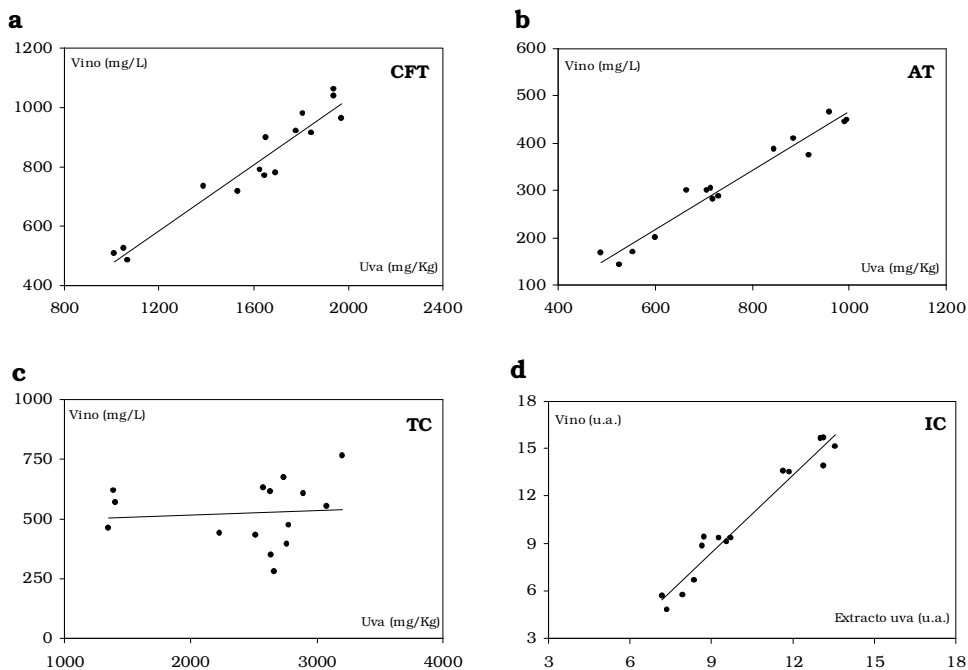


Figura III.20. Gráficos de regresión entre compuestos fenólicos totales, CFT (a); antocianos totales, TA (b); taninos condensados, TC (c) e intensidad colorante, IC (d) de los extractos de uva y vinos de 5 variedades de uva cosechadas en tres estados de maduración diferentes durante la campaña de 2009.

Caracterización de las uvas y vinos según su composición fenólica

Para poder observar gráficamente la existencia de diferencias entre variedades ligadas a los parámetros estudiados, se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Así, se establecieron relaciones entre 8 variables y 15 muestras (incluyendo 5 variedades y 3 estados de maduración).

La matriz de *loadings* obtenida a partir de PCA se presenta en la Tabla III.21.

Tabla III.21. Matriz de loadings del análisis de componentes principales (PCA)

Parámetros	Extractos de uva			Vinos		
	CP 1	CP 2	CP 3	CP 1	CP 2	CP 3
CFT	0.454	0.613	-0.646	0.788	0.472	-0.394
AT	0.155	0.660	0.732	0.459	-0.025	0.886
TC	0.878	-0.434	0.205	-0.409	0.881	0.237
IC	0.008	0.034	0.069	0.016	-0.004	0.031
To	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.001
% Amarillo	0.001	0.001	0.007	-0.002	0.005	-0.025
% Rojo	-0.002	-0.007	0.003	-0.001	-0.009	0.032
% Azul	0.001	0.007	-0.010	0.003	0.004	-0.007

CFT, compuestos fenólicos totales; **AT**, antocianos totales; **TC**, taninos condensados, **IC**, intensidad colorante; **To**, tonalidad.

Para los extractos de uva, los tres primeros componentes principales (CP's) explicaron el 99.99% de la variabilidad. El primer CP (CP 1) explicó el 93.02% de la variabilidad total y, dado que el *loading* más alto del CP 1 correspondió a los TC, se pensó que este parámetro fue el más determinante para distinguir entre las variedades de uva estudiadas.

Por su parte, el segundo CP (CP 2) explicó el 6.86% de la varianza acumulada, mientras que el tercer CP (CP 3) explicó el 0.12% de la varianza acumulada y, en ambos casos, se asociaron a los AT.

El gráfico de *scores* (Figura III.21) de los dos primeros CP's muestra que los parámetros fenólicos medidos en los extractos permitió diferenciar variedades de uva, a pesar de los distintos grados de maduración de la uva debidos a las diferentes fechas de vendimia.

Es decir, cada variedad tiene un balance diferente entre CFT, AT y TC que la hacen fácilmente distinguible, y que parece mantenerse a lo largo de la maduración, a la vista de las agrupaciones del gráfico de *scores*.

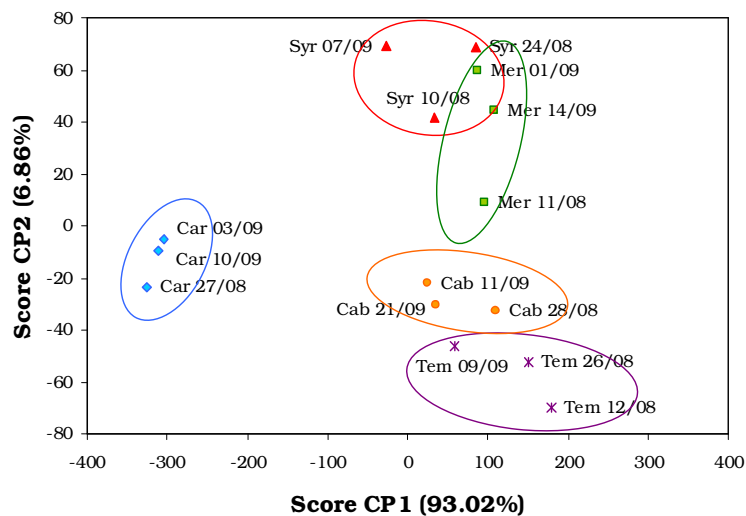


Figura III.21. Gráfico de los dos primeros CP's correspondiente a los parámetros medidos en los extractos de uva.

Respecto a los vinos, el PCA realizado muestra que los dos primeros PC's explicaron el 99.99% de la variabilidad (Figura III.22).

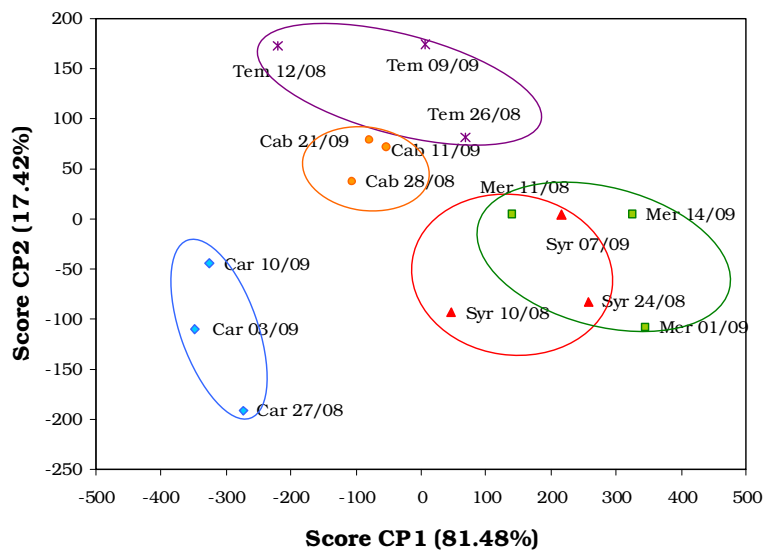


Figura III.22. Gráfico de los dos primeros CP's correspondiente a los parámetros medidos en los vinos

Concretamente, el CP 1 explicó el 81.48% de la variabilidad total, relacionado principalmente con los CFT, el CP 2 explicó el 17.42% de la

varianza acumulada, asociado principalmente con los TC, y el CP 3 explicó el 1.10% de la varianza acumulada y se asoció a los AT.

El gráfico de *scores* de los dos primeros componentes principales muestra de nuevo cómo la composición fenólica de los vinos permitió distinguir entre vinos monovarietales a pesar de los diferentes estados de maduración de la uva producidos por la fecha de vendimia. Además, podemos decir que, también en los vinos, la composición fenólica estuvo determinada por la variedad de uva y pareció mantenerse a lo largo de la maduración, a la vista de las agrupaciones del gráfico de *scores*.

Tanto en el caso de las uvas como de los vinos, las dos variedades más semejantes entre sí fueron la Syrah y la Merlot, mientras que la variedad más alejada del resto, y por tanto, la más diferente, fue la Cariñena.

III.4.4 Conclusiones

Tal y como ya se ha expuesto a lo largo de este trabajo, a partir de los resultados obtenidos a partir del estudio de comparación de los métodos de extracción Glories, ITV y AWRI, se concluye que:

- Desde el punto de vista analítico, las recuperaciones de los compuestos fenólicos obtenidos con cada uno de tres métodos estudiados no son comparables entre sí.
- A pesar de lo anterior, los modelos de regresión obtenidos para los compuestos fenólicos totales y antocianos totales analizados resultan útiles y adecuados para establecer correspondencias entre los diferentes métodos.
- Para demostrar la aplicación de estos buenos resultados de correlación, se ha comprobado que a partir de la medida de los compuestos fenólicos totales y antocianos totales en los extractos ITV y AWRI, se pueden predecir los índices de madurez fenólica de Glories (%EA y %MP) con una gran exactitud (con errores de predicción < 1% para ambos parámetros), lo que supone un ahorro de tiempo considerable en el futuro.

- Con el estudio de correlación realizado, bodegas y laboratorios de investigación enológica que utilicen estas diferentes metodologías para evaluar la madurez fenólica, podrán cotejar su información con la del resto.

Respecto al estudio de optimización del método de extracción de los compuestos fenólicos se concluye que:

- El empleo de distintos equipos homogenizadores no ha supuesto diferencias significativas sobre el recuento de compuestos fenólicos, por lo que será cada laboratorio el que decida cuál considera más conveniente para trabajar, en términos de coste, facilidad de manejo y limpieza.
- Aumentando la temperatura de maceración se consigue disminuir el tiempo que dura este proceso. Con el fin de no modificar la composición inicial de la muestra por efecto del calor, las condiciones óptimas se han conseguido macerando a 40°C durante 15 minutos.
- Se puede llevar a cabo la comparación de antocianos totales entre el método de Ribéreau-Gayon-Stonestreet y el de Puissant-Léon aplicando una corrección sobre su fórmula original.

Respecto al estudio realizado sobre la conservación de muestras se llega a las siguientes conclusiones:

- Hay que evitar trabajar con uvas que no sean frescas (sea cual sea el método de conservación empleado), dada la escasa fiabilidad de los resultados que éstas proporcionan.
- Si no se dispone de tiempo suficiente para analizar el extracto obtenido el mismo día, se puede conservar de manera controlada hasta el momento del análisis, ya que éste aporta toda la información de la uva fresca, tanto en términos de concentración de polifenoles como en facilidad para ser extraídos.
- En cuanto al método de conservación se refiere, los extractos congelados se han mostrado más estables en el tiempo que los refrigerados, por tanto, la

congelación de los extractos (y no de las uvas) es el procedimiento correcto para conservar las características de las muestras.

Del estudio de correlación entre las características cromáticas y la composición fenólica de las uvas y vinos, se concluye que:

- Con el método optimizado de extracción de las uvas ha sido posible obtener muy buenas correlaciones entre los parámetros fenólicos de los extractos de uva y sus correspondientes vinos. Concretamente la intensidad colorante (IC), los compuestos fenólicos totales (CFT) y los antocianos totales (AT) han demostrado predecir bien los mismos parámetros en el vino, con errores de predicción < 8%.
- La creación de buenos modelos de regresión, obtenidos a partir de relaciones directas entre los compuestos fenólicos de la uva y el vino, ha supuesto una herramienta analítica interesante para poder fijar la fecha de vendimia mediante la predicción de la calidad del vino a partir de los análisis de uva.

III.5 Bibliografía

- (1) Ribéreau-Gayon P, Glories Y, Maujean A, Dubourdieu D. Handbook of enology, Vol 2. The chemistry of wine, stabilization and treatments. Chichester: John Wiley & Sons; 1999.
- (2) Junquera B, Diez C. Los índices de madurez y su insuficiencia para establecer el momento óptimo de vendimia. *Semana Vitivinícola* 1986; 4: 4945-4947.
- (3) Chirivella C, Haba M, Perez A. Evolución de los ácidos orgánicos durante el periodo de maduración de la uva. *Vitivinicultura* 1992; 7-8: 52-55.
- (4) Hellman, EW. Evaluation of winegrape maturity. Oregon Viticulture. 1st ed. Corvallis: Oregon State University Press; 2003.
- (5) Zamora Marín F. Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. Madrid: A. Madrid Vicente; 2003.
- (6) Pérez-Magariño S, González-San José ML. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry* 2006 5; 96: 197-208.
- (7) Cagnasso E, Rolle L, Caudana A, Gerbi V. Relationship between grape phenolic maturity and red wine phenolic composition. *Italian Journal of Food Science* 2008; 2: 365-380.
- (8) Mattivi F, Prast A, Nicolini G, Valenti L. Il potenziale polifenolico delle uve rosse e la sua applicazione in enologia. *L'Enologo* 2003; 39: 105-114.
- (9) Glories Y, Augustin M. Maturité phénolique du raisin, conséquences technologiques: application aux millésimes 1991 et 1992. *Proceedings Colloque Journée Technique du CIVB* 1993: 56-61.
- (10) Saint-Cricq N, Vivas N, Glories Y. Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue Française d'Oenologie* 1998; 173: 22-25.
- (11) Saint-Cricq N, Vivas N, Glories Y. Maturation phénolique des raisins rouges. Relation avec la qualité des vins. Comparaison des cépages Merlot et Tempranillo. *Progrès Agricole et Viticole* 1998; 115: 306-318.
- (12) Glories Y. Caractérisation du potentiel phénolique: adaptation de la vinification. *Progrès Agricole et Viticole* 2001; 118: 347-350.
- (13) Celotti E, De Prati GC. The phenolic quality of red grapes at delivery: Objective evaluation with colour measurements. *South African Journal for Enology and Viticulture* 2005; 26: 75-82.

- (14) Mateos S, Valls J, Nadal M, Arola L. Estudio de la madurez fenólica sobre diferentes variedades tintas y su relación con el color de los vinos. *Tecnología del vino* 2001; 2: 45-50.
- (15) Barceló JM. La gestion de la maturation: le premier acte œnologique. Incidence sur les profils de vins de Syrah dans les Côtes du Rhône. *Revue Française d'Oenologie* 1997; 165: 24-26.
- (16) Río-Segade S, Soto-Vázquez E, Díaz-Losada E. Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis* 2008 12; 2: 599-607.
- (17) Kontoudakis N, Esteruelas M, Fort F, Canals J, Zamora F. Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes: Correlation between predicted and obtained parameters. *Analytica Chimica Acta* 2010; 660: 127-133.
- (18) González-Neves G, Gil G, Ferrer M. Effect of different vineyard treatments on the phenolic contents in Tannat (*Vitis vinifera* L.) grapes and their respective wines. *Food Science and Technology International* 2002; 8: 315-321.
- (19) González-Neves G, Charamelo D, Balado J, Barreiro L, Bochicchio R, Gatto G, et al. Phenolic potential of Tannat, Cabernet-sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Analytica Chimica Acta* 2004; 513: 191-196.
- (20) González-Neves G, Gil G, Ferrer M, Charamelo D, Balado J, Bochicchio R. Prediction of the colour and polyphenolic composition of the young red wines from the phenolic potential of the grapes. *International Journal of Food Science and Technology* 2010; 45: 1843-1851.
- (21) Romero-Cascales I, Ortega-Regules A, López-Roca JM, Fernández-Fernández JI, Gomez-Plaza E. Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *American Journal of Enology and Viticulture* 2005; 56: 212-219.
- (22) Bautista-Ortín AB, Fernández-Fernández JI, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. The effect of grape ripening stage on red wine color. *Journal International des Science de la Vigne et du Vin* 2006; 40: 15-24.
- (23) Torchio F, Cagnasso E, Gerbi V, Rolle L. Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas. *Analytica Chimica Acta* 2010; 660: 183-189.
- (24) Vivas-De Gauleac N, Nonier MF, Guerra C, Vivas N. Anthocyanin in grape skins during maturation of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet sauvignon and Merlot noir from different Bordeaux terroirs. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 2001; 35: 149-156.

- (25) Frago S, Mestres M, Busto O, Guasch J. Comparison of three extraction methods used to evaluate phenolic ripening in red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 4071-4076.
- (26) Nadal M. Phenolic maturity in red grapes. In: *Methodologies and results in grapevine research*. New York: Springer; 2010. p 389-409.
- (27) Lamadon F. Protocole pour l'évaluation de la richesse polyphénolique des raisins. *Revue Française d'Oenologie* 1995; 76: 37-38.
- (28) De La Hera-Orts, ML, Martínez-Cutillas A, López-Roca JM, Gómez-Plaza E. Effect of moderate irrigation on grape composition during ripening. *Spanish Journal of Agricultural Research* 2005; 3: 352-361.
- (29) Dupuch V. Appréciation de la matière phélique des vins rouges; application à la détermination de la date de récolte. *Proceedings Colloque Journée Technique du CIVB* 1993:62-69.
- (30) Cayla L, Cottureau P, Renard R. Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. Standard. *Revue Française d'Oenologie* 2002; 193: 10-16.
- (31) Frago S, Mestres M, Busto O, Guasch J. Estudio y optimización de un método analítico para la estimación de los parámetros de madurez fenólica de uvas tintas. *Enologos* 2009; 58: 38-43.
- (32) Dupuch V. Maturité phénolique et date de récolte: les apports de la méthode "CASV". *Actes de colloque Journée Technique "Les composés phénoliques"*, 8 Juillet; Blanquefort; 1998.
- (33) Cayla L, Favarel JL, Davaux F. Methodologie d'estimation des composés phénoliques: application aux cépages rouges de Midi-Pyrénées. *Actes de colloque Journée Technique "Cinquantième ITV France" 8 Juillet*; 1998.
- (34) Roson JP, Baudel J, Moutounet M. Composition des raisins en anthocyanes et en tanins et qualité de la vendange. Application au vignoble de Cahors. *Prògres Agricole et Viticole* 1988; 105: 569-573.
- (35) Bourzeix M, Dubernet MO, Heredia N. Sur l'extraction de divers constituants phénoliques des raisins et de leur rafles. *Industries Alimentaires et Agricoles* 1975; 9: 1057-1064.
- (36) Bourzeix M, Weyland D, Heredia N. Étude des catéchines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres dérivés de la vi. *Bulletin de l'O.I.V.* 1986; 669-670: 1175-1254.
- (37) Giovanelli G, Brenna O. Evolution of some phenolic components, carotenoids and chlorophylls during ripening of three Italian grape varieties. *European Food Research and Technology* 2007; 225: 145-150.

(38) Celotti E, Della Vedova T, Ferrarini R, Martinand S. The use of reflectance for monitoring phenolic maturity curves in red grapes. *Italian Journal of Food Science* 2007; 19: 91-100.

(39) Celotti E, Carcereri De Patri G, Fiorini P. Modern approach to the red grape quality management. www.infowine.com - *Internet Journal of Viticulture and Enology* 2008; 1: 1-17.

(40) Cromoenos: <http://bioenos.com/cromoenos/index.php>

(41) Vanini LS, Hirata TA, Kwiatkowski A, Clemente E. Extraction and stability of anthocyanins from the Benitaka grape cultivar (*Vitis vinifera* L.). *Brazilian Journal of Food Technology* 2009; 12: 213-219.

(42) Revilla E, Ryan J, Martin-Ortega G. Comparison of several procedures used for the extraction of anthocyanins from red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998; 46: 4592-4597.

(43) Iland PG, Cynkar W, Francis IL, Williams PJ, Coombe BG. Optimisation of methods for the determination of total and red-free glycosyl glucose in black grape berries of *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 1996; 2: 171-178.

(44) Iland P, Bruer N, Wilkes E, Edward G. Anthocyanins (colour) and total phenolics of grape berries. In: *Chemical Analysis of Grapes and Wine: Techniques and Concepts*. 1ª ed.: Winetitles; 2004. p. 44-48.

(45) Cynkar WU, Cozzolino D, Dambergs RG, Janik L, Gishen M. The effects of homogenisation method and freezing on the determination of quality parameters in red grape berries of *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2004; 10: 236-243.

(46) Gishen M, Dambergs RG, Cozzolino D. Grape and wine analysis - enhancing the power of spectroscopy with chemometrics. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2005; 11: 296-305.

(47) Sarneckis CJ, Dambergs RG, Jones P, Mercurio M, Herderich MJ, Smith PA. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2006; 12: 39-49.

(48) Mercurio M, Dambergs R, Herderich M, Smith P. High throughput analysis of red wine and grape Phenolics - Adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified Somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; 55: 4651-4657.

(49) Mattivi F. Gli indici di maturazione delle uve e la loro importanza. *Quaderni di Scienze Viticole ed Enologiche dell'Università di Torino* 2006; 28: 27-40.

- (50) Cagnasso E, Caudana A, Rolle L, Gerbi V. Valutazione delle potenzialità fenoliche di uve rosse piemontesi. *Quaderni di Scienze Viticole ed Enologiche dell'Università di Torino* 2006; 28: 61-73.
- (51) Jensen JS, Blachez B, Egebo M, Meyer AS. Rapid extraction of polyphenols from red grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* 2007; 58: 451-461.
- (52) Franco E, Iñiguez M. Estudio de la relación entre el color de la uva tinta y el color del vino. *Viticultura y Enología Profesional* 1999; 63: 23-34.
- (53) Iñiguez M. Avance técnico aplicado al tratamiento de las uvas para la extracción de color y posterior medición- Automatizado- Resultados Vendimia 2000. 24-25 Abril 2001; MAPA Madrid (España); 2002.
- (54) Hrazdina G, Parsons GF, Mattick LR. Physiological and biochemical events during development and maturation of grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture* 1984; 35: 220-227.
- (55) Balík J, Kumsta M. Evaluation of colour content in grapes originating from South Moravia. *Czech Journal of Food Science* 2008; 26, Special Issue: S18-S24.
- (56) Celotti E, Peterlunger E, Battistuta F, Zironi R. Phenolic and aromatic maturity as instruments for evaluating the training system: the case of Sauvignon in Friuli. *Proceedings of Eleventh GESCO; Sicilia* 6-12 Giugno, 1999; 568-576.
- (57) Riou V, Asselin C. Potentiel Polyphénolique disponible du raisin. Estimation rapide par extraction partielle à chaud. *Prògres Agricole et Viticole* 1996; 113: 382-384.
- (58) Delgado R, Martin P, Del Alamo M, Gonzalez M. Changes in the phenolic composition of grape berries during ripening in relation to vineyard nitrogen and potassium fertilisation rates. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2004; 84: 623-630.
- (59) Kennedy J, Hayasaka Y, Vidal S, Waters E, Jones G. Composition of grape skin proanthocyanidins at different stages of berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 5348-5355.
- (60) Kennedy JA, Matthews MA, Waterhouse AL. Effect of maturity and vine water status on grape skin and wine flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture* 2002; 53: 268-274.
- (61) Gunata Z, Pinau J, Cordonnier R. Détermination de la qualité de la vendange par sa richesse en composés phénoliques. Applications à la vinification. *Revue Française d'Oenologie* 1987; 107: 7-13.
- (62) Mancini P, Bonaccorsi R. Valutazione qualitativa delle uve rosse di Toscana in relazione al tenore dei composti polifenolici. *L'Enotecnico* 1990; 3: 81-86.

- (63) Carbonneau A, Leglise N. Extraction rapide et complète des polyphénols des pellicules de raisin. *GESCO (Groupement d'études de systèmes de conduite)* 1981; n° 2.
- (64) González-San José ML, Di Stefano R. Fattori che condizionano la stabilità degli antociani in soluzione (1º contributo). *Rivista di Viticoltura e di Enologia* 1990; 3: 63-68.
- (65) Falcao LD, Chaves ES, Burin VM, Falcao AP, Gris EF, Bonin V, et al. Maturity of Cabernet sauvignon berries from grapevines grown with two different training systems in a new grape growing region in Brazil. *Ciencia e Investigación Agraria* 2008; 35: 271-282.
- (66) Fournand D, Vicens A, Sidhoum L, Souquet J, Moutounet M, Cheynier V. Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54: 7331-7338.
- (67) Spagna G, Barbagallo RN, Todaro A, Durante MJ, Pifferi PG. A method for anthocyanins extraction from fresh grape skin. *Italian Journal of Food Science* 2003; 15: 337-346.
- (68) Venencie C, Uveira MN, Guiet S. Maturité polyphénolique du raisin mise en place d'une méthode d'analyse de routine. *Revue Française d'Oenologie* 1997; 167: 36-41.
- (69) Venencie C, Videau B, Michel D. Contrôle maturité: analyse des pellicules ou des baies entières? *Revue Française d'Oenologie* 1998; 169: 13-15.
- (70) Morais H, Ramos C, Forgács E, Cserhádi T, Oliviera J. Influence of storage conditions on the stability of monomeric anthocyanins studied by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 2002; 770: 297-301.
- (71) Gris EF, Burin VM, Brighenti E, Vieira H, Bordignon-Luiz MT. Phenology and ripening of *Vitis vinifera* L. grape varieties in Sao Joaquim, southern Brazil: a new South American wine growing region. *Ciencia e Investigación Agraria* 2010; 37: 61-75.
- (72) Izcara E, González-San José ML. Análisis de métodos rápidos de extracción para seguir la madurez fenólica de la uva. *Enólogos* 2001; 14: 14-18.
- (73) Pérez-Magariño S, González-San José ML. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry* 2006; 96: 197-208.
- (74) Pirie A, Mullins MG. Interrelationships of sugars, anthocyanins, total phenols and dry weight in the skin of grape berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* 1977; 28: 204-209.

- (75) Pirie A, Mullins MG. Changes in anthocyanin and phenolics content of grapevine leaf and fruit tissues treated with sucrose, nitrate, and abscisic acid. *Plant Physiology* 1976; 58: 468-472.
- (76) Roggero J, Coen S, Ragonne B. High-performance liquid-chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. *American Journal of Enology and Viticulture* 1986; 37: 77-83.
- (77) Vian M, Tomao V, Coulomb P, Lacombe J, Dangles O. Comparison of the anthocyanin composition during ripening of Syrah grapes grown using organic or conventional agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54: 5230-5235.
- (78) González-San José M, Barron L, Díez C. Evolution of anthocyanins during maturation of Tempranillo grape variety (*Vitis vinifera*) using polynomial regression-models. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1990; 51: 337-343.
- (79) González-San José M, Díez C. Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries. *Food Chemistry* 1992; 43: 193-197.
- (80) Mateus N, Machado JM, De Freitas V. Development changes of anthocyanins in *Vitis vinifera* grapes grown in the Douro Valley and concentration in respective wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2002; 82: 1689-1695.
- (81) Mazza G, Fukumoto L, Delaquis P, Girard B, Ewert B. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1999; 47: 4009-4017.
- (82) Zhao Q, Duan CQ, Wang J. Anthocyanins profile of grape berries of *Vitis amurensis*, its hybrids and their wines. *International Journal of Molecular Sciences* 2010; 11: 2212-2228.
- (83) Mori K, Sugaya S, Gemma H. Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae* 2005; 105: 319-330.
- (84) Liang Z, Wu B, Fan P, Yang C, Duan W, Zheng X, et al. Anthocyanin composition and content in grape berry skin in *Vitis* germplasm. *Food Chemistry* 2008; 111: 837-844.
- (85) Agati G, Meyer S, Matteini P, Cerovic Z. Assessment of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera* L.) berries using a noninvasive chlorophyll fluorescence method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; 55: 1053-1061.
- (86) Di Stefano R, Cravero MC. Metodi per lo studio dei polifenoli dell'uva. *Rivista di Viticoltura e di Enologia* 1991; 2: 37-44.

- (87) Ummarino I, Ferrandino A, Cravero MC, Di Stefano R. Evaluazione dei polifenoli di uve di biotipi di Pinot nero durante la maturazione. *L'Enologo* 2001; 4: 71-82.
- (88) Muñoz S, Mestres M, Busto O, Guasch J. Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of different standards. *Analytica Chimica Acta* 2008; 628: 104-110.
- (89) Ribéreau-Gayon P. Evolution des composés phénoliques au cours de la maturation du raisin. I. Expérimentation 1969. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 1971; 5: 247-261.
- (90) Aubert S, Poux C. Extraction des composés phénoliques du raisin. Technique d'estimation d'une vendange. *Annales de Technologie Agricole* 1969; 18: 93-109.
- (91) Mattivi F, Prast A, Nicolini G, Valenti L. Validazione di un nuovo metodo per la misura del potenziale polifenolico delle uve rosse e discussione del suo campo di applicazione in enologia. *Rivista di Viticoltura e di Enologia* 2002; 55: 55-74.
- (92) Mattivi F, Prast A, Nicolini G, Valenti L. Il potenziale polifenolico delle uve rosse e la sua applicazione in enologia. *L'Enologo* 2003; 39: 105-114.
- (93) Harbertson JF, Kennedy JA, Adams DO. Tannin in skins and seeds of Cabernet sauvignon, Syrah, and Pinot noir berries during ripening. *American Journal of Enology and Viticulture* 2002; 53: 54-59.
- (94) Peyron D. Le potentiel polyphénolique du Pinot noir. *Revue Française d'Oenologie* 1998; 170: 42-45.
- (95) Amrani-Joutei K, Glories Y. Étude en conditions modèles de l'extractibilité des composés phénoliques des pellicules et des pépins de raisins rouges. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 1994; 28: 303-317.
- (96) Canals R, Llaudy MC, Valls J, Canals JM, Zamora F. Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 4019-4025.
- (97) Brossaud F, Cheynier V, Noble AC. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2001; 7: 33-39.
- (98) Margheri G, Tonon D, Pellegrini R, Sartori G. Correlazione tra la composizione biochimica dell'uva, le tecniche di vinificazione e la qualità dei vini. *L'Enotecnico* 1985; 21: 1129-1134.
- (99) Roson JP, Moutounet M. Quantités d'anthocyanes et de tanins des raisins de quelques cépages du Sud-Ouest en 1988 et 1989. *Revue Française d'Oenologie* 1992; 135: 17-27.

- (100) Saint-Cricq N, Vivas N, Glories Y. Apports récents à l'interprétation des critères de la qualité des vins rouges. *Revue Française d'Oenologie* 1998; 169: 19-25.
- (101) Downey M, Harvey J, Robinson S. Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2003; 9: 15-27.
- (102) Monagas M, Núñez V, Bartolomé B, Gómez-Cordovés C. Phenolic content of blends of Tempranillo with Graciano or Cabernet sauvignon wines produced in Spain. *Food Technology and Biotechnology* 2006; 44: 507-513.
- (103) Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Jakobek L, Seruga M. Influence of solvent and temperature on extraction of phenolic compounds from grape seed, antioxidant activity and colour of extract. *International Journal of Food Science and Technology* 2009; 44: 2394-2401.
- (104) Bucic-Kojic A, Planinic M, Tomas S, Bilic M, Velic D. Study of solid-liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering* 2007; 81: 236-242.
- (105) Palma M, Taylor LT. Extraction of polyphenolic compounds from grape seeds with near critical carbon dioxide. *Journal of Chromatography A* 1999; 849: 117-124.
- (106) Ahn HS, Jeon TI, Lee JY, Hwang SG, Lim Y, Park DK. Antioxidative activity of persimmon and grape seed extract: *in vitro* and *in vivo*. *Nutrition Research* 2002; 22: 1265-1273.
- (107) Jayaprakasha GK, Singh RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chemistry* 2001; 73: 285-290.
- (108) Jayaprakasha GK, Selvi T, Sakariah KK. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *Food Research International* 2003; 36: 117-122.
- (109) Baydar NG, Özkan G, Sagdiç O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* 2004; 15: 335-339.
- (110) Ribéreau-Gayon P, Stonestreet E. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin de la Société de Chimie* 1965; 9: 2649-2652.
- (111) Glories Y. La maturità fenolica delle uve: primo parametro da controllare per una corretta vinificazione in rosso. *Vignevine* 1999; 3: 46-50.
- (112) Ribéreau-Gayon P. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique* 1970; 52: 627-631.

(113) Vivas N. Les composés phénoliques & l'élaboration des vins rouges. Bordeaux: Éditions Féret; 2007.

(114) Puissant A, Léon H. La matière colorante des grains de raisins de certains cépages cultivés en Anjou en 1965. *Annales de Technologie Agricole* 1967; 6: 217-225.

(115) Jensen JS, Demiray S, Egebo M, Meyer AS. Prediction of wine color attributes from the phenolic profiles of red grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56: 1105-1115.

(116) BIOENOS SL. Análisis del color probable y de la madurez fenólica de la uva. http://bioenos.com/PPT/CROMOENOS_WEB.ppt

(117) Cacace J, Mazza G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 2003; 59: 379-389.

(118) Spigno G, Favari D. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering* 2007; 78: 793-801.

(119) Glories Y. La couleur des vins rouges. 2e Partie: mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 1984; 4: 253-271.

(120) Hidalgo-Togores J. Tratado de enología. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2003.

(121) Auw J, Blanco V, O'Keefe S, Sims C. Effect of processing on the phenolics and color of Cabernet Sauvignon, Chambourcin, and noble wines and juices. *American Journal of Enology and Viticulture* 1996; 47: 279-286.

(122) Ruiz-Hernández M, Ruiz-Pedreira M, Ruiz-Pedreira A, Ruiz-Pedreira C. Tratado de vinificación en tinto. Madrid: AMV Ediciones; 2004.

(123) Resolución de 7 de abril de 2009. Boletín Oficial del Estado de 20 de mayo de 2009, 122: 42364-42370.

(124) Resolución de 17 de abril de 2009, Boletín Oficial del Estado de 3 de junio de 2009, 134: 47145-47155.

(125) Sudraud P. Interpretation des courbes d'absorption des vins rouges. *Annals de Technologie Agricole* 1958; 7: 203-208.

(126) Blouin J. Techniques d'analyses des moûts et des vins. Paris: Dujardin-Salleron; 1992.

(127) Blouin J, Cruège J. Analyse et composition des vins: comprendre le vin. Paris: Dunod; 2003.

- (128) Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Vol.1. (Method OIV-MA-AS2-10). Paris: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (O.I.V.); 2011.
- (129) Singleton VL, Rossi JA, Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 1965; 16: 144-158.
- (130) Métodos oficiales de análisis. Madrid: Secretaría General Técnica. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación; 1994.
- (131) García-Cazorla J, Xirau-Vayreda M, Azorín-Romero R. Técnicas usuales de análisis en enología. Panreac Química, S.A.; 2005.
- (132) Reglamento (CEE) 2676/90. Oficina de Publicaciones Oficiales de las Comunidades Europeas, 17 de septiembre de 1990.
- (133) Hemingway RW, Karchesy JJ, Branham SJ. Chemistry and significance of condensed tannins. New York: Plenum Press; 1989.
- (134) Waterhouse AL. Determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry* 2002; Supplement 6: II.1.1-II.1.8.
- (135) Legler G, Müller-Platz CM, Mentges-Hettkamp M, Pflieger G, Jülich E. On the chemical basis of the Lowry protein determination. *Analytical Biochemistry* 1985; 150: 278-287.
- (136) Moutounet M. Dosage des polyphénols des moûts de raisin. *Connaissance de la Vigne et du Vin* 1981; 15: 287-301.
- (137) Bonder C, Silvestre R. Pratiquer les contrôles analytiques en œnologie. Paris: Educagri; 2005.
- (138) Orden APA/2773/2002 de 24 de octubre. Boletín Oficial del Estado de 8 de noviembre de 2002, 268: 39636-39643.
- (139) Orden ARM/4004/2008, de 23 de diciembre. Boletín Oficial del Estado de 24 de enero de 2009, 21: 8597-8599.
- (140) Organisation Internationale de la Vigne et du Vin. Bulletin de l'O.I.V. Mars-Avril 2003; 76: 865-866.
- (141) Kyoung CO, Kim D. Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums. *Food Research International* 2004; 37: 337-342.
- (142) De Beer D, Harbertson J, Kilmartin P, Roginsky V, Barsukova T, Adams D. Phenolics: A comparison of diverse analytical methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 2004; 55: 389-400.

(143) Brouillard R, Chassaing S, Fougerousse A. Why are grape/fresh wine anthocyanins so simple and why is it that red wine color lasts so long? *Phytochemistry* 2003; 64: 1179-1186.

(144) Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis. Vol.2. (Method OIV-MA-AS315-11) Paris: Organisation Internationale de la Vigne et du Vin (O.I.V.); 2011.

(145) Lamuela-Raventós R, Waterhouse AL. A direct HPLC separation of wine phenolics. *American Journal of Enology and Viticulture* 1994; 45: 1-5.

(146) Sun B, Leandro MC, De Freitas V, Spranger MI. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 2006; 1128: 27-38.

(147) Heier A, Blaas W, Dross A, Wittkowski R. Anthocyanin analysis by HPLC/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture* 2002; 53: 78-86.

(148) Bonerz D, Nikfardjam M, Creasy G. A new RP-HPLC method for analysis of polyphenols, anthocyanins, and indole-3-acetic acid in wine. *American Journal of Enology and Viticulture* 2008; 59: 106-109.

(149) Kosir L, Lapornik B, Andresek S, Wondra A, Vrhovsek U, Kidric J. Identification of anthocyanins in wines by liquid chromatography, liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. *Analytica Chimica Acta* 2004; 513: 277-282.

(150) Wang H, Race E, Shrikhande A. Anthocyanin transformation in Cabernet Sauvignon wine during aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 7989-7994.

(151) De Villiers A, Vanhoenacker G, Majek P, Sandra P. Determination of anthocyanins in wine by direct injection liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry and classification of wines using discriminant analysis. *Journal of chromatography A* 2004; 1054: 195-204.

(152) Nyman N, Kumpulainen J. Determination of anthocyanidins in berries and red wine by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 4183-4187.

(153) Garcia-Beneytez E, Cabello F, Revilla E. Analysis of grape and wine anthocyanins by HPLC-MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 5622-5629.

(154) Paronetto L. Polifenoli e tecnica enologica. Milán: Selepress; 1977.

(155) Harbertson JF, Picciotto EA, Adams DO. Measurement of polymeric pigments in grape berry extract and wines using a protein precipitation assay combined with bisulfite bleaching. *American Journal of Enology and Viticulture* 2003; 54: 301-306.

- (156) Singleton VL. Analytical fractionation of the phenolic substances of grapes and wine and some practical uses of such analyses. *Chemistry of Winemaking*: A.D. Webb, ACS Advances in Chemistry Series; 1974. p. 184-211.
- (157) Makkar H, Blummel M, Becker K. Formation of complexes between polyvinyl pyrrolidones or polyethylene glycols and tannins, and their implication in gas-production and true digestibility in *in-vitro* techniques. *The British Journal of Nutrition* 1995; 73: 897-913.
- (158) Makkar H, Blummel M, Borowy N, Becker K. Gravimetric-determination of tannins and their correlations with chemical and protein precipitation methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1993; 61: 161-165.
- (159) Moya H, Dantoni P, Rocha F, Coichev N. A multicommuted flow-system for spectrophotometric determination of tannin exploiting the Cu (I)/BCA complex formation. *Microchemical Journal* 2008; 88: 21-25.
- (160) Hagerman A, Butler L. Protein precipitation method for quantitative-determination of tannins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1978; 26: 809-812.
- (161) Braga A, Cosme F, Laureano O. Gelatine, casein and potassium caseinate as distinct wine fining agents: Different effects on colour, phenolic compounds and sensory characteristics. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 2007; 41: 203-214.
- (162) Llaudy MC, Canals R, Canals J, Rozes N, Arola L, Zamora F. New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52: 742-746.
- (163) De Freitas V, Mateus N. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 940-945.
- (164) Herderich MJ, Smith PA. Analysis of grape and wine tannins: Methods, applications and challenges. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2005; 11: 205-214.
- (165) Nollet, LML. Handbook of food análisis, vol. 77. New Cork: Marcel Dekker, 2004.
- (166) Asquith T, Butler L. Use of dye-labeled protein as spectrophotometric assay for protein precipitants such as tannin. *Journal of Chemical Ecology* 1985; 11: 1535-1544.
- (167) Mercurio M, Smith P. Tannin quantification in red grapes and wine: Comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2008; 56: 5528-5537.

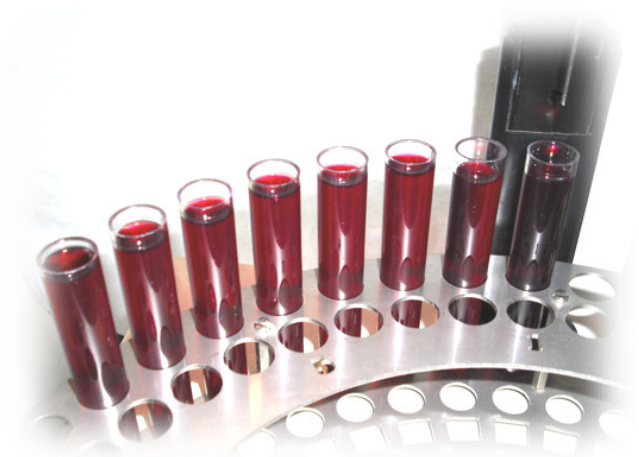
- (168) Adams D, Harbertson J. Use of alkaline phosphatase for the analysis of tannins in grapes and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 1999; 50: 247-252.
- (169) Llaudy Fernández MdC, Canals i Bosch JM, Zamora Marín F. Tesis doctoral: Contribución al estudio de los factores que afectan la astringencia del vino tinto; 2006. Facultat d'Enologia, Universitat Rovira i Virgili (Tarragona).
- (170) Ribéreau-Gayon J, Stonestreet E. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Analytique* 1966; 48: 188-196.
- (171) Porter L, Hrstich L, Chan B. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 1986; 25: 223-230.
- (172) Sun B, Spranger I. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1998; 46: 4267-4274. (173) Broadhurst R, Jones W. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 1978; 29: 788-794.
- (174) Inoue K, Hagerman A. Determination of gallotannin with Rhodanine. *Analytical Biochemistry* 1988; 169: 363-369.
- (175) Wilson T, Hagerman A. Quantitative-determination of ellagic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1990; 38: 1678-1683.
- (176) Hartzfeld P, Forkner R, Hunter M, Hagerman A. Determination of hydrolyzable tannins (gallotannins and ellagitannins) after reaction with potassium iodate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50: 1785-1790.
- (177) Cuadros-Rodríguez L, García-Campaña AM, Bosque-Sendra JM. Statistical estimation of linear calibration range. *Analytical Letters* 1996; 29: 1231-1239.
- (178) Boque R, Rius FX. Straight line calibration: Something more than slopes, intercepts, and correlation coefficients. *Journal of Chemical Education* 1994; 71: 230-232.
- (179) Perestrelo R, Fernandes A, Albuquerque FF, Marques JC, Câmara JS. Analytical characterization of the aroma of Tinta Negra Mole red wine: Identification of the main odorants compounds. *Analytical Chimica Acta* 2006; 563: 154-164.
- (180) Martens H, Naes, T. Multivariate calibration. Chichester: Wiley, 1989.
- (181) Massart DL. Chemometrics: a textbook. Amsterdam: Elsevier, 1988.
- (182) Bisquerra-Alzina R. Introducción conceptual al análisis multivariable: un enfoque informático con los paquetes SPSS-X, BMDP, LISREL y SPAD. Barcelona: Promociones Publicaciones Universitarias, 1989.

- (183) Amrani-Joutei K, Glories Y. Tanins et anthocyanes: localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Revue Française d'Oenologie* 1995; 153: 28-31.
- (184) Cacace J, Mazza G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 2003; 59: 379-389.
- (185) Cacace J, Mazza G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *Journal of Food Science* 2003; 68: 240-248.
- (186) Guerra MT, Sánchez-Ramos MI, González-Huerta DC, Santos-Buelga C, Rivas-Gonzalo JC. Comparación de los resultados obtenidos en vinificaciones realizadas con uvas frescas y congeladas. *XVIII Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros: Almendralejo, 6-10 de Mayo de 1996; 1997: 379-388.*
- (187) Ryan J, Revilla E. Anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2003; 51: 3372-3378.
- (188) Jackson RS. Wine science. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2008.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

CAPÍTULO IV

Control de la maduración fenólica de la uva y la vinificación en tinto mediante FT-MIR



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

IV.1 Espectroscopia de infrarrojo

En la medida que la calidad del vino tinto está directamente relacionada con su color y composición fenólica, y que estos parámetros, a su vez, dependen del proceso de elaboración seguido, se hace evidente la necesidad de un control riguroso de este proceso: Éste comienza con el inicio de la maduración de la uva, continúa con la extracción durante la vinificación, y finaliza con el embotellado del vino terminado y su posterior almacenamiento.

Dado que los habituales métodos de análisis de los compuestos fenólicos, basados en medidas de absorbancia, resultan poco prácticos para realizar un seguimiento continuo del proceso por la cantidad de analíticas necesarias y por el limitado tiempo para llevarlas a cabo, el sector del vino demanda una técnica analítica rápida y versátil que dé solución a este problema.

La técnica de la espectroscopia de infrarrojo (IR, del acrónimo en inglés *infrared*) presenta múltiples ventajas y constituye una alternativa factible a los métodos de análisis convencionales que requieren un tiempo de preparación y análisis más largos, lo que está suscitando un creciente interés por parte de muchas bodegas.

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica analítica no destructiva que se emplea para determinar cualitativa y cuantitativamente los compuestos moleculares de muestras sólidas, líquidas, e incluso, gaseosas (1), proporcionando información estructural de una gran variedad de moléculas de manera simultánea, incluso estando dentro de muestras complejas.

Esta técnica requiere una mínima preparación de la muestra, lo que unido a su alta capacidad de automatización, la convierte en una técnica analítica rápida, directa y respetuosa con el medio ambiente, por lo que resulta muy ventajosa para ser utilizada en el análisis de rutina, en el control de procesos y en la clasificación de alimentos y bebidas (2,3).

IV.1.1 Aspectos fundamentales

Dentro del espectro electromagnético, la región infrarroja abarca desde los 10 cm^{-1} a los 12.800 cm^{-1} , expresado en números de onda, o de 780 nm (extremo rojo del espectro visible) a 10^6 nm (región de las microondas), expresado en longitudes de onda (3) (Figura IV.1).

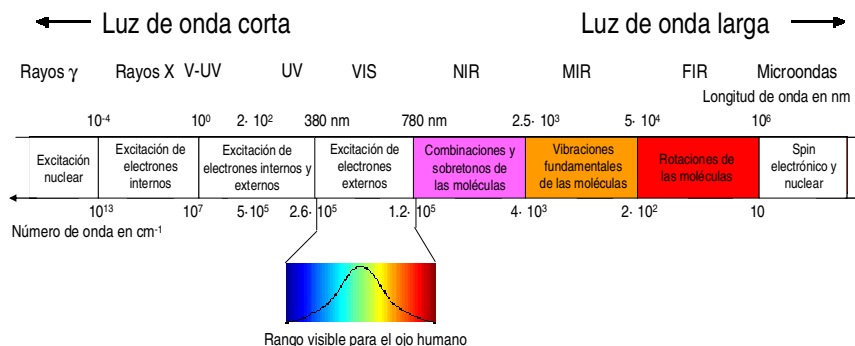


Figura IV.1. Regiones del espectro electromagnético

La espectroscopia molecular es una técnica de absorción que se basa en la interacción entre la radiación electromagnética y las moléculas que componen la materia. Dependiendo de la región del espectro en la que se trabaje, y, por tanto, de la energía de la radiación utilizada (caracterizada por su longitud o número de onda), esta interacción será de diferente naturaleza: excitación de electrones, vibraciones moleculares o rotaciones moleculares (4).

La excitación de electrones, que provoca que los electrones pasen a un estado energético superior, requiere la energía proporcionada por las radiaciones ultravioleta, visible y de rayos X. Éste es el fundamento de los métodos espectrofotométricos para medir los compuestos fenólicos a través de sus medidas de absorbancia en la región del espectro ultravioleta y visible. Sin embargo, la radiación IR no es lo suficientemente energética para producir esta clase de transiciones electrónicas (5).

El fundamento de la espectroscopia de IR radica en la absorción de radiación IR a longitudes de onda específicas por parte de los enlaces

moleculares presentes en la muestra, para los cuales existen pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales y rotacionales.

Desde un punto de vista funcional, el espectro infrarrojo se divide en tres regiones: el infrarrojo cercano, conocida como NIR (del acrónimo en inglés *near infrared*), donde se producen las absorciones debidas a sobretonos y combinaciones de las bandas fundamentales del infrarrojo medio; el infrarrojo medio, conocida como MIR (del acrónimo en inglés *mid infrared*), donde tienen lugar las vibraciones moleculares fundamentales; y el infrarrojo lejano, conocida como FIR (del acrónimo en inglés *far infrared*), donde se producen las absorciones debidas a cambios rotacionales moleculares (6).

Así pues, las transiciones entre dos estados rotacionales sólo es posible observarlas con gran resolución en la región FIR para el caso de muestras gaseosas, por lo que esta región no se emplea para el análisis de muestras líquidas y sólidas. La principal utilidad de la región FIR queda restringida a la determinación estructural (análisis cualitativo) de especies inorgánicas y organometálicas con átomos pesados.

Por su parte, las transiciones entre dos estados vibracionales son posibles con las técnicas espectroscópicas NIR y MIR, las cuales son útiles para la determinación cuantitativa de rutina de distintas especies de interés para la industria de los alimentos y bebidas. Ambas técnicas reciben también el nombre de espectroscopia vibracional.

En la región MIR se registran los cambios entre estados de energía vibracional de los principales grupos funcionales característicos de cada molécula (7), y que permiten elucidar la estructura molecular de un compuesto. Esto hace que esta región sea la más utilizada en el análisis cualitativo de muestras sólidas y líquidas.

Sin embargo, la región NIR no produce absorciones específicas que proporcionen información estructural de los analitos, por lo que su aplicación se enfoca fundamentalmente hacia el análisis cuantitativo. De hecho, los espectros NIR son mucho menos nítidos y peor definidos que los MIR, ya que están llenos de bandas superpuestas debido a la existencia de sobretonos y

combinaciones de las vibraciones fundamentales de la región MIR, lo que complica su interpretación y calibración (7).

IV.1.2 Fundamento de la radiación MIR

La radiación MIR, compuesta por fotones con una energía directamente relacionada con el número de ondas de la radiación, cuando incide sobre una molécula “en reposo”, su energía se transfiere a los grupos funcionales que conforman la molécula produciendo vibración en los enlaces (8). La molécula pasa de un estado vibracional de número cuántico n a uno más elevado, $n+1$. La diferencia de energía entre ambos estados debe ser igual a la del fotón.

Para que una molécula absorba radiación de la zona MIR, la frecuencia de la radiación incidente debe coincidir con la frecuencia de vibración de alguno de sus enlaces químicos. Sólo de esta manera se producirá un cambio neto en el momento dipolar (que se define como la intensidad de la fuerza de atracción entre dos átomos dentro de la molécula), el cual provocará cambios en la amplitud de alguno de los movimientos de vibración de la molécula. Estos cambios se representan gráficamente en forma de espectros, los cuales representan las bandas de absorción, atribuida a las vibraciones de los distintos grupos funcionales, como una función de la longitud de onda, λ , o del número de ondas, ν .

La medida más común en el MIR, y que es la que se ha empleado en la presente Tesis, es la que se basa en la absorción/transmisión, aunque también se han desarrollado espectroscopias basadas en el fenómeno de la reflexión, como la reflectancia total atenuada (ATR), que es una técnica de análisis superficial muy utilizada (9), o la reflectancia difusa, pero éstas últimas no han sido objeto de estudio en la presente Tesis.

En la espectroscopia de absorción/transmisión, la luz IR atraviesa la muestra (confinada en un medio inerte) y viaja hasta el detector. De este modo se obtiene el espectro de absorción que corresponde a la parte de intensidad de la luz que ha sido absorbida por la muestra. Esta pérdida en la intensidad de la luz incidente se calcula a partir del logaritmo del cociente entre la

intensidad de la luz incidente (P_0), correspondiente al espectro de fondo (*background*), y la transmitida a través de la muestra (P_T) (8) (Ec. IV.1):

$$A = -\log T = \log \left(\frac{P_0}{P_T} \right) \quad \text{Ec. IV.1}$$

Además, y de acuerdo con la ley de Lambert-Beer (Ec. IV.2), una vez fijado el camino óptico (l) y determinada la absorptividad molar (ε), la absorción de la radiación MIR es directamente proporcional a la concentración del analito medido (c):

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Ec. IV.2}$$

Sin embargo, dado que cada banda de absorción registrada en el espectro MIR es debida a la presencia de los grupos funcionales pertenecientes a distintos analitos, la cuantificación de cada analito no puede realizarse individualmente por el método de patrón externo siguiendo la ley de Lambert-Beer, (mediante calibración univariante). Esta complejidad implica el uso de calibración multivariante, tal y como se explica más adelante.

IV.1.3 Asignación de bandas

En el espectro de absorción MIR existen dos regiones (10):

- Entre 4000 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} se observan una serie de bandas asignadas a vibraciones de sólo dos átomos. En este caso, la banda de absorción se asocia únicamente a un grupo funcional, por lo que a esta región se la denomina región *de grupo funcional*. Estas vibraciones derivan de grupos que contienen hidrógeno (C-H, O-H y N-H) o grupos con dobles y triples enlaces aislados (1).
- Entre 1300 cm^{-1} y 900 cm^{-1} se producen múltiples bandas correspondientes a las vibraciones de cada enlace dentro de las moléculas. A esta región se la denomina *fingerprint* (huella dactilar)(1).

La región *fingerpint* recibe este nombre porque es la región del MIR donde los compuestos orgánicos generan bandas de absorción características, dependiendo de la estructura de la molécula, permitiendo la identificación de compuestos específicos. La región *fingerpint* es específica y única para cada molécula, mientras que la región *de grupo funcional* es similar para moléculas que posean los mismos grupos funcionales.

La Figura IV.2 muestra un cuadro resumen de las frecuencias de absorción de los grupos funcionales más comunes en el MIR.

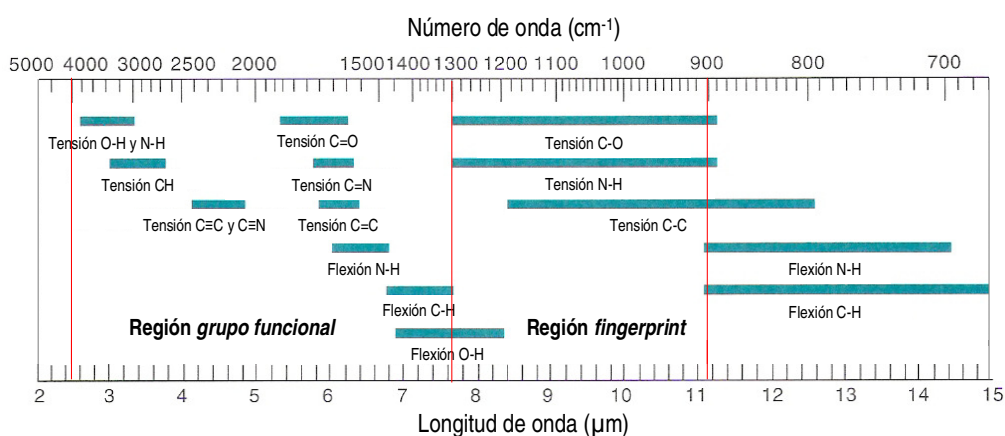


Figura IV.2. Frecuencias de absorción de los grupos funcionales más comunes en el MIR

Dada la compleja composición de los productos naturales que se estudian en la presente Tesis, uva y vino, resulta evidente que los espectros presentarán diversas bandas de absorción con distinta intensidad. Esta complejidad ha sido objeto de muchos estudios por lo que, en la Tabla IV.1, se recogen las bandas MIR características de los principales componentes de la uva y el vino. En ésta se detallan también los grupos funcionales responsables de las bandas espectrales de absorción. Teniendo en cuenta que en el mosto de uva, las absorciones más destacadas estarán producidas por los azúcares, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos, y en el vino tinto predominará el alcohol, seguido de los compuestos fenólicos, se puede observar que todos estos compuestos muestran mayoritariamente bandas de absorción características dentro de la región comprendida entre 950-1500 cm^{-1} , es decir, en la región *fingerpint*.

Tabla IV.1. Bandas MIR características de mostos de uva y vinos

	Descripción	Región	Referencia
Azúcares	Vibraciones C-O y estiramiento C-O-C	950-1200	(11-14)
	Bandas características	1000-1120	(15)
	Estiramiento C-OH	1045-1080	(16)
	Grupo aldehído	1680-1740; 2700-2900	(1)
Ácidos orgánicos	Estiramiento C-O del alcohol secundario de los ácidos orgánicos	1060-1150	(17)
	Flexión O-H de los grupos alcohol secundarios	1056-1110	(17)
	Ésteres	1100-1310	(1)
	Estiramiento C-O	1288-1457	(16)
	Flexión O-H	1320-1420	(17)
	Estiramiento CO=O, C=C, CH ₃ y CH ₂	1419-1454	(12,16-20)
Compuestos fenólicos	Flexión C-H de los anillos aromáticos fuera del plano	670-900	(21)
		690-900	(1)
	Flexión en el plano C-H de los anillos aromáticos (bandas características de estos compuestos)	950-1225	(12,15,21)
		1000-1270	(22)
		1000-1275	(1)
	Taninos uva	933-1060 + 1716-1812	(23)
	Tensión C-OH de los fenoles	1160-1340	(22)
		1150-1290 + 1350	(24)
	Tensión C-O del anillo de pirano	1230-1320	(21)
		1285	(24)
		1000-1300	(23)
	Flexión C-O-H de los fenoles y estiramiento C-OH de los anillos aromáticos	1310-1390	(22)
	Anillos fenólicos	1310-1410	(25)
	Anillos aromáticos de los compuestos fenólicos	1268	(26)
	Vibraciones O-H de los fenoles	1340-1420	(23)
		1260-1410	(12)
	Flexión C-O-H de los fenoles	1310-1390	(22)
	Taninos uva	1445, 1520	(23)
	Selección taninos de la uva por algoritmo	1425-1485	(23)
	Tensión C=C de anillos aromáticos	1419-1454	(26)
1430-1650		(22)	
1450-1510 + 1580-1615		(21)	
	1430-1650	(1)	
Tensión C=O de grupos éster	1740-1750	(22,23)	
Sobretonos y combinación de bandas de anillos aromáticos	1660-2000	(21)	
	1700-2000	(22)	
Flexión C-H de los anillos aromáticos	3000-3100	(1)	
	3070-3130	(21)	
Flexión O-H de grupos hidroxilo, flexión de H-unido a OH	3200-3400 + 3200-3570	(21)	
Etanol	Estiramiento C-OH	1045-1080	(16)
	Estiramiento C=O del alcohol primario	1050, 1087, 1040-1150	(18,27) (15)
		Estiramiento C-H de los CH ₃ y CH ₂	1427-1457 + 2850-2960
	Estiramiento C-H de los CH ₃ y CH ₂	1427-1457 + 2850-2960 2904-2981	(16,18,27) (13,18)
	Vibraciones de CH ₂	2700-3000	(15)
Glicerol	Estiramiento C-OH	1045-1080	(16)
	Estiramiento C-O del alcohol primario	1050, 1087	(16,18,27)
CO ₂		2350	(28)

IV.1.4 Espectrómetro de infrarrojo medio con transformada de Fourier (FT-MIR)

La aparición de los primeros espectrómetros de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-MIR) a finales de la década de los 60 supuso un importante avance tecnológico respecto a los antiguos espectrómetros dispersivos de doble haz, ya que mostraban mayor rapidez de análisis, mayor sensibilidad (relación señal/ruido), mayor precisión y menor coste. Todo esto, junto con los avances de la tecnología informática, hizo que la técnica FT-MIR fuera reconocida como una potente herramienta analítica.

Los principales componentes ópticos de los espectrómetros FT-MIR se muestran en la Figura IV.3 (29): la fuente de radiación IR, el interferómetro, el compartimento donde se coloca la muestra (celda) y el detector.

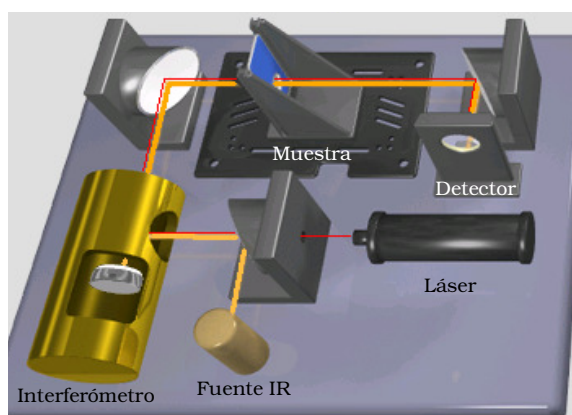


Figura IV.3. Principales componentes ópticos de un equipo FT-MIR

Fuente de radiación IR

La fuente de radiación IR consiste en un sólido inerte que se calienta a una temperatura comprendida entre 1227-1927°C, de forma que su superficie emita energía radiante de manera continua. El haz de luz emitido pasa a través de un filtro que controla la cantidad de energía que debe atravesar la muestra y llegar al detector (29). Concretamente, se ha empleado una fuente Global en los ensayos realizados en la presente Tesis Doctoral.

Interferómetro

El interferómetro constituye el módulo central de los instrumentos FT-MIR (Figura IV.4). Al igual que en el equipo empleado en la presente Tesis, el FT-MIR está basado en el interferómetro de Michelson, compuesto por un divisor de haz (*beamsplitter*), el cual escinde el haz de luz IR en dos haces iguales, que son reflejados cada uno en un espejo fijo y otro móvil.

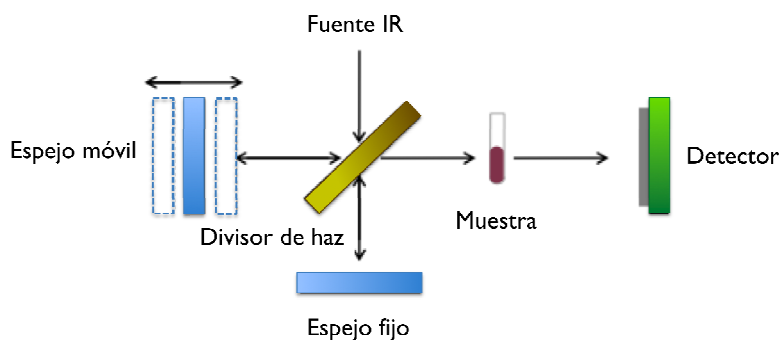


Figura IV.4. Diagrama del interferómetro de Michelson

El desplazamiento del espejo móvil provoca diferencias en la distancia recorrida por los dos haces, a la que se denomina diferencia de camino óptico (en inglés *optical path difference*, OPD) (3). Así, cuando ambos haces se encuentran de nuevo de vuelta al divisor de haz, se superponen e interfieren de manera destructiva, y la intensidad resultante de la superposición es medida como función de desfase. Esta diferencia en la trayectoria de las ondas en un interferómetro está definida por el retardo, que es 2 veces la distancia recorrida por el espejo móvil. El retardo es el máximo desplazamiento del espejo, y éste es el que determina la resolución espectral, que se define como la inversa del retardo (8). A modo de ejemplo, si el espejo móvil se desplaza 2 cm respecto a su posición original, el retardo será de 4 cm y la resolución de 0.25 cm^{-1} . Para mejorar la resolución de los espectros se deberá aumentar la distancia recorrida por el espejo móvil, y su velocidad si se quiere mantener constante el intervalo de muestreo.

Por el contrario, cuando los dos espejos se encuentran a la misma distancia, la diferencia del camino recorrido por los dos haces es cero (en inglés *zero path difference*, ZPD). Así, ambos haces son reflejados en fase de vuelta al divisor de haz, interfiriendo de manera constructiva.

Así pues, las condiciones para la interferencia constructiva y destructiva, y los estadios intermedios que se producen entre ambas, tienen lugar de manera consecutiva. La radiación combinada resultante que contiene estas interferencias se denomina interferograma, y representa el movimiento hacia delante del espejo móvil hasta el punto ZPD y el movimiento posterior hasta la posición inicial. Por tanto un interferograma es la representación de la intensidad de la radiación, expresada en voltios, sobre el punto OPD (3).

Por último, esta radiación IR recombinada es la que viaja hasta el compartimento de la muestra.

Compartimento de la muestra

La luz IR se dirige al compartimento donde se encuentra colocada la muestra, donde, dependiendo del tipo de análisis, la radiación puede atravesar la muestra o bien puede ser absorbida y reflejada por la superficie donde esté colocada, absorbiendo selectivamente en función de las vibraciones de sus constituyentes, para llegar finalmente al detector (3).

En los ensayos llevados a cabo en la presente Tesis Doctoral se ha empleado una celda de transmisión, fabricada con ZnSe y aislada por un sistema de ventanas de KBr.

Detector

Finalmente, la radiación IR llega al detector, diseñado para medir la señal procedente de la muestra, el cual registra las fluctuaciones de intensidad producidas por efecto de la interferencia en tiempo real. El detector empleado en la presente Tesis Doctoral ha sido un dispositivo piroeléctrico de sulfato de triglicina deuterado, (en inglés *deuterium tryglycine sulfate*, DTGS).

Para obtener información interpretable desde el punto de vista químico, el interferograma debe ser convertido a un espectro IR convencional, que contenga la información espectral relativa a la muestra.

El procedimiento matemático que descompone el interferograma IR proporcionado por el interferómetro (intensidad frente a tiempo) en espectros (intensidad frente a frecuencia) se denomina transformación de Fourier. Esta operación la lleva a cabo el ordenador, empleando el algoritmo de transformación rápida de Fourier, disponible en todos los equipos FT-MIR, que consiste en transformar la señal del interferograma en ondas sinusoidales (suma de términos seno-coseno) para cada número de onda de la radiación (2).

Como se ha comentado anteriormente, el interferograma no se registra de forma continua, sino en intervalos de muestreo discretos. Así pues, para el análisis del interferograma es necesario sincronizar el muestreo de datos de la señal del detector, después de ser amplificada, con el movimiento del espejo móvil.

Para lograr esto, se emplea una señal láser (He-Ne) como referencia, localizada dentro del equipo. El láser realiza dos funciones.

La primera, actuar como un patrón interno de número de ondas, ya que la suya se conoce de manera precisa (exactamente a 15798.637 cm^{-1}). Las franjas de interferencia del láser dan información precisa de la posición del espejo móvil, permitiendo el muestreo de los datos de los interferogramas en intervalos de retardo precisos. La sincronización del movimiento del espejo y el muestreo de datos para la transformación de Fourier, permite obtener medidas de frecuencia espectral muy precisas. De esta manera, la reproducibilidad del número de ondas de muchos espectrómetros FT-MIR es de $\pm 0.01\text{ cm}^{-1}$ o incluso mejor.

La segunda, mantener constante la velocidad del sistema que acciona los espejos del interferómetro. De esta manera, controla la posición del espejo móvil y, por tanto, la alineación de la óptica en el interferómetro (corrige la posición del pico del interferograma por si se desvía).

Para eliminar las señales debidas al ruido de fondo del equipo y al ambiente atmosférico que rodea al equipo, se suele adquirir cada cierto tiempo, un espectro de fondo (*background*) de manera automática en las mismas condiciones en las que se trabaja con la muestra. De esta manera, se pueden eliminar los picos debidos a estas interferencias, tal y como se esquematiza en la Figura IV.4.

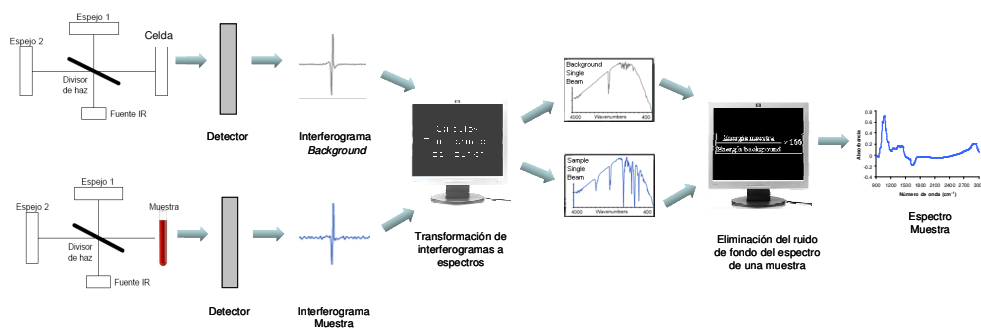


Figura IV.4. Diagrama de obtención de un espectro FT-MIR de una muestra

El espectro de la muestra se divide por el espectro de fondo, de modo que los picos del espectro final sólo están producidos por la muestra.

A modo de resumen, las principales ventajas de los espectrómetros FT-MIR son debidas a la presencia del interferómetro de Michelson. Las más importantes son:

- Se mejora la resolución de los espectros por aumento del recorrido del espejo móvil, lo cual es posible gracias al láser, que es el que controla su posición.
- Se obtiene una mayor sensibilidad (relación señal/ruido) como consecuencia de someter a la muestra a una irradiación simultánea con luz IR de diferentes frecuencias (y no secuencial, como ocurre en el caso de los instrumentos dispersivos), lo que produce una mayor energía del haz de luz que llega al detector, así como por la promediación de varios interferogramas de la misma muestra (barridos) (30).

Fue tan notable la mejora de la sensibilidad y resolución de los espectros MIR con la incorporación de los interferómetros de Michelson, junto con la transformación de Fourier para la conversión final de los interferogramas a espectros, que a partir de ese momento, prácticamente todos los espectrómetros comerciales pasaron a ser FT-MIR. La Tabla IV.2 resume brevemente otras ventajas y también inconvenientes que presenta la técnica propuesta:

Tabla IV.2 Ventajas e inconvenientes de la técnica FT-MIR (31)

Ventajas	Inconvenientes
Rapidez	Alto coste inicial
Alto grado de automatización	Dependiente de calibración
Bajo impacto ecológico	Método indirecto
Sin tratamiento de la muestra	No analiza minerales (K, Ca, Mg, Na)
Bajo coste de mantenimiento	Sólo mide concentraciones > 0.1 g/L

IV.2 Aplicación de la espectroscopia FT-MIR en el análisis de uvas y vinos

El control de un proceso industrial es esencial para cumplir con las normas de seguridad y los parámetros de calidad de un producto.

En el sector enológico esto implica, entre otros aspectos, la evaluación de las propiedades físicas y químicas de la materia prima (uva y mosto), el seguimiento de la fermentación, entendiendo ésta como un proceso productivo, y la evaluación del producto final (vino obtenido).

La información en tiempo real que pueden proporcionar los equipos FT-MIR sobre los constituyentes de la uva, el mosto y el vino puede emplearse para tomar decisiones que evalúen, mejoren y adapten la producción de uva y vino hasta lograr los máximos parámetros de calidad. Sin embargo, son pocas las bodegas que se atreven a adquirir estos equipos por la inversión económica que supone, aunque también por la etapa de calibración que precisa y la verificación de ésta a lo largo del tiempo.

En los siguientes párrafos se hace un repaso sobre las aplicaciones de los instrumentos FT-MIR en el sector enológico para demostrar la gran versatilidad que presentan, y lo rentables que pueden resultar a largo plazo para la industria del vino.

La espectroscopia FT-MIR se ha empleado para el control de calidad de bebidas alcohólicas como la cerveza (32), sidra (33), tequila (34), vodka (35), ron y ginebra (36), whiskey (37), licor de frutas (38) y otros licores (39,40), así como en la detección de sustancias adulterantes nocivas, como el metanol (41,42), en estas bebidas.

Continuando con su aplicación en el sector enológico, esta técnica se ha empleado con éxito en el control de elaboración de productos derivados del vino, como por ejemplo en el seguimiento de la evolución de acidez volátil durante la elaboración del vinagre (43), así como en la clasificación de vinagres en función de la materia prima empleada y del proceso productivo seguido (44).

Por otra parte, también se ha empleado para discriminar diferentes tipos de brandys y destilados (45,46), tequilas (34) y licores de sorgo (47).

En la Tabla IV.3 se recogen las aplicaciones de los instrumentos FT-MIR en este sector, ya sea para el análisis de vinos, uvas o mostos.

Control de calidad del vino

Como se muestra en la Tabla IV.3, una de las mayores utilidades que tiene la espectroscopia FT-MIR para las bodegas es el análisis rutinario de los vinos, para la cuantificación de los parámetros que definen su calidad: azúcares, etanol, glicerol, ácidos orgánicos, acidez volátil, acidez total, pH y SO₂ total, entre otros (58, 71, 75, 77, 78). También las interferencias que afectan a la medida de algunos parámetros en el vino a través de la técnica FT-MIR han sido objeto de estudio (17). Éstos han revelado que los compuestos mayoritarios del vino, como el etanol y los ácidos orgánicos, pueden afectar a la respuesta espectral, por lo que deben tenerse en cuenta en la etapa de calibración.

Tabla IV.3. Principales aplicaciones de la técnica FT-MIR al análisis de vinos, uvas y mostos

Año	Muestra	Técnica	Estudio	Zona espectral (cm ⁻¹)	Método quimiométrico	Referencia
1993	Mostos y vinos blancos	FT-MIR	Bandas absorción de los compuestos fenólicos	2500-4000	-	(48)
1998	Vino tinto y blanco	HPLC-ATR-FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	1035-1395	NF	(49)
1998	Vinos (tipo NF)	SI-FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	900-1500	PLSR	(14)
1999	Vinos (tipo NF)	FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	964-1582, 1697-2006, 2701-2971	PLSR	(31)
2000	Vino blanco, rosado, tinto, vino dulce, espumoso y licoroso	FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	926-5012	NF	(50)
2001	Vino tinto	ATR-FT-MIR	Clasificación por variedades	940-1760; 950-1640	HCA, SIMCA	(12)
2001	Vino tinto	FT-MIR	Clasificación por regiones vitícolas	800-1800	FDA	(51)
2002	Vino, brandy, destilado	FT-MIR	Clasificación por tiempo de envejecimiento	926-2971; 3670-5012	PCA, LDA, PLSR	(46)
2002	Vino blanco	FT-MIR	Clasificación por variedad y tipo de vinificación, caracterización de polisacáridos	800-1200	PCA,CCA	(52)
2002	Vino blanco y tinto	FT-MIR	Lengua electrónica (sensación de astringencia)	900-1900	NF	(24)
2003	Vino tinto	HPLC-ATR-FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	950-1400	MCR-ALS	(53)
2003	Vino blanco (seco y dulce), rosado y tinto	FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	NR	PLSR	(54)
2004	Vino blanco, rosado y tinto	FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	965-1582; 1698-2006; 2701-2971	PLSR	(20)
2004	Vinos secos y dulces	FT-MIR	Estudio de interferencias en el análisis	926-5012	PLSR	(17)
2004	Vino tinto	FT-MIR	Cuantificación de antocianos	926-5012	PLSR	(55)
2004	Vino tinto y blanco	FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	964-1543; 1716-2732; 2434-2970	PLSR, SIMCA	(56)

Tabla IV.3. Principales aplicaciones de la técnica FT-MIR al análisis de vinos, uvas y mostos (Continuación)

2005	Vino blanco, espumoso, rosado y tinto	FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	929-1582; 1698-2971	PLSR	(57)
2005	Vino tinto, blanco y rosado	FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	1000-1500	PLSR, MLS	(58)
2005	Vino blanco y tinto: ron, ginebra, vodka, brandy, whiskey	ATR-FT-MIR/ FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	850-3000	PLSR	(40)
2005	Vino tinto	ATR-FT-MIR	Clasificación y cuantificación de glicerol	900-1500	PLSR, LDA, CVA	(59)
2005	Vino tinto, blanco y rosado	ATR-FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	800-3000	PLSR	(60)
2005	Vino blanco y tinto	ATR-FT-MIR	Cuantificación de manosa	800-1200	PLSR	(61)
2005	Vino tinto	FT-MIR	Diferenciación por origen y añada	800-1800	PCA, PLSR	(62)
2006	Vino tinto	FT-MIR	Efecto de pre-tratamientos espectrales sobre los parámetros de calibración	965-1543; 1717-2280; 2435-2971	PLSR	(63)
2006	Vino tinto	FT-MIR	Diferenciación por bodegas	926-5012	SI	(18)
2007	Vino tinto	ATR-FT-MIR	Caracterización y cuantificación de polisacáridos	950-1850	PLSR	(19)
2007	Vino blanco y tinto	ATR-FT-MIR	Cuantificación de manoproteínas	950-1851	PLSR	(64)
2007	Vino blanco y tinto	FT-MIR	Clasificación por cantidad y origen del tanino	740-1430; 1480-2849; 2918-4000	DA, SIMCA	(65)
2007	Vino tinto	FT-MIR	Cuantificación de taninos	650-4000	PLSR	(21)
2007	Vino tinto	FT-MIR	Diferenciación entre fermentaciones normales y problemáticas	200-740; 1350-28500	PCA, Cluster K-Means	(66)
2007	Vino tinto	FT-MIR	Cuantificación de antocianos	926-5012	PLSR	(67)
2008	Vino tinto	FT-MIR	Cuantificación de taninos	933-1577; 1716-1812; 2699-2969	PLSR	(22)
2008	Vinos blancos y tintos	FT-MIR	Diferenciación por variedad	926-5012	PCA, LDA	(68)

Tabla IV.3. Principales aplicaciones de la técnica FT-MIR al análisis de vinos, uvas y mostos (Continuación)

2008	Vino tinto	ATR-FT-MIR	Diferenciación por variedad y modo de elaboración	900-1800	% similitud espectro librerías	(69)
2008	Vinos (tipo NR)	FT-MIR	Diferenciación entre fermentaciones normales y problemáticas	698-3564	PLSR	(70)
2009	Vino blanco y tinto	FT-MIR	Clasificación entre vinos orgánicos y no-orgánicos	400-4000	PCA, LDA, PLS- DA	(16)
2009	Vino blanco	ATR-FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	600-4000	PLSR	(71)
2009	Vino blanco y tinto	FT-MIR	Diferenciación por variedad	929-1542, 1717-2971	PCA, LDA	(72)
2010	Vino tinto	FT-MIR	Lengua electrónica (sensación astringencia)	1002-1542; 1720- 1808; 2703-2966	PLSR, SELECT- PLSR	(23)
2010	Vino tinto	FT-MIR	Lengua electrónica (sensación amargor)	926-5012	PLS-DA, MIR	(73)
2010	Vino tinto	ATR-FT-MIR	Predicción de la capacidad antioxidante	965-1543, 1717-2280, 2435-2971	PLSR	(74)
2010	Vino blanco y tinto	FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	965-1582, 1698-2006, 2701-2971	PLSR	(75)
2011	Vino dulce (uva blanca y tinto)	FT-MIR/ATR-FT-MIR	Autenticidad de los vinos de un país	400-4000	PCA, HCA, LDA, CART, RDA	(76)
2011	Vino blanco	FT-MIR	Autenticidad de los vinos de varios países	400-4000	PCA, SIMCA, PLS-DA	(26)
2011	Vino blanco y tinto	ATR-FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	375-4000	PLSR	(77)
2011	Vino tinto	FT-MIR	Cuantificación de los componentes vino	1188-1485, 2503- 2951	PLSR	(78)
2003	Uva blanca	ATR-FT-MIR	Caracterización aromática y diferenciación varietal	800-4000	PLS-DA	(79,80)
2004	Mosto (tipo uva NR)	ATR-FT-MIR	Seguimiento de la fermentación	800-2000	PLSR	(11)
2004	Uva tinta	FT-MIR	Seguimiento de la fermentación	200-740; 1350-28500 (nm)	PLSR	(81)
2004	Uva blanca	FT-MIR	Cuantificación de los precursores del aroma	900-1700	PLSR	(82)

Tabla IV.3. Principales aplicaciones de la técnica FT-MIR al análisis de vinos, uvas y mostos (Continuación)

2005	Uva tinta	ATR-FT-MIR	Capacidad antioxidante de los extractos	900-2000	PLSR	(83)
2007	Mosto uva blanca y tinta	FT-MIR	Cuantificación de los componentes mosto	964-1542, 1717-2969	PLSR	(84)
2007	Mosto-Vino tinto	ATR-FT-MIR	Seguimiento de la fermentación (localización picos característicos)	900-1200	correlación 2D	(85)
2007	Zumo de uva, arándanos y manzana	ATR-FT-MIR	Autenticación de los zumos de uva	700-4000	SIMCA, HCA	(86)
2008	Uva tinta y blanca	FT-MIR	Cuantificación (control de calidad del estado sanitario uva)	965-1543; 1717-2280; 2435-2971	PLSR	(87)
2010	Extractos de pepitas de uvas blancas y tintas	FT-MIR	Cuantificación de proclanidinas de diferente grado de polimerización	700-1800	PLSR	(88)
2010	Uva tinta	FT-MIR	Seguimiento de la fermentación	700-4000	LDA, PLSR	(27)
2010	Mosto uva blanca	ATR-FT-MIR	Cuantificación componentes mosto	375-4000	PLSR	(89)
2010	Uva tinta	FT-MIR	Diferenciación por estado de maduración y origen geográfico	950-1550	PCA, PLS-DA	(15)

***NF**, no facilitado; **PLSR**, *partial least squares regression* (regresión por mínimos cuadrados parciales); **HCA**, *hierarchical cluster analysis* (análisis jerárquico de grupos); **SIMCA**, *soft independent modeling of class analogy* (modelado suave independiente por analogía de clases); **FDA**, *factorial discriminant analysis* (análisis discriminante factorial); **PCA**, *principal component analysis* (análisis de componentes principales); **LDA**, *linear discriminant analysis* (análisis discriminante lineal); **CCA**, *canonical correlation analysis* (análisis de correlación canónica); **MCR-ALS**, *alternating least squares multivariate curve resolution* (resolución multivariante de curvas por mínimos cuadrados alternados); **MIS**, *multiple linear regression* (regresión lineal múltiple); **CVA**, *canonical variate analysis* (análisis de variables canónicas); **SI**, *similarity index* (índice de similitud); **DA**, *discriminant analysis* (análisis discriminante); **Cluster K-Means** (análisis de grupos de K-medidas); **PLS-DA**, *partial least squares discriminant analysis* (análisis discriminante por mínimos cuadrados parciales); **SELECT-PLSR**, *partial least squares regression by spectral variable search algorithm SELECT* (regresión por mínimos cuadrados parciales con algoritmo de selección de variables SELECT); **MIR**, *multiple linear regression* (regresión lineal múltiple); **CART**, *classification and regression trees* (árboles de regresión y clasificación); **RDA**, *regularized discriminant analysis* (análisis discriminante regularizado).

Además, la técnica FT-MIR también se ha aplicado con éxito para el análisis de los compuestos fenólicos en vinos blancos (20, 48, 60) y rosados (20, 60), pero fundamentalmente en tintos, analizando compuestos fenólicos totales (20, 31, 60), antocianos y componentes del color (55, 63, 67), y taninos (21, 22).

La capacidad antioxidante de los vinos tintos también se ha podido determinar mediante espectroscopia FT-MIR (74).

Autenticación del vino

Por otra parte, gracias a la gran cantidad de información composicional que aportan los espectros FT-MIR, existen estudios sobre la aplicación de esta técnica en la clasificación, diferenciación y caracterización de vinos según, por ejemplo, la cantidad y perfil de determinados compuestos, como polisacáridos (19, 52), glicerol (59) y taninos (65); diferenciación de vinos por variedad de uva (12, 52, 68, 69, 72), modo de elaboración (52, 69), tiempo de envejecimiento (46), diferenciación entre vinos ecológicos de los que no lo son (16), distinción entre crianza en depósito o bodega (69), diferenciación entre diferentes regiones vitícolas que laboran un mismo tipo de vino (51, 62), autenticación de vinos de una región concreta (26, 76), diferenciación entre añadas (62), e incluso distinción entre bodegas de una misma empresa repartidas dentro de un mismo país (18).

Lengua electrónica

Otra de las recientes aplicaciones de la espectroscopia FT-MIR en el ámbito enológico ha sido el utilizarla como *lengua electrónica*. En este caso, se intenta establecer correlaciones entre los compuestos químicos y las sensaciones gustativas que producen, descritas a través del análisis sensorial llevado a cabo por un panel de cata.

Así por ejemplo, a través de esta aplicación de la técnica FT-MIR se ha podido determinar la magnitud de la sensación de astringencia (23, 24) o amargor (73) que producen los taninos del vino.

Seguimiento de la fermentación del vino

El control del proceso de fermentación del vino es una etapa muy importante en la elaboración, tanto en la transformación de los azúcares en etanol (fermentación alcohólica), como en la del ácido málico en láctico (fermentación maloláctica) requiriéndose un seguimiento continuo y preciso para evitar problemas derivados de fermentaciones problemáticas. Es por ello que existen varios estudios que emplean la espectroscopia FT-MIR para observar la evolución de los contenidos de azúcares y etanol (11, 85, 91), y otros en los que el estudio se ha ampliado a la evolución de un mayor número de analitos como el glicerol y los ácidos málico, tartárico, succínico, láctico, acético y cítrico (81). Todos estos estudios han sentado las bases de otros posteriores en los que se ha demostrado la capacidad de esta técnica para detectar indicios de paradas de fermentación o fermentaciones lentas (66, 70), con el fin de intervenir lo más rápidamente posible.

Sin embargo, existen pocos estudios sobre la aplicación de la técnica FT-MIR en el seguimiento de la maceración de la uva, etapa en la que se disuelven los compuestos fenólicos de la uva en el vino y que tiene lugar de manera paralela a la fermentación durante la vinificación en tinto. De hecho, hasta el momento de redactar esta Tesis Doctoral, sólo se conocía un trabajo previo donde se hubiera empleado la espectroscopia FT-MIR, para cuantificar los antocianos y taninos disueltos en el mosto (27). Sin embargo, aunque ya se había aplicado otra técnica espectroscópica para cuantificar los compuestos fenólicos de la uva durante los procesos de maduración (92) y vinificación (93), se debía corroborar la capacidad de la técnica FT-MIR para este mismo propósito empleando muestras representativas.

Análisis de uvas

En lo que al análisis de uvas se refiere, el FT-MIR se ha utilizado tanto para cuantificar algunos precursores del aroma varietal, como son los compuestos glucosídicos (82), como para caracterizar aromáticamente diferentes variedades blancas con objeto de clasificarlas (79, 80). Además, tampoco se pueden obviar los trabajos que han empleado la espectroscopia FT-

MIR para el control sanitario de uvas blancas y tintas en la entrada a bodega cuantificando, concretamente, el ácido glucónico y glicerol, metabolitos sintetizados por el hongo *Botrytis cinerea* (87) y que son indicadores de la calidad de la uva.

Por otro lado, existen aplicaciones de la técnica FT-MIR más relacionadas con los parámetros que definen el estado de madurez tecnológica de las uvas, como son °Brix, acidez total y pH (15, 84), o la cantidad de nitrógeno disponible para la levadura (89).

Respecto al tema que nos ocupa en esta Tesis Doctoral, hay que decir que esta técnica se ha aplicado con éxito para determinar el contenido fenólico del mosto de uva blanca (89), para medir la composición fenólica de las pepitas de variedades blancas y tintas (88), o para evaluar la capacidad antioxidante de diferentes bayas (94), y, en particular, de las uvas tintas (83).

Por otro lado, en el momento de llevar a cabo la parte experimental de la presente Tesis Doctoral, tan solo existía un estudio en el que se utilizara la técnica FT-MIR para clasificar uvas tintas a partir de su diferente estado de maduración y origen geográfico (15). Sin embargo, en este caso, los resultados no eran todo lo satisfactorios que cabría esperar, puesto que, aunque se desarrollaron modelos PLSR para cuantificar distintos parámetros de madurez tecnológica y fenólica, los resultados de calibración eran mejorables y la representatividad de las muestras era cuestionable.

Con estas premisas, el panorama en este ámbito mostraba claramente que la aplicación de la técnica FT-MIR a la evolución de la composición fenólica de la uva a lo largo de la maduración, constituía un reto muy interesante que aún permanecía sin abordar.

IV.3 La Quimiometría y desarrollo de modelos PLS

Como ya se ha indicado, la utilización de los instrumentos FT-MIR implica la obtención de mucha información en muy poco tiempo. De hecho, para cada muestra, en el espectro se registra un valor de absorbancia (n) para cada número de onda del infrarrojo medio (m) de manera que, para todo el

conjunto de muestras, lo que obtenemos es una matriz de datos de $n \times m$ dimensiones. Así pues, resulta obvio que, para poder procesar tal cantidad de datos y obtener información útil, se hace indispensable el empleo de la **Quimiometría** (30, 95-97).

De este modo, de forma similar a la utilizada con cualquier otro instrumento de análisis, la cuantificación mediante la espectroscopia FT-MIR implica una etapa previa de calibración, en este caso multivariante (98, 99). Es por ello que en la presente Tesis, ésta ha sido la herramienta empleada para cuantificar los parámetros fenólicos de la uva y el vino más utilizados por el sector: compuestos fenólicos totales, antocianos totales y taninos condensados.

IV.3.1 Calibración multivariante

De entre todas las técnicas quimiométricas existentes, la más utilizada por el sector industrial es la de la calibración multivariante, empleada para el análisis cuantitativo.

Esta técnica permite correlacionar dos tipos de medidas aplicadas sobre una misma muestra. De este modo, generalmente se correlaciona una medida que se ha obtenido de manera rápida, directa, económica y que proporciona múltiples variables a la vez, con otra más complicada de obtener, que suele ser más cara y/o más laboriosa, tanto en su preparación como en el análisis que se deriva. Esta última es la que se toma como medida de referencia.

Con ambos tipos de datos se pueden construir modelos de calibración que permitan predecir las concentraciones de los analitos de interés a través de la señal analítica registrada mediante la técnica rápida (100).

En la presente Tesis Doctoral, para determinar la concentración de los compuestos fenólicos a partir del espectro proporcionado por la técnica rápida FT-MIR, se emplearon como valores de referencia los obtenidos a partir de las medidas de absorbancia en el UV-Vis, ya que en la calibración multivariante sólo es necesario conocer la concentración del analito de interés en las muestras.

Esto constituye la principal ventaja de la calibración multivariante frente a la univariante, puesto que la primera no requiere medidas instrumentales selectivas para llevar a cabo el análisis. Es decir, la muestra puede contener, junto con los analitos de interés, otros compuestos que contribuyen a la señal de forma no constante. Estas interferencias constituyen el denominado **efecto matriz**.

Por lo tanto, para obtener modelos de calibración robustos y fiables, se han de analizar muchas muestras reales diferentes para obtener un rango de concentraciones lo más amplio posible, de manera que se consiga una elevada varianza en los resultados de referencia, para poder emplearse como patrones de calibración.

Existen diferentes técnicas de calibración multivariante, siendo las más utilizadas la regresión lineal múltiple (*multiple linear regresión*, MLR), la regresión por componentes principales (*principal component regresión*, PCR) y la regresión por mínimos cuadrados parciales (*partial least squares regresión*, PLSR) (100).

El uso de la regresión MLR es limitado porque requiere una selección previa de variables (en nuestro caso, número de ondas) y tantas muestras de calibración como variables seleccionadas para generar las ecuaciones necesarias que permitan calcular todos los coeficientes, lo cual es inviable cuando se trabaja en un rango espectral tan amplio. Otro inconveniente es que si las variables están muy correlacionadas entre sí, los coeficientes tienen una incertidumbre elevada y se incrementa la incertidumbre de las predicciones (a pesar de que el ajuste pueda ser bueno).

La solución a estos inconvenientes, cuando se trabaja con la espectroscopia, está en seleccionar un pequeño conjunto de número de ondas que estén poco correlacionados entre sí y que sean lo más selectivos posible. Esta selección se puede basar o bien en el conocimiento químico, es decir, sabiendo de antemano dónde se localizan las frecuencias de absorción de los grupos funcionales característicos de los analitos que pretendemos calibrar, o bien en algoritmos de optimización, aunque se corre el riesgo de descartar zonas interesantes del espectro o de incluir alguna que no lo es.

Los métodos de PCR y PLSR permiten utilizar regiones amplias del espectro, ya que sus algoritmos son los que se encargan de escoger un pequeño conjunto de número de ondas no correlacionados. A estas nuevas variables se las denomina factores o componentes principales, y se calculan combinando linealmente todas las variables originales (Ec. IV.3) mediante lo que se denomina Análisis de Componentes Principales (PCA) (99):

$$t = w_1r_1 + w_2r_2 + \dots + w_Jr_J \quad \text{Ec. IV.3}$$

donde $[w_1, w_2, \dots w_J]$ son los *loadings* y $[r_1, r_2, \dots r_J]$ son los datos espectroscópicos. El vector de *scores* (t) se define como el producto de los *loadings* (w) y las variables originales (r). Cuanto más parecidos sean dos espectros, y por tanto, más parecidos sean $[r_1, r_2, \dots r_J]$, más similares serán sus *scores* (99).

La diferencia entre los métodos de calibración multivariante PCR y PLSR reside, básicamente, en cómo se calculan los *loadings* $[w_1, w_2, \dots w_J]$ para combinar las variables originales.

Así, en PCR, los *loadings* se obtienen del PCA de los espectros de calibración. Esto asegura que los *scores* representen las semejanzas y diferencias de los espectros lo mejor posible, pero sin considerar la diferencia espectral relacionada con la concentración a predecir (100).

Los *loadings* que calcula el método PLSR, en cambio, proporcionan *scores* que están lo más correlacionados posible con las concentraciones. Por esta razón, un modelo PLSR necesita menos factores que un modelo PCR para tener una habilidad de predicción similar y es, por tanto, el método preferido en calibración multivariante (101).

A continuación se exponen brevemente los pasos seguidos en la presente Tesis Doctoral para la construcción de los modelos de calibración multivariante PLSR. Éstos fueron: análisis de componentes principales (PCA), selección de las muestras de calibración y validación, construcción de los modelos de calibración por PLSR y validación de los mismos.

IV.3.2 Descomposición en componentes principales (PCA)

El método de descomposición en componentes principales (PCA) (99), es una técnica quimiométrica de transformación lineal, que permite comprimir los datos instrumentales en un nuevo grupo de variables, denominados factores o componentes principales, que son combinaciones lineales de las variables originales. Por consiguiente, el número de factores es mucho menor que el número de variables originales, y éstos no están correlacionados. Con el PCA se aísla el ruido y la información redundante de la información realmente útil contenida en la matriz de datos.

El primer factor explica la mayor cantidad de información (varianza explicada de las respuestas que al mismo tiempo se correlaciona con la concentración) contenida en la matriz de datos original. El siguiente factor explica la máxima información de la matriz original no contenida en el primer factor y es ortogonal al primer factor. Los sucesivos factores explican cada vez menos información y son ortogonales a los anteriores.

Esta técnica exploratoria de reconocimiento de patrones no supervisada, denominada así cuando no se tiene información previa de las clases o grupos de las muestras, es especialmente útil cuando se utilizan técnicas espectroscópicas. Los espectros obtenidos de cada muestra contienen las respuestas (medidas de absorbancia) para un gran número de variables de variables (número de ondas). Así pues, el PCA permite representar gráficamente la variabilidad presente en la matriz de datos originales, que de no emplearlo, no sería posible por el elevado número de variables que caracterizan cada muestra.

El PCA proporciona una aproximación a la matriz de datos como un producto de dos matrices: la matriz de *scores* y la matriz de *loadings*.

Los *scores* capturan las relaciones entre las muestras (en lugar de las variables originales) y son las proyecciones ortogonales sobre los factores, de manera que el primer factor no se correlaciona con el segundo y sucesivamente.

Los *loadings* retienen la información existente entre las variables y son los coeficientes de los factores (pueden tomar valores entre -1 y 1) que transforman las variables originales en *scores*.

De este modo, el PCA resulta muy útil para la representación de datos multivariantes. Por un lado, la representación de *scores* permite establecer relaciones entre las muestras, permitiendo así la detección de muestras discrepantes (*outliers*) y agrupaciones. Por otra parte, los *loadings* permiten estudiar y comparar la influencia de las distintas variables, lo cual facilita la selección de las regiones más apropiadas donde construir los modelos de calibración de cada analito.

El PCA también aporta información sobre la varianza calculada para una variable (x), que puede ser:

- **varianza explicada:** expresa la varianza explicada por cada factor o PC (contenida en los *scores*), de manera acumulativa, como porcentaje de la varianza total inicial (%) (Ec. 4).

$$\text{var}_{\text{explicada}} (\%) = \left(1 - \frac{\text{var}_{\text{residual}}}{\text{var}_{\text{total}}} \right) \cdot 100 \quad \text{Ec. IV.4}$$

- **varianza residual:** expresa la varianza residual para cada PC que falta por modelar. Muestra la falta de ajuste. Se obtiene como el cuadrado medio de todos los residuales entre los grados de libertad. (Ec. 5). Los residuales de la varianza se obtienen al comparar los valores de x medidos (absorbancia) con los reconstruidos a partir de las proyecciones sobre los PC.

$$\text{var}_{\text{residual}} = \frac{\sum_{i=1}^J (e_i)^2}{g.l.} \quad \text{Ec. IV.5}$$

Pueden existir muestras con una alta varianza residual que estén mal explicadas por el modelo, que sin embargo describe bastante bien a la mayor parte de las otras muestras. En este caso, la muestra es poco influyente sobre el modelo. Si estas observaciones anómalas tienen un fuerte efecto sobre el

ajuste del modelo que lleve a una conclusión equivocada, deben ser eliminadas del conjunto de calibración.

Estas muestras se pueden detectar mediante diversos gráficos de representación de muestras. A modo de ejemplo, la Figura IV.5 muestra dos gráficos que pueden ser útiles a la hora de detectar *outliers*: el gráfico de *scores* (a) y el gráfico de influencia (b).

En el ejemplo del gráfico de *scores* que se muestra (Figura IV.5a), se puede observar que una de las muestras es muy diferente del resto, por tanto se podría pensar que es una muestra discrepante o *outlier*.

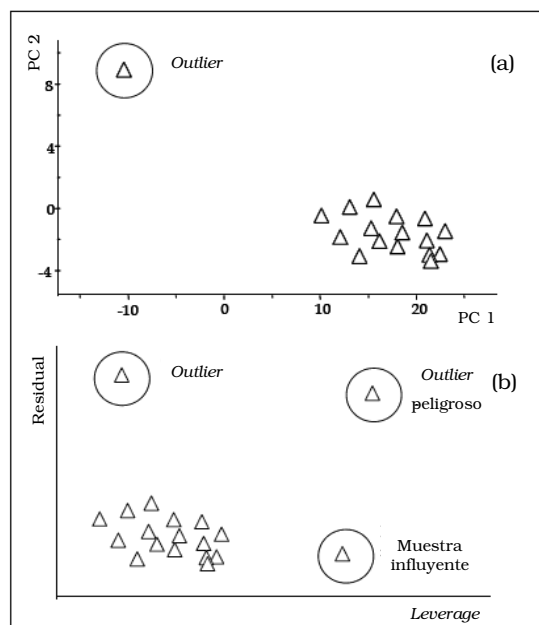


Figura IV.5. Ejemplos de detección de *outliers*:(a) gráfico de *scores*; (b) gráfico de influencia

En el gráfico de influencia (Figura IV.5b) se representan la varianza residual de las muestras frente a su *leverage*, que es la distancia de la muestra proyectada sobre el centro del modelo (punto medio). Expresa el efecto palanca que ejerce sobre el modelo.

Una muestra con una varianza residual grande es probable que sea un *outlier*, pero en el caso de que la muestra tenga un *leverage* elevado, entonces es un *outlier* peligroso ya que es una muestra discrepante con una gran influencia en el modelo, y debe ser eliminado para evitar que afecte a la capacidad de predicción del modelo.

IV.3.3 Selección de muestras para la calibración

Para poder asegurar la bondad del modelo de calibración es necesario un proceso de validación, que consiste en aplicar el modelo a muestras de las que se conoce la propiedad estudiada y que no han sido utilizadas en la construcción del mismo. Esta validación puede ser interna o externa.

La validación interna se aplica cuando el número de muestras disponibles para la calibración es relativamente pequeño, y la metodología que se sigue es la validación cruzada (98, 101). Ésta utiliza muestras del propio conjunto de calibración.

Un caso especial de validación cruzada, que se utiliza ampliamente, es el algoritmo “dejando uno fuera” (98) (en inglés *leave-one-out*), que consiste en emplear una de las muestras como muestra de validación sacándola del conjunto de calibración, y con el resto de muestras se recalcula el modelo. El nuevo modelo se aplica para predecir la concentración de la muestra sustraída. Este procedimiento se repite hasta que todas las muestras que componen el conjunto de calibración han sido sustraídas y predichas.

Los residuales de predicción (diferencias entre los valores reales y los predichos) del total de las muestras se emplean para calcular la raíz cuadrada del error cuadrático medio de validación cruzada (en inglés *Root Mean Square Error of Cross Validation*, RMSECV) del modelo. Los detalles del cálculo de este error se muestran en el apartado IV.2.5.

Para la validación externa de los modelos, son necesarios dos grupos de muestras: uno de calibración, también llamado de entrenamiento, y otro de validación, también denominado de prueba.

Para poder validar el modelo por validación externa, el número de muestras del conjunto de validación debe ser elevado, y éstas deben ser independientes de las del conjunto de calibración, pero representativas del mismo y de las futuras muestras a analizar. De esta manera es posible comprobar cómo funciona el modelo con muestras distintas a las empleadas en la construcción del mismo, por lo que, siempre que sea posible, es preferible aplicar la validación externa puesto que es una predicción real, no simulada.

De la misma manera, el número de muestras de calibración también debe ser elevado. El número mínimo de muestras del conjunto de calibración debe ser tres veces el de los factores, y para crear modelos robustos este factor asciende hasta diez (95).

Cuando se emplean métodos espectroscópicos, se recomienda que el conjunto de calibración contenga entre 70-100 muestras (102), y que este número represente entre el 60-75% del total de las muestras, reservando el otro 25-40% para el conjunto de validación (92, 94, 103).

Los residuales de las muestras de validación se emplean para calcular la raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción (en inglés *Root Mean Square Error of Prediction*, RMSEP). Los detalles del cálculo de este error también se muestran en el apartado IV.2.5.

Así pues, como en nuestro caso se disponía de un número de muestras suficientemente grande, la matriz de datos espectrales se pudo dividir en un conjunto de calibración y un conjunto de validación, y así aplicar la validación externa.

En la presente Tesis se empleó el algoritmo de Kennard-Stone (104) para la selección de muestras con las que construir el conjunto óptimo de calibración, que había sido probado anteriormente como un método útil de selección de muestras de medidas espectrales (105, 106). El procedimiento consiste en seleccionar como muestras de calibración aquellas que se encuentran a mayor distancia Euclídea dentro del espacio experimental.

Actúa de la siguiente manera: primero se seleccionan las dos muestras más alejadas entre sí, teniendo en cuenta los valores de las variables espectrales. A continuación, de todas las muestras posibles, selecciona aquella que esté más alejada de las dos previamente seleccionadas, y se añade al conjunto de calibración. Este paso se emplea sucesivamente hasta completar el número de muestras que se había fijado para el conjunto de calibración. De esta manera, se asegura una distribución homogénea del conjunto de muestras de calibración en el espacio experimental, lo que favorece los modelos de regresión (107).

Las muestras que han quedado fuera de la selección, son las que compondrán el conjunto de validación. Con el algoritmo de Kennard-Stone se garantiza que las muestras de validación estén dentro del espacio experimental del conjunto de calibración, minimizando así la extrapolación cuando se predicen las muestras de validación.

IV.3.4 Creación del modelo de calibración

Para la creación de los modelos de calibración, previamente se ha debido medir la propiedad de interés a través del método de referencia en el conjunto de las muestras y haber tomado su espectro MIR.

También se ha debido realizar primero un PCA para detectar agrupaciones destacadas y *outliers*. Si se detectan agrupaciones severas, se deberían dividir las muestras en grupos y crear modelos independientes, en lugar de emplear todas las muestras para crear un modelo global. En caso de detectar *outliers*, éstos deben ser eliminados del conjunto de calibración para evitar que afecten a la capacidad de predicción del modelo.

Una vez aplicada la regresión PLS al conjunto de calibración para construir el modelo, se evalúa el ajuste del mismo a los datos a través de la raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración (en inglés *Root Mean Square Error of Calibration*, RMSEC), expresada en porcentaje (RMSEC %), y que puede ser definido como el error medio del modelo (Ec.IV.6):

$$RMSEC\% = \frac{100}{y} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \quad \text{Ec. IV.6}$$

donde, N es el número de muestras del conjunto de entrenamiento, y_i es el valor de referencia para la muestra i , \hat{y}_i es el valor predicho para la muestra i , e \bar{y} es la media de los valores de referencia de las muestras de calibración.

Una etapa clave en la creación de los modelos de calibración es la selección del número de factores, o componentes principales, óptimo que asegure su capacidad predictiva sin que se produzca sobreajuste (*overfitting*). Esto se debe a que los factores están jerarquizados, de manera que, cada nuevo factor que añadimos al modelo, describe menos variación sistemática en los espectros y más variación aleatoria o ruido. Por tanto, se deben incluir suficientes factores para modelar la variación sistemática importante, pero no excesivos para evitar incluir demasiado ruido.

De este modo, el sobreajuste tiene lugar cuando el modelo emplea un número de factores superior al número óptimo, describiendo más el ruido de las muestras que información relevante, lo que provoca una mala predicción.

El subajuste (*underfitting*), por el contrario, se produce cuando el número de factores empleados por el modelo es inferior al número óptimo, por lo que no son suficientes para modelar las variaciones relevantes de los espectros y, en consecuencia, no se obtienen buenas predicciones (100).

El número óptimo de factores es particular para cada problema de calibración y depende del tipo de espectro y de la propiedad a predecir. Se determina calculando modelos con distinto número de factores y validando cada modelo. El criterio más simple para la selección del número óptimo de factores de los modelos PLS, que es el que se ha seguido en la presente memoria, consiste en determinar la mínima RMSECV (108, 109), representando éste frente al número de factores del modelo y tomar como óptimo el primer mínimo local o absoluto.

IV.3.5 Validación del modelo de calibración

La raíz cuadrada del error cuadrático medio de validación cruzada (RMSECV), que se emplea para determinar el número óptimo de factores y para validar internamente el modelo por validación cruzada, como se ha comentado anteriormente, se define en porcentaje (RMSECV %) en la Ec.IV.7:

$$RMSECV\% = \frac{100}{\bar{y}} \left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_{CV}}} \right) \quad \text{Ec. IV.7}$$

donde, N_{CV} es el número de muestras de validación cruzada (es decir, $N_{CV} = N$, siendo N el número de muestras del conjunto de calibración, y_i es la medición de referencia, \hat{y}_i es el resultado estimado cuando se construye el modelo sin la muestra i e \bar{y} es la media de los valores de referencia de las muestras de calibración.

La concordancia entre los valores de referencia y los predichos por el modelo en las muestras del conjunto de validación, se realiza a través de la RMSEP, determinada en porcentaje (RMSEP %), cuando se dispone de un conjunto independiente de muestras, no utilizado en la calibración (Ec.IV.8):

$$RMSEP\% = \frac{100}{\bar{y}} \left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \right) \quad \text{Ec. IV.8}$$

donde, N es el número de muestras del conjunto de prueba, y_i es el valor de referencia para la muestra i , y \hat{y}_i es el valor predicho para la muestra i e \bar{y} es la media de los valores de referencia de las muestras de validación. Es el método de validación más objetivo, ya que las muestras de validación no influyen en la calibración del modelo (111).

Tanto la RMSEP como la RMSECV proporcionan una estimación de la exactitud del modelo, facilitando la magnitud del error en las futuras muestras

(112). El concepto de ambos parámetros es el mismo que el del CV% para la creación de los intervalos de confianza de una medida, pudiendo expresar los resultados de las predicciones futuras como "valor predicho $\pm 1.96 \cdot \text{RMSEP} \%$ " (111), para un nivel de confianza del 95%.

Por otro lado, la robustez del modelo se evalúa a través del parámetro de la desviación predictiva residual, RPD, (o *Residual Predictive Deviation*), que se define como el cociente entre la desviación estándar (SD) de las muestras de validación y la RMSEP (113).

De manera general, un valor de RPD inferior a 3.0 se considera pobre, puesto que los modelos no son capaces de modelar adecuadamente la variabilidad de las muestras y sólo pueden aplicarse para una determinación aproximada. Por el contrario, un RPD superior a 3.0 podría considerarse muy satisfactorio para los propósitos de predicción (87, 94), y mayor que 5 sería lo recomendable para aplicaciones en investigación y control de calidad del producto (87, 114).

Mediante la validación del modelo se estudia si existe un error sistemático (*bias*), el cual tiene lugar cuando la diferencia entre los valores los medidos y los predichos por el modelo es significativa.

La presencia de un error sistemático se comprueba mediante el test de la ausencia de sesgo, también llamado test conjunto de pendiente e intercepto (en inglés *joint confidence region test*) que emplea una región de confianza.

Este test realiza una regresión lineal por mínimos cuadrados entre las concentraciones reales (en el eje x), medidas por la técnica de referencia, y las predichas por el modelo multivariante (en el eje y).

Si no existe error sistemático el resultado de esta regresión debería ser una recta de pendiente (b_1) igual a 1 y ordenada en el origen o intercepto (b_0) igual a cero.

El test conjunto de la pendiente y el intercepto comprueba si hay diferencia significativa entre los valores de b_1 y b_0 encontrados y los valores

esperados (1,0) (110). La región de confianza que emplea el test conjunto de pendiente e intercepto toma la forma de una elipse (Figura IV.6) cuyo centro tiene las coordenadas de (b_1, b_0) .

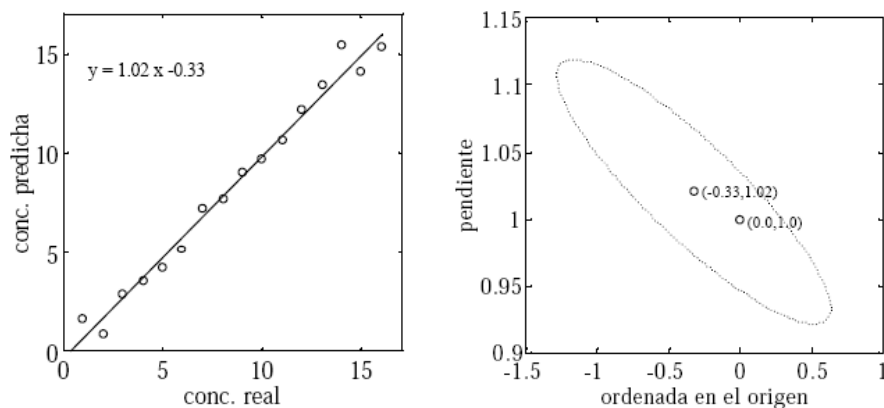


Figura IV.6 Test conjunto de pendiente e intercepto (región de confianza)

Si los valores esperados (1,0) caen dentro de esta elipse, que constituye la región de confianza, significa que el método de referencia y el que emplea el modelo a partir de los espectros FT-MIR, son comparables.

Por último, hay que tener en cuenta también que los valores de referencia empleados en los modelos de calibración tienen una incertidumbre intrínseca asociada, expresada mediante el error estándar de la medida.

Así pues, la validación de los modelos de calibración multivariante que emplean estos valores de referencia, proporciona una sobreestimación sistemática del error de predicción real, denominado *error de predicción aparente*.

Para proporcionar una estimación más real del verdadero error de predicción de los modelos, en la presente memoria se empleó el sencillo procedimiento de corrección propuesto por Faber y Kowalski (115) (Ec.IV.9), que consiste en sustraer el ruido de los valores de referencia del error de predicción cometido por el modelo de calibración:

$$MSEP_{cor} = MSEP_{app} - \hat{\sigma}^2 \quad \text{Ec.IV.9}$$

donde, $MSEP_{cor}$ es el error de predicción corregido de sesgo, $MSEP_{app}$ es el error de predicción aparente (el valor obtenido tras la validación externa del modelo) y $\hat{\sigma}^2$ es la varianza (cuadrado de la desviación estándar) de los resultados de repetitividad del método de referencia, como medida de su error.

IV.4 Parte experimental

IV.4.1 Presentación

Como se ha comentado a lo largo de la presente memoria, para la obtención de vinos tintos de calidad es fundamental la determinación del momento óptimo de la vendimia y éste está determinado por el grado de madurez fenólica de la uva, que constituye la medida de la concentración de los compuestos fenólicos totales y, más en concreto, el balance entre antocianos y taninos de las uvas (116). De hecho, se ha visto que la evaluación de estos parámetros en los controles de maduración de la uva proporciona importante información sobre el color que pueda tener el vino terminado (117).

Las bodegas, conocedoras de ello, realizan rigurosos controles de la madurez fenólica de la uva, no sólo en el viñedo, sino también a la entrada en la bodega para dirigir la vinificación. Por tanto, es fácil imaginar la elevada cantidad de analíticas que se deben llevar a cabo durante la época de vendimia, con una inversión de tiempo y esfuerzo considerables por parte de los analistas, si además la cuantificación de los compuestos fenólicos se realiza mediante espectrofotometría UV-Vis.

Para dar solución a este problema, el trabajo experimental de la presente Tesis Doctoral continuó estudiando la capacidad de la técnica analítica rápida basada en la espectroscopia FT-MIR para evaluar la madurez fenólica de forma eficiente.

Tras el estudio bibliográfico realizado, detallado en la Tabla IV.3, se estableció que la espectroscopia FT-MIR constituía una técnica analítica

rápida, sencilla y fiable que ya había sido empleada, entre otras aplicaciones, para evaluar el estado sanitario de la vendimia (87), así como su madurez tecnológica (84, 89). Sin embargo, la bibliografía existente en el momento de llevar a cabo la parte experimental de la presente Tesis Doctoral presentaba un vacío en lo que se refiere a la aplicación de la espectroscopia FT-MIR en la determinación de la concentración de los compuestos fenólicos en las uvas tintas a lo largo de la maduración fenólica.

Fue por ello que nos marcamos como objetivo utilizar esta técnica, capaz de analizar simultáneamente varios parámetros en menos de un minuto (30 s/muestra), como alternativa a la clásica espectrofotometría UV-Vis para cuantificar el contenido fenólico de las uvas, en términos de polifenoles totales, antocianos totales y taninos condensados.

Además, esta etapa analítica concluiría la optimización del método de evaluación de la madurez fenólica de la uva tinta, que había comenzado en un trabajo anterior con la aceleración del método de extracción de los compuestos fenólicos de las bayas.

Para asegurar la fiabilidad y robustez de los resultados obtenidos, se construyeron modelos de calibración por regresión PLS utilizando diferentes variedades de uva en distintos estadios de madurez fenólica.

Los buenos resultados obtenidos en este estudio dio lugar a un artículo titulado *Application of FT-MIR spectroscopy for a fast control of red grape phenolic ripening* publicado en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (2011) 2175-2183, cuyo original puede encontrarse en el Anexo 4 de la presente Tesis.

Sin embargo, nuestro estudio no concluyó aquí, puesto que, a parte de controlar la calidad de la materia prima, nos interesaba también correlacionarla con la del vino final. De hecho, el seguimiento de la extracción de la fracción fenólica de la pasta de vendimia durante la maceración en las vinificaciones en tinto es esencial para conocer la composición fenólica de los vinos (118-120) y decidir el final de la vinificación (121).

Así pues, tras los buenos resultados obtenidos con la aplicación de la técnica FT-MIR en la cuantificación de los compuestos fenólicos de la uva tinta, en una segunda etapa, el trabajo experimental continuó con la aplicación de esta misma técnica en el análisis de la pasta de vendimia. En este caso, y al igual que en el trabajo precedente, se empleó la regresión PLS y se utilizaron muestras de pasta de uva a lo largo de todo el proceso de vinificación, pertenecientes a distintas variedades y cosechadas en diferentes estados de maduración, para que asegurasen la representatividad de las mismas. Como en el anterior estudio, se empleó la espectrofotometría UV-Vis para medir los valores de referencia de los compuestos fenólicos con los que construir los modelos de calibración.

La sistemática analítica seguida en este estudio, así como los resultados y discusión de los mismos, se recogen en el artículo *Quantification of phenolic compounds along red winemaking using FT-MIR spectroscopy and PLS-regression*, que está siendo revisado para su publicación por la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, y cuyo original puede encontrarse en el Anexo 5 de la presente Tesis.

IV.4.2 Materiales y métodos

En este apartado se detallan las muestras empleadas en cada uno de los dos estudios recogidos en el presente capítulo, dedicando especial atención al número de variedades, puntos de muestreo a lo largo de los procesos estudiados (maduración fenólica de la uva y maceración durante la vinificación) y añadas utilizadas en cada uno de ellos.

Además se detalla el método de extracción empleado para el análisis de las uvas y el protocolo de vinificación utilizado para obtener las muestras de mostos y vinos donde determinar los parámetros fenólicos de interés.

Extractos de uva para el control de la maduración fenólica

Para la obtención de los extractos se recolectaron uvas frescas, en diferentes estadios de maduración, de las variedades tintas Merlot, Tempranillo, Syrah, Garnacha, Cariñena y Cabernet sauvignon, todas ellas

cultivadas en la viña experimental de “Mas dels Frares” de la que dispone la Facultad de Enología de la Universidad Rovira i Virgili en Constantí, a 14 km de Tarragona.

Concretamente, se muestrearon 200 bayas de cada variedad, con una frecuencia semanal desde el final del envero hasta la vendimia, y en tres añadas diferentes (2007, 2008 y 2009).

En todos los casos se siguió el protocolo de muestreo especificado en el apartado III.3.2 del Capítulo III. La única variación la constituyó el hecho de que, en la campaña 2009, no se pudo muestrear la variedad Garnacha porque ese año se arrancaron las viñas para su renovación. En la Figura IV.7 se muestra gráficamente el número de muestras obtenidas para cada variedad recolectada.

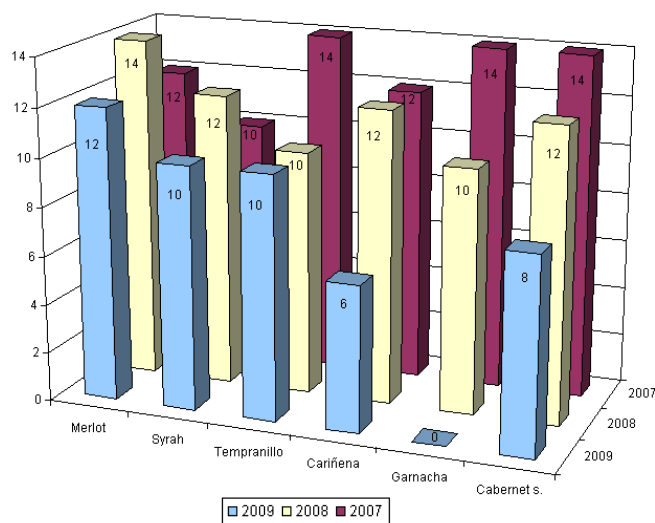


Figura IV.7. Número de muestras por variedad y añada

Las uvas se despalillaron y trituraron a temperatura ambiente usando un homogeneizador de alta velocidad Ultra-Turrax® a 24000 r.p.m. durante 2 minutos. Para evaluar el contenido fenólico de la uva se adoptó el método de extracción optimizado descrito en el Capítulo III (apartado III.3.3.2). De cada muestreo se obtuvieron dos extractos individuales a partir de la maceración del triturado de uva obtenido.

Vinos

Las muestras de vino empleadas para llevar a cabo el segundo estudio, que se presenta en este capítulo, fueron obtenidas a partir del mismo muestreo y protocolo de vinificación que el descrito en el estudio de predicción del color y de la composición fenólica del vino a partir del análisis de uvas (apartado III.3.3.3) del Capítulo III.

En este caso, el muestreo abarcó cinco variedades tintas (Tempranillo, Merlot, Syrah, Cariñena y Cabernet sauvignon) recogidas en diferentes estados de maduración durante el verano de 2009 de la viña experimental “Mas dels Frares”.

Para cada variedad, se muestreó al azar un racimo de las cepas marcadas previamente, combinando las expuestas al sol y a la sombra, hasta obtener aproximadamente 12 Kg de uva, que se transportaron en una caja de 20 Kg hasta el laboratorio para su vinificación.

Así pues, a partir de estas muestras, se realizaron en total 60 vinificaciones (tres vinificaciones individuales de cada variedad muestreada a lo largo de la maduración) que se prolongaron durante 10 días, pudiéndose obtener muestras en diferente grado de fermentación y maceración, desde mostos a vinos.

En la Tabla IV.4 se detallan los números y las fechas de los muestreos, así como los de las vinificaciones, realizados para cada variedad:

Tabla IV.4. Números y fechas de los muestreos realizados a cada variedad de uva para la obtención de vinos

Variedad	Número de muestreos	Número de vinificaciones	Fechas de muestreo				
Syrah	4	12	17-ago	24-ago	31-ago	7-sep	
Merlot	5	15	18-ago	25-ago	1-sep	8-sep	14-sep
Tempranillo	4	12	19-ago	26-ago	2-sep	9-sep	
Cariñena	3	9	27-ago	3-sep	10-sep		
Cabernet sauvignon	4	12	28-ago	4-sep	11-sep	21-sep	

Reactivos y patrones

Los reactivos empleados en estos estudios fueron los mismos que los detallados en el Capítulo III incluyendo, en este caso, el ácido tánico (99.9%), que fue suministrado por Scharlab (Barcelona, España).

Medidas analíticas de referencia

El contenido fenólico de los extractos de uva y los mostos/vinos fue evaluado a través de tres parámetros: compuestos fenólicos totales, antocianos totales y taninos condensados. Los métodos de referencia utilizados para su determinación están basados en la espectrofotometría UV-Vis descritos en el apartado III.4.2 del Capítulo III.

Compuestos fenólicos totales

- Procedimiento

Para la medida de los compuestos fenólicos totales se realizó una dilución 1:50 de los extractos de uva y mostos/vinos en agua destilada y posterior medida de la absorbancia a 280 nm en una cubeta de cuarzo de 10 mm, tras realizar un blanco con agua (122).

- Cuantificación

La medida de la absorbancia a 280 nm de los extractos de uvas y mostos/vinos se interpola en la recta de calibrado construida con ácido gálico como patrón. De este modo, el contenido de compuestos fenólicos totales fue expresado como mg de ácido gálico/Kg de uva en el caso de los extractos de uva (ver Ec.III.18) y como mg de ácido gálico/L para los mostos/vinos.

Antocianos totales

- Procedimiento

Para la medida de los antocianos totales se realizó una dilución 1:25 de los extractos de uva y mostos/vinos en HCl 0.1M y posterior medida de la

absorbancia a 520 nm en una cubeta 10 mm, tras realizar un blanco con HCl 0.1M (123, 124).

- **Cuantificación**

La medida de la absorbancia a 520 nm de los extractos de uvas y mostos/vinos se interpola en la recta de calibrado construida con malvidina-3-glucósido como patrón. El contenido en antocianos totales fue expresado como mg de malvidina-3-glucósido/Kg de uva en el caso de los extractos de uva (ver Ec.III.24) y como mg de malvidina-3-glucósido/L para los mostos/vinos.

Taninos condensados

- **Procedimiento**

La determinación de los taninos condensados en extractos de uvas y mostos/vinos se llevó a cabo utilizando el método indirecto de la precipitación con metil-celulosa (125, 126), mediante la medida de la absorbancia a 280 nm de la solución filtrada y de la de la solución control.

- **Cuantificación**

La diferencia de las medidas de la absorbancia a 280 nm entre la muestra precipitada y la solución control se interpola en una recta de calibrado construida con (+)-catequina como patrón. El contenido de taninos condensados fue expresado como mg de (+)-catequina/Kg de uva en el caso de los extractos de uva (ver Ec.III.26) y como mg de (+)-catequina/L para los mostos/vinos.

Instrumentación

Las uvas fueron homogeneizadas con un homogeneizador de alta velocidad Ultra-Turrax T-18® (IKA, Wilmington, EE.UU.) equipado con un eje de rotación S18N-19G. La centrifugación de las muestras se realizó con una centrifuga Hettich universal 32R (Tuttlingen, Alemania). La absorbancia de los extractos y vinos se determinó mediante un espectrofotómetro UV-Vis Thermo

Spectronic UV-Vis modelo Helios γ (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK).

Todos los espectros de los extractos fueron adquiridos mediante un espectrómetro FT-MIR Nexus 470 (Thermo, EE.UU.), equipado con una fuente IR Global, un divisor de haz de KBr, una celda de flujo de ZnSe de 0.025 mm de paso óptico y un detector de sulfato de triglicina deuterado (DTGS). El equipo se conectó a un automuestreador Bacchus TDI (Gavá, España) con un sistema de limpieza automatizado. El automuestreador bombeaba 10 ml de cada muestra situada en el carrusel, la hacía pasar por un sistema automático de filtrado en línea (con un tamaño de poro de 50 μm), y la dirigía hacia la celda para la adquisición de su espectro, que sólo precisaba 30 segundos por muestra.

Todos los espectros procedían de un promedio de 32 *scans* o medidas tomados en modo absorción, con una resolución de 4 cm^{-1} , en el rango 979-2989 cm^{-1} de número de onda. Para eliminar la posible deriva del equipo a lo largo del tiempo, cada 10 horas, el equipo recogía un espectro ambiental (teniendo en cuenta el vapor de agua, junto con el CO_2) y redefinía el *background*.

Por otra parte, ya que el agua domina el espectro de las muestras líquidas, antes del análisis de cada muestra, el espectrómetro adquiría un espectro de agua destilada como blanco para eliminar las bandas producidas por la absorción del agua en los espectros de las muestras.

La adquisición de espectros se realizó mediante el software OMNIC Thermo Nicolet 6.2. El software utilizado para el análisis de datos y las calibraciones fue Unscrambler 9.0 (CAMO ASA, Noruega).

Experimentos de enriquecimiento

Durante la maduración de la uva, tienen lugar cambios que afectan a la concentración de compuestos químicos distintos a los compuestos fenólicos, como son los azúcares y ácidos orgánicos (127). Por lo tanto, es difícil

determinar qué compuesto o compuestos son responsables de los cambios producidos en la señal espectral.

Para localizar las regiones espectrales asociadas a los compuestos fenólicos se comparó el espectro de un extracto de uva con espectros del mismo extracto de uva enriquecido con cuatro compuestos fenólicos de diferente estructura química.

Así pues, diferentes niveles de concentración (0.5, 1, 1.5, 2 y 5 g/L) de (+)-catequina, de ácido gálico y ácido tánico, así como 5, 7.5, 10 y 25 mg/L de malvidina-3-glucósido, se agregaron a un extracto de uva real.

Las estructuras químicas de los compuestos fenólicos empleados para localizar las bandas de absorción en el IR características de estos compuestos se muestran en la Figura IV.8.

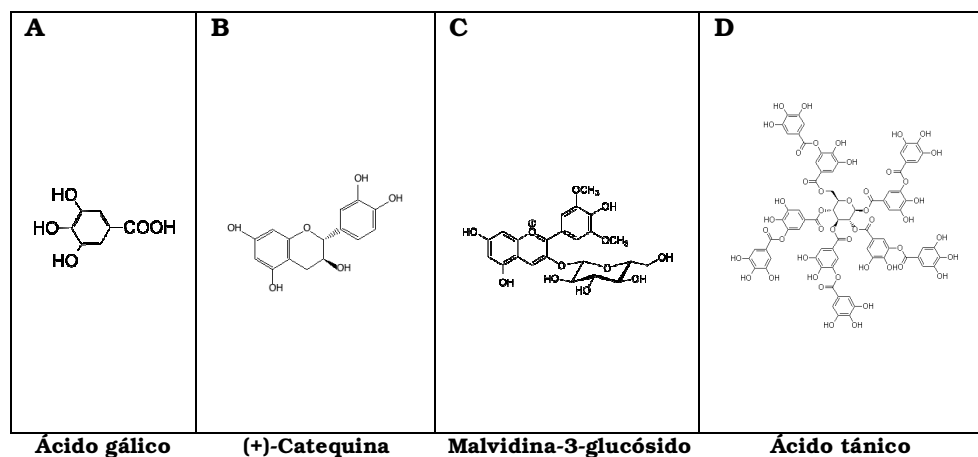


Figura IV.8. Estructuras químicas de los cuatro patrones utilizados para determinar las zonas de absorción de los compuestos fenólicos: ácido gálico (A), (+)-catequina (B), malvidina-3-glucósido (C) y ácido tánico (D)

Desarrollo y validación de los modelos de calibración FT-MIR

El análisis descriptivo de los datos se realizó utilizando el método de Análisis de Componentes Principales (PCA). El PCA fue muy útil para revelar posible agrupaciones de las muestras y para visualizar la presencia de valores atípicos o *outliers* (98). Los *outliers* fueron identificados mediante gráficos de

influencia, ya que presentan una elevada varianza residual y un elevado *leverage*, y posteriormente fueron eliminados de los modelos.

El análisis cuantitativo se realizó utilizando la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)(98), empleando el algoritmo de Kennard-Stone para la distribución de las muestras en los conjuntos de calibración y validación (104), como se ha explicado en el apartado IV.2.3.

El número óptimo de factores en los modelos de calibración PLS se determinó por la menor raíz cuadrada del error cuadrático medio de validación cruzada (RMSECV), empleando el algoritmo *leave-one-out* (98) (ver Ec. IV.7).

En relación con la etapa de calibración, se evaluó el ajuste del modelo a los datos a través de la raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración (RMSEC), expresada en porcentaje (RMSEC %), que puede ser definida como el error medio del modelo (ver Ec.IV.6).

Para comprobar la exactitud de la predicción de los modelos de calibración se emplea la raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción (RMSEP), determinada en porcentaje (RMSEP %) para normalizarlo a la media de los valores observados (ver Ec.IV.8).

Además, para estandarizar la exactitud de la predicción, para cada modelo de predicción también se calculó la desviación predictiva residual (RPD) como el cociente entre la desviación estándar (SD) de las muestras de validación y la RMSEP (113).

Estimación del verdadero error de predicción

Como ya se ha dicho, los valores de referencia empleados en los modelos de calibración, así como los empleados en la validación, tienen de partida una incertidumbre intrínseca asociada, expresada por el error estándar de la medida. Esto hace que la validación de los modelos de calibración multivariante que emplean estos valores de referencia, proporciona una sobreestimación sistemática del error de predicción real, denominado error de predicción aparente.

Para proporcionar una estimación más real del verdadero error de predicción de los modelos FT-MIR, se empleó el sencillo procedimiento de corrección propuesto por Faber y Kowalski (115) (ver Ec. IV.9), que consistió en aislar el ruido de los valores de referencia (expresado por la SD obtenido en los ensayos de repetitividad de los métodos de referencia) del error de predicción cometido por el modelo de calibración.

IV.4.3 Resultados y discusión

IV.4.3.1 Seguimiento de la maduración fenólica de las uvas tintas mediante FT-MIR

En los siguientes apartados se detallan las etapas seguidas para llevar a cabo la construcción y validación de los modelos de calibración PLS que permitieran la cuantificación de los parámetros fenólicos usualmente analizados en los controles de maduración fenólica (compuestos fenólicos totales, antocianos totales y taninos condensados) mediante una metodología rápida de análisis.

Valores de referencia

Para asegurar la representatividad de este estudio, se requería un número elevado de muestras y, sobretodo, que éstas consideraran la máxima variabilidad natural de las uvas desde el punto de vista de su contenido fenólico. Esto se consiguió tras un muestreo perfectamente planificado y minuciosamente llevado a cabo de manera que, tras aplicar el método de extracción establecido a cada una de las distintas muestras, se obtuvieron 192 extractos de uva con distinto contenido fenólico.

La Tabla IV.5 resume el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), contenido de antocianos totales (AT) y taninos condensados (TC) obtenidos mediante el uso de las medidas analíticas de referencia teniendo en cuenta cada variedad por separado y considerando todas las muestras analizadas semanalmente durante el período de Agosto a Octubre.

En ella que podemos ver, por ejemplo, que Cariñena se caracteriza por su bajo contenido tánico, o que las variedades Merlot y Syrah, que son

conocidas por su intenso color, presentaron los valores más altos de AT, mientras que Garnacha, que se caracteriza por ser poco coloreada, presentó el valor más bajo de AT. Sin embargo, se advirtió un comportamiento poco común de la variedad Cabernet sauvignon, porque aunque ésta se considera una variedad de intenso color, presentó un valor bajo de AT. Esto se debió a que la zona de la finca donde crece esta variedad es muy húmeda y el alto nivel de humedad dificulta su adecuada maduración.

Tabla IV.5. Parámetros estadísticos descriptivos para compuestos fenólicos totales (CFT), antocianos totales (AT) y taninos condensados (TC)

Variedad de uva	Muestras	Variable dependiente	Min.	Max.	Media	S.D.
Merlot	38	CFT	1679	2140	1943	117
		AT	843	1296	1021	139
		TC	1771	2921	2435	270
Tempranillo	34	CFT	1625	1996	1812	92
		AT	651	1002	782	103
		TC	2291	3351	2879	247
Syrah	32	CFT	1648	2120	1848	121
		AT	826	1316	1024	142
		TC	1950	2828	2415	178
Cariñena	30	CFT	1005	1196	1092	47
		AT	485	759	639	70
		TC	984	1495	1358	95
Garnacha	24	CFT	1023	1295	1173	82
		AT	348	482	411	41
		TC	1448	2217	1825	260
Cabernet sauvignon	34	CFT	1328	1856	1659	150
		AT	686	883	784	58
		TC	937	2911	2453	479

CFT, compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/Kg); **AT**, antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido/Kg); **TC**, taninos condensados (mg catequina/Kg). **Min.**, valor mínimo; **Max.**, valor máximo; **S.D.**, desviación estándar. Las muestras incluyeron las campañas 2007, 2008 y 2009.

Por su parte, la variedad Tempranillo tampoco está bien adaptada a esta región vitícola, porque acumula pocos antocianos y en cambio muchos más taninos condensados, por lo que no hay un buen equilibrio entre ambos compuestos fenólicos.

Hay que señalar que, dado que las cantidades de los compuestos fenólicos se expresan por kilogramo de uva, las variedades Garnacha y Cariñena presentan las menores concentraciones debido al gran tamaño de sus bayas.

Para proceder con la calibración, los extractos de uva obtenidos se distribuyeron en un conjunto de calibración (n = 106 muestras), con el 55% de las muestras y un conjunto de validación (n = 86 muestras), con el 45% de las muestras (Tabla IV.6).

Tabla IV.6. Parámetros estadísticos para compuestos fenólicos totales (CFT), antocianos totales (AT) y taninos condensados (TC) de los conjuntos de entrenamiento y prueba

	Conjunto de entrenamiento (n = 106)				Conjunto de prueba (n = 86)			
	Min	Max	Media	S.D.	Min	Max	Media	S.D.
CFT	1005	2140	1626	363	1058	2035	1623	315
AT	348	1316	810	258	392	1225	791	184
TC	984	3351	2298	595	1320	2912	2258	487

CFT, compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/Kg); **AT**, antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido/Kg); **TC**, taninos condensados (mg catequina/Kg). **Min.**, valor mínimo; **Max.**, valor máximo; **S.D.**, desviación estándar

Como se puede ver, ambos conjuntos presentan un contenido similar en los compuestos fenólicos estudiados y la mayor desviación estándar se asoció con TC. Este hecho se debe al diferente tamaño (grado de polimerización) de los TC en las uvas en el envero y madurez.

A pesar de que los picos del espectro en las frecuencias MIR son pronunciados y presentan buena resolución, surgieron dos problemas cuando se pretendía estudiar los compuestos fenólicos de los extractos por espectroscopia FT-MIR.

El primero fue que los compuestos fenólicos considerados (antocianos y taninos) tienen grupos funcionales en común y son muy similares químicamente y, por tanto, sus características de absorción en el infrarrojo son parecidas.

El segundo problema fue que el contenido de ácidos orgánicos y azúcares, que son los principales componentes de las uvas, varía a lo largo de maduración y todos ellos absorben en la región *fingerprint*, enmascarando las vibraciones IR propias de los fenoles (11, 13, 17, 19).

Estas características se pueden observar en la Figura IV.9, donde se muestran los espectros FT-MIR de los 192 extractos de uva.

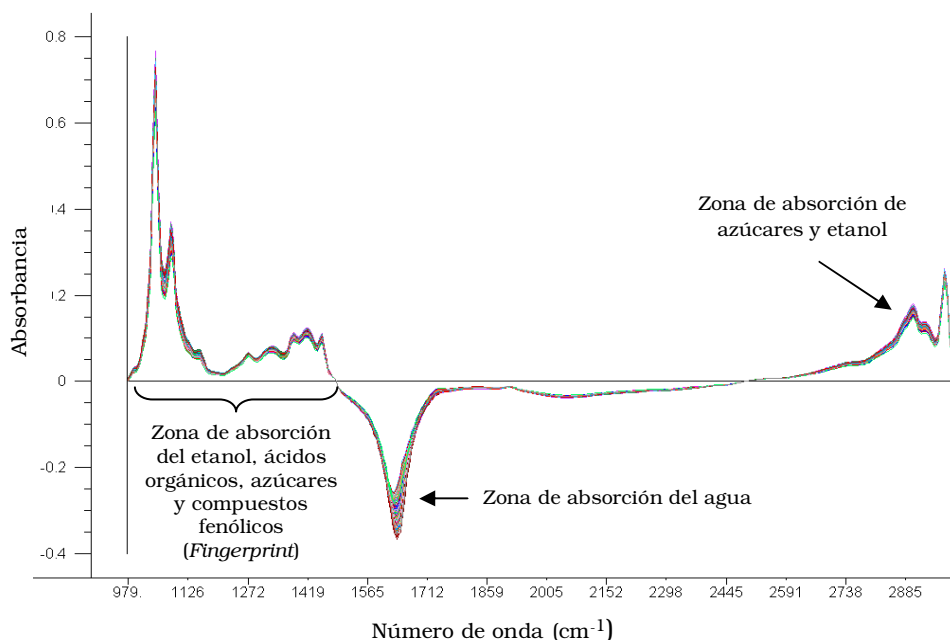


Figura IV.9. Espectros FT-MIR de los 192 extractos (979-2989 cm^{-1})

Como señalan las flechas en la Figura IV.9, el agua y el etanol (añadido en la fase de extracción) dominan los picos de absorción del espectro. En el caso del etanol, las bandas más intensas se encuentran entre 1045-1083 cm^{-1} , debido a la contribución del estiramiento del enlace C-O (oxígeno que pertenece a un alcohol primario).

El estiramiento del enlace C-H produjo otras bandas menos intensas situadas entre 2850-2960 cm^{-1} (13, 18). Para el caso del agua, se puede observar una banda de absorción negativa localizada en la región entre 1500-1740 cm^{-1} . Este pico negativo se debe a la sustracción automática de la absorbancia del blanco acuoso que el equipo hace mediante el uso de agua destilada previo al análisis de las muestras (17).

En relación con otros compuestos presentes en las muestras, en la región entre 900-1200 cm^{-1} se producen las vibraciones de los enlaces C-O y C-O-C de los hidratos de carbono, incluyendo la fructosa y la glucosa (11-13).

Por otra parte, los ácidos orgánicos presentan un grupo funcional alcohol, y, por lo tanto, enlaces C-O y O-H. Estos enlaces absorben alrededor de 1060-1150 cm^{-1} debido al estiramiento del enlace C-O (oxígeno que pertenece a un alcohol secundario), y alrededor de 1320-1420 cm^{-1} debido al extremo O-H (17).

Teniendo en cuenta este gran número de bandas de absorción, no era tarea fácil saber cuáles eran las regiones del espectro donde la absorbían los compuestos fenólicos, a pesar de que se conocían algunas bandas características de los taninos por la bibliografía (ver Tabla IV.1). Por lo tanto, investigamos la respuesta espectral de los compuestos fenólicos mediante la adición de cantidades crecientes de estos compuestos en una muestra real (extracto de uva). Estos compuestos fueron el ácido gálico, (+)-catequina, malvidina-3-glucósido y ácido tánico.

El ácido gálico corresponde al grupo de los ácidos fenólicos (no flavonoide), la catequina al grupo de los flavan-3-ol (flavonoide), la malvidina-3-glucósido al grupo de los antocianos y el ácido tánico al de los taninos

hidrolizables, se trata de un polímero de 8 monómeros de ácido gálico y glucosa.

Hubo efectos notables en la respuesta espectral debida a la dosis, que fueron particularmente evidentes en la región espectral entre 1168-1457 cm^{-1} cuando se añadió ácido gálico (Figura IV.10 A) y ácido tánico (Figura IV.10 C), así como en las regiones espectrales entre 1133-1160 cm^{-1} , 1238- 1322 cm^{-1} y 1373-1457 cm^{-1} cuando se añadió (+)-catequina (Figura IV.10 B).

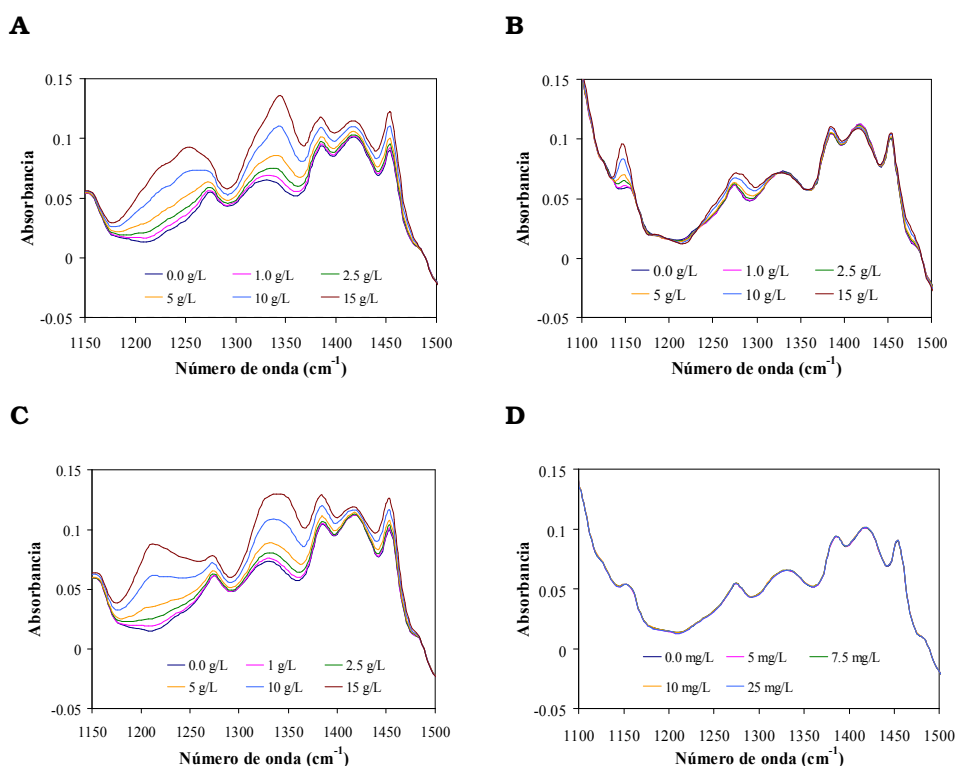


Figura IV.10. Respuesta espectral de diferentes concentraciones de ácido gálico (A), (+)-catequina (B), ácido tánico (C) y malvidina-3-glucósido (D), mediante adiciones a un mismo extracto de uva

Por el contrario, cuando se añadió malvidina-3-glucósido para determinar la región donde absorbían los antocianos, no se detectaron variaciones en el espectro debido a la baja concentración de los patrones comerciales de estos compuestos (Figura IV.10 D).

Por lo tanto, a partir de los resultados del experimento de enriquecimiento, se pudieron determinar las regiones espectrales donde la varianza espectral se debió a la adición de estos compuestos fenólicos, que oscilaron entre 1133-1457 cm^{-1} , mientras que los números de onda restantes (de 979-1129 cm^{-1} , 1457-1477 cm^{-1} y 2649-2989 cm^{-1}) produjeron escasas diferencias entre las señales espectrales.

Dado que estos compuestos fenólicos presentan una composición química y grado de polimerización diferentes, fueron muy útiles para identificar las regiones de los espectros FT-MIR relacionados con la absorción los compuestos fenólicos presentes en la uva y, por tanto, en la selección del número de ondas más adecuado para utilizarlos en la calibración.

Análisis de componentes principales (PCA)

Para llevar a cabo un estudio gráfico sobre la información contenida en el conjunto de datos, se aplicó un PCA considerando la respuesta obtenida al trabajar con todo el rango espectral (979-2989 cm^{-1}).

Los resultados mostraron que los tres primeros componentes principales (CP) eran capaces de explicar el 97.90% de la variación espectral de las muestras (CP1= 60.39%, CP2= 35.05%, CP3= 2.46%). La representación gráfica de la dispersión de las muestras en los dos primeros componentes principales (Figura IV.11) no mostró una agrupación severa de las muestras.

Dicho de otra manera, no se apreció una discriminación de las muestras por variedades o por estados de maduración. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en otros estudios similares (15).

Por otro lado, el gráfico de *loadings* que determina la influencia de cada número de onda en la varianza espectral (Figura IV.12), tal y como ya se esperaba, mostró que las tres zonas de mayor influencia sobre la varianza de los espectros de las muestras coincidía con las tres regiones donde la señal espectral fue mayor: 979-1477 cm^{-1} , 1500-1740 cm^{-1} y 2869-2989 cm^{-1} .

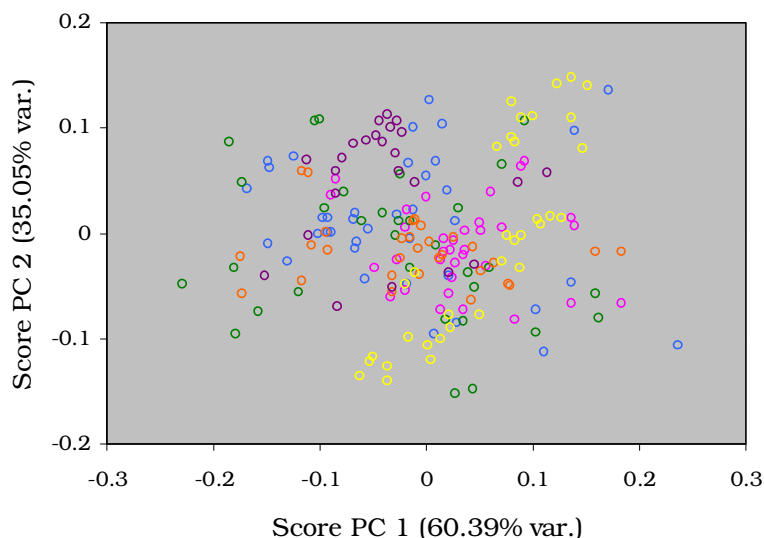


Figura IV.11. Distribución en el espacio de los dos primeros componentes principales de las 192 muestras (extractos de uva). Variedades: \circ Merlot, \circ Tempranillo, \circ Syrah, \circ Cariñena, \circ Garnacha, \circ Cabernet s.

De las tres, la región entre $979\text{-}1477\text{ cm}^{-1}$ contiene casi toda la información que caracteriza las muestras, por lo que se la denominó *fingerprint*. De hecho, un análisis PCA de esta región, mostró que el primer CP explicó el 93.77% de la varianza y que los tres primeros CP's explicaron el 99.41% de la varianza espectral.

En esta zona, las bandas de absorción pueden atribuirse a la flexión en el plano de los enlaces C-H aromáticos ($950\text{-}1225\text{ cm}^{-1}$) y a las vibraciones de tensión C-O de la estructura derivada del anillo pirano ($1230\text{ a }1320\text{ cm}^{-1}$) (21).

En la región espectral entre $1310\text{-}1410\text{ cm}^{-1}$ existe una fuerte absorción de los anillos fenólicos, que refleja el incremento en la concentración de polifenoles (25). Las bandas de absorción en esta región pertenecen probablemente a la deformación C-O-H de los fenoles y al estiramiento C-OH de los anillos aromáticos ($1310\text{-}1390\text{ cm}^{-1}$)(22).

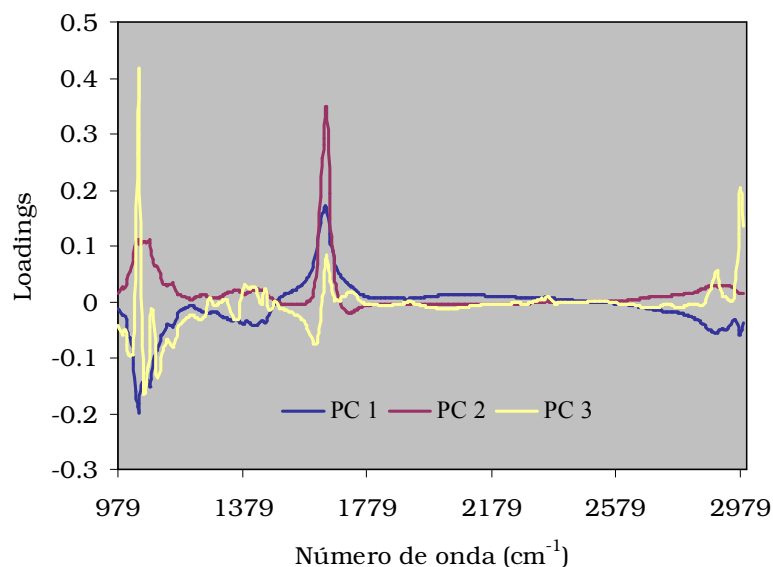


Figura IV.12. Gráfico de loadings de los tres primeros PC's correspondientes a la región completa (979-2989 cm⁻¹) de los espectros

Sin embargo, teniendo en cuenta los resultados del experimento de enriquecimiento, y considerando también que dentro de este rango de número de onda se observaron varias bandas de fuerte absorción, era razonable considerar otros intervalos más pequeños donde hacer la calibración. Así pues, los intervalos que demostraron contener más información fueron el intervalo 1133-1457 cm⁻¹ y el intervalo 1168-1457 cm⁻¹.

Análisis cuantitativo: modelos PLS

Previamente a la construcción del modelo de calibración PLS, se realizó un estudio para evaluar la influencia de diferentes pre-tratamientos de los espectros FT-MIR sobre los parámetros de calibración. En concreto, los pretratamientos empleados fueron la normalización, la corrección de la línea base, la corrección por MSC (*Multiplicative Scattering Correction*), la 1ª y 2ª derivada, así como combinaciones entre algunos de ellos.

Los parámetros de calibración analizados fueron: el número óptimo de factores, el coeficiente de determinación de la calibración (R^2_{cal}), la raíz

cuadrada del error cuadrático medio de calibración (RMSEC %), la raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción (RMSEP %) y la desviación predictiva residual (RPD). Los resultados de los diferentes tratamientos empleados se recogen en la Tabla IV.7 y, como puede verse, la aplicación de los distintos pre-tratamientos no producían mejoras significativas sobre los parámetros estadísticos de calibración respecto a los construidos a partir de los espectros originales sin procesar, confirmando lo que se apuntó anteriormente.

Tabla IV.7. Parámetros de calibración obtenidos aplicando diferentes pre-tratamientos a los espectros FT-MIR

Parámetro	Rango (mg/Kg)	Tratamiento empleado	Factores PLS	R ² _{cal}	RMSEC (%)	RMSEP (%)	RPD
AT	575-1715	Sin pre-tratamiento	10	0.960	5.5	7.9	3.35
		Normalización	9	0.947	6.2	8.9	2.99
		Normalización + 1ª derivada	10	0.975	1.1	7.5	3.53
		<i>Multiplicative Scattering Correction</i>	11	0.948	6.2	8.0	3.31
		2ª derivada	12	0.979	4.0	12.6	2.12
		Corrección línea de base	12	0.969	4.8	7.4	3.57
		Corrección línea de base + Normalización	10	0.944	6.4	8.7	3.05
CFT	4384-11827	Sin pre-tratamiento	9	0.971	4.0	5.8	3.36
		Normalización	10	0.979	3.4	5.3	3.67
		Normalización + 1ª derivada	7	0.968	4.2	5.6	3.50
		<i>Multiplicative Scattering Correction</i>	11	0.974	3.8	6.7	2.94
		2ª derivada	11	0.982	3.1	6.2	3.15
		Corrección línea de base	10	0.976	3.6	5.7	3.41
		Corrección línea de base + Normalización	10	0.966	4.3	5.5	3.53

RMSEC, raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración; **RMSEP**, raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción; **R²_{cal}**, coeficiente de determinación de la calibración; **RPD**, desviación predictiva residual. **AT**, antocianos totales; **CFT**, compuestos fenólicos totales

Frente a estos resultados debidos, principalmente, a que los equipos FT-MIR permiten alcanzar altos niveles de estabilidad de la señal y de reproducibilidad a lo largo del tiempo, se decidió trabajar con los espectros sin pre-tratar lo que resultaba más sencillo y rápido y sin perder capacidad de predicción.

Una vez evaluado el efecto de los distintos tratamientos sobre los datos obtenidos con el FT-MIR, se utilizó el método de regresión PLS para construir distintos modelos de calibración multivariante para llevar a cabo la cuantificación de los compuestos estudiados.

Concretamente, se construyeron cuatro modelos utilizando los cuatro rangos espectrales seleccionados previamente. Los resultados de cada modelo se presentan en la Tabla IV.8. Como puede verse, en la mayoría de los casos, las cuatro regiones probadas dieron lugar a buenos modelos de calibración ($RMSEC \% < 6.0$) para los tres tipos de compuestos fenólicos, los cuales proporcionaron errores de predicción aceptables ($RMSEP \% < 8.0$ y $RPD > 3.0$). Sin embargo, hay que destacar que los mejores resultados se obtuvieron cuando se trabajó con las zonas espectrales seleccionadas a partir de los experimentos de enriquecimiento, con valores de $RPD \geq 3.5$ y $RMSEP \% < 6.5\%$.

Predicción de los compuestos fenólicos totales (CFT)

Para verificar la bondad de los modelos de calibración construidos se comprobó la ausencia de error sistemático o sesgo significativo mediante el test conjunto de pendiente e intercepto.

Con este estudio se pudo concluir que el sesgo no era significativo para ninguno de los cuatro modelos obtenidos. Por esta razón, los resultados de los compuestos fenólicos totales obtenidos con FT-MIR, a partir de los cuatro modelos PLS desarrollados, eran comparables a los de referencia. De hecho, cuando se observa este parámetro fenólico, los valores de $RMSEP \%$ obtenidos resultaron satisfactorios para todas las regiones probadas, si bien, el menor error de calibración y la mejor R^2_{cal} se obtuvieron cuando se utilizó el espectro completo.

Tabla IV.8. Resultados de los modelos PLS para la predicción de los compuestos fenólicos en extractos de uva tinta

Parámetro	Modelo	Región (cm ⁻¹)	106 muestras				86 muestras				
			Factores PLS	RMSEC	RMSEC (%)	R ² _{cal}	RMSEP	RMSEP (%)	R ² _{val}	RMSEP _{cor} (%)	RPD
CFT	Espectro completo	979-2989	13	56.5	3.5	0.976	72.5	4.5	0.946	4.3	4.3
	Fingerprint	979-1477	11	74.7	4.6	0.956	86.9	5.4	0.935	5.3	3.7
	Principal región fenólica Región seleccionada	1133-1457 1168-1457	8 9	83.4 67.3	5.1 4.1	0.947 0.965	85.7 70.6	5.3 4.3	0.930 0.951	5.2 4.1	3.7 4.5
AT	Espectro completo	979-2989	15	28.0	3.4	0.988	38.9	4.9	0.959	4.8	4.8
	Fingerprint	979-1477	10	47.3	5.8	0.966	51.4	6.5	0.930	6.5	3.6
	Principal región fenólica Región seleccionada	1133-1457 1168-1457	9 10	48.3 41.3	6.0 5.0	0.965 0.973	51.1 46.8	6.4 5.9	0.927 0.928	6.4 5.9	3.5 3.5
TC	Espectro completo	979-2989	11	130.6	5.7	0.947	171.6	7.6	0.905	7.5	2.9
	Fingerprint	979-1477	10	121.4	5.3	0.961	179.5	8.0	0.900	7.9	2.9
	Principal región fenólica Región seleccionada	1133-1457 1168-1457	10 9	121.5 128.2	5.3 5.6	0.957 0.953	134.0 130.8	5.9 5.8	0.934 0.937	5.8 5.7	3.7 3.8

RMSEC, raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración; **RMSEP**, raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción; **R²_{cal}**, coeficiente de determinación de la calibración; **R²_{val}**, coeficiente de determinación de la validación; **RMSEP_{cor}**, RMSEP corregido de sesgo; **RPD**, desviación predictora residual. **CFT**, compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/Kg); **AT**, antocianos totales (mg M-3-G/Kg); **TC**, taninos condensados (mg catequina/Kg)

Sin embargo, considerando el número relativamente elevado de factores, junto con la gran diferencia entre los valores de RMSEC y RMSEP, se llegó a la conclusión que este modelo estaba ligeramente sobre-ajustado.

La comparación de los otros tres modelos mostró que el rango 1168-1457 cm^{-1} era el que proporcionaba los mejores resultados, con errores de calibración y predicción inferiores al 5% en ambos casos y con un valor de RPD = 4.5, los cuales garantizaban la robustez del modelo de predicción de los CFT. La Figura IV.13 muestra gráficamente la buena correlación de la predicción de los CFT en la calibración y validación cuando se utilizó la región 1168-1457 cm^{-1} .

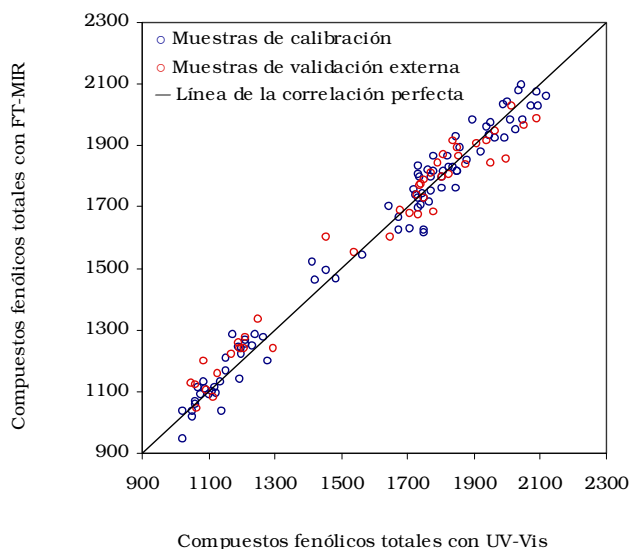


Figura IV.13. Correlación entre los resultados reales y los predichos (con el modelo que emplea la región 1168-1457 cm^{-1}) de los compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/ Kg uva) de las muestras de calibración y validación

Predicción de los antocianos totales (AT)

De manera similar a como se procedió con la predicción de los CFT, para este parámetro fenólico también se hizo un análisis de la región de confianza, el cual mostró que tampoco existía sesgo significativo entre los valores de

referencia y los pronosticados por los cuatro modelos construidos con las cuatro regiones espectrales.

Como se puede observar en la Tabla IV.8, los cuatro intervalos de número de onda probados para la cuantificación de los AT mostraron buenos valores de los parámetros de regresión, con errores de predicción (RMSEP %) ligeramente superiores a los de los CFT.

De los resultados presentados en la Tabla IV.8, se concluye que la mejor predicción de los AT se obtuvo al utilizar todo el rango espectral, ya que este modelo presenta los errores de calibración y predicción más bajos, la mejor R^2_{val} y el valor más alto de RPD. Sin embargo, la diferencia entre la RMSEC % y la RMSEP % es también el más alto, así como el número de factores PLS necesarios para construir los otros modelos. De hecho, los modelos obtenidos utilizando las otras regiones son también muy adecuados, especialmente el obtenido con la región $1168\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$, como puede verse en la Figura IV.14.

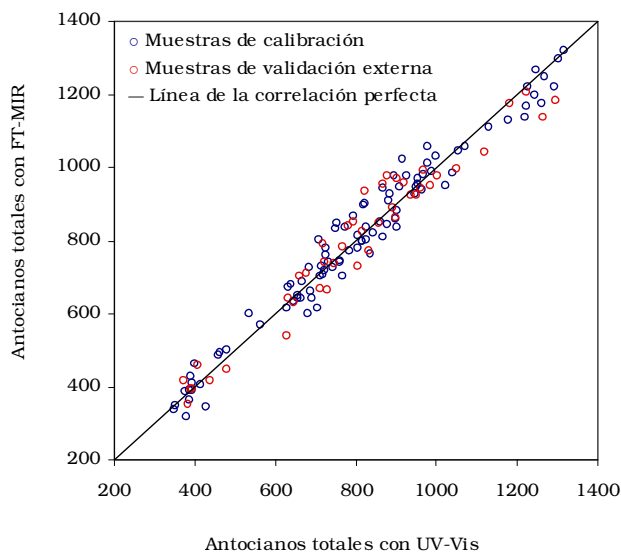


Figura IV.14. Correlación entre los resultados reales y los predichos (con el modelo que emplea la región $1168\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$) de los antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido/Kg uva) de las muestras de calibración y validación

Por otra parte, no debemos olvidar que no fue posible corroborar químicamente las características espectrales de los antocianos y, teniendo en cuenta la heterogeneidad de estos pigmentos por la presencia de antocianos glucosilados, es razonable pensar que la información espectral más relevante no podía coincidir totalmente con las principales frecuencias espectrales de los compuestos fenólicos.

Por lo tanto, para estos compuestos, aunque se obtuvo una buena calibración en la región 1168-1457 cm^{-1} , resultó posible obtener mejores resultados de calibración considerando el espectro completo.

Sin embargo, como se puede apreciar en la Tabla IV.8, para cualquier región del espectro seleccionada, el error de predicción corregido ($\text{RMSEP}_{\text{cor}}$ %), aunque aceptable, fue siempre significativamente más alto que el error estándar del método de referencia, debido a que este último presentó un valor muy bajo (0.73%).

Predicción de los taninos condensados (TC)

Al evaluar los datos de este parámetro, tuvimos que eliminar algunas muestras del conjunto de calibración, ya que se comportaron como datos anómalos (*outliers*). Este comportamiento se podía atribuir, por una parte, al hecho de que el grado de polimerización de estos compuestos podía ser muy diferente dependiendo de las características de la uva y, por otra parte, al hecho de que el valor de este parámetro depende en gran medida del método utilizado en su determinación.

Teniendo en cuenta que la prueba de precipitación con metil-celulosa era un método de medida indirecto y que determinaba únicamente los compuestos fenólicos de gran tamaño, la exactitud de este método, aunque adecuada, podía dificultar la correspondencia con la respuesta espectral.

Una vez que las muestras discrepantes fueron desestimadas, los modelos que se construyeron fueron satisfactorios (Tabla IV.8), y, además, el análisis de la región de confianza para todos los modelos construidos mostró la ausencia de sesgo significativo.

En este caso, se puede observar claramente que la información espectral obtenida químicamente a través del ensayo de enriquecimiento ayudó a obtener los mejores modelos. Así, mientras que las regiones más amplias proporcionaron la predicción menos exacta (con los valores más altos de RMSEP % y los peores de R^2_{val}) y los modelos menos robustos ($\text{RPD} < 3.0$), los modelos obtenidos al trabajar con las regiones que revelaron los experimentos de enriquecimiento, proporcionaron los mejores resultados predictivos, sobre todo cuando se utilizó la región $1168\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$. La Figura IV.15 muestra la buena correlación obtenida de los resultados de TC en las muestras de calibración y validación empleando esta región.

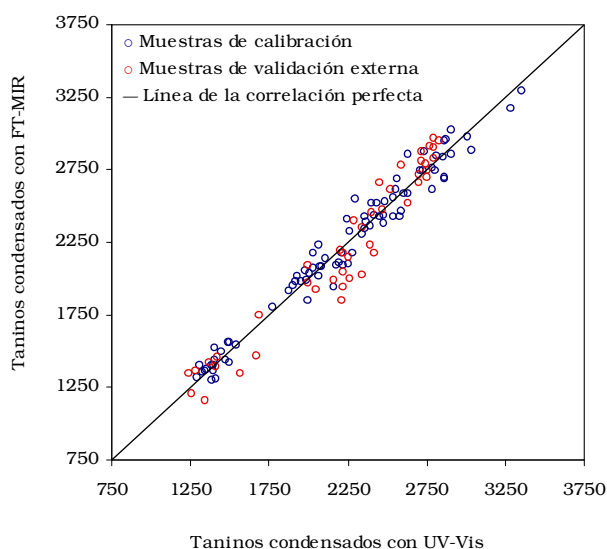


Figura IV.15. Correlación entre los resultados reales y los predichos (con el modelo que emplea la región $1168\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$) de los taninos condensados (mg (+)-catequina/Kg uva) de las muestras de calibración y validación

Como muestran los valores del error de predicción corregido ($\text{RMSEP}_{\text{cor}}$) de la Tabla IV.8, los resultados que se obtuvieron fueron entre cuatro y seis veces el valor del error estándar de referencia (1.27%). Este hecho muestra que los modelos de calibración multivariante raramente proporcionan un error de predicción similar o incluso mejor que el método de referencia, siempre que el método de referencia proporcione una precisión adecuada.

Modelos para variedades de uva individuales

Dados los buenos resultados obtenidos con el conjunto completo de las muestras analizadas y, sobre todo en el rango espectral entre 1168-1457 cm^{-1} , decidimos comprobar la capacidad de la espectroscopia FT-MIR para predecir la composición fenólica, pero ahora trabajando con cada variedad de uva individualmente.

El motivo de diseñar modelos específicos para cada variedad es porque algunas bodegas cultivan un número reducido de variedades, y en consecuencia estos modelos se ajustan más a sus necesidades analíticas.

Para la construcción de los distintos modelos se emplearon todas las muestras pertenecientes a cada variedad. No obstante, teniendo en cuenta que, cuando el número de muestras de calibración no supera las 50, es más conveniente hacer una validación cruzada (111), el parámetro analizado para comprobar la capacidad predictiva de los modelos fue la RMSECV.

Como puede verse en la Tabla IV.9, para todas las variedades de uva el error de calibración (RMSEC %) fue satisfactorio, con valores inferiores a 2.5%.

Las buenas correlaciones entre los espectros y los valores de referencia de los compuestos fenólicos fueron corroboradas con los valores de R^2_{cal} obtenidos, que fueron superiores a 0.96 en todos los casos. Además, hay que destacar también los bajos valores del error de predicción obtenidos por validación cruzada (RMSECV < 4.0%), así como los valores de RPD superiores a 3.0, que proporcionan una idea de la validez más que aceptable de los modelos construidos.

Sólo el modelo de predicción de TC para la variedad Cariñena proporcionó valores poco satisfactorios. Este comportamiento desigual se puede atribuir a la menor varianza de los valores de referencia de TC.

Así pues, aunque los resultados obtenidos fueron satisfactorios para el propósito de crear modelos de calibración por variedades, para obtener modelos más robustos en el futuro, se deberán incluir más muestras de cada variedad, englobando añadas y estados de maduración diferentes.

Tabla IV.9. Resultados de los modelos PLS para la predicción de los compuestos fenólicos en los extractos para cada variedad de uva empleando la región 1168-1457 cm⁻¹

Variedad	Parámetro	Muestras	Factores PLS	RMSEC	RMSEC (%)	R ² _{cal}	RMSECV	RMSECV (%)	R ² _{val}	RPD
Merlot	CFT	27	10	5.0	0.3	0.998	22.7	1.2	0.953	4.7
	AT	29	7	14.6	1.4	0.988	24.2	2.4	0.966	5.5
	TC	21	9	15.8	0.6	0.996	66.7	2.8	0.923	3.7
Tempranillo	CFT	24	8	7.5	0.4	0.992	17.9	1.0	0.954	4.7
	AT	22	7	10.1	1.2	0.992	18.7	2.3	0.971	6.0
	TC	23	6	24.4	0.8	0.989	33.4	1.4	0.979	7.1
Syrah	CFT	24	5	18.1	1.0	0.980	25.6	1.4	0.961	5.2
	AT	30	9	7.7	0.8	0.997	24.2	2.4	0.972	6.1
	TC	22	7	21.0	0.9	0.976	41.7	1.7	0.906	3.3
Cariñena	CFT	20	10	1.8	0.2	0.998	12.7	1.2	0.904	3.3
	AT	26	8	5.1	0.8	0.995	15.4	2.4	0.955	4.8
	TC	20	7	7.3	0.5	0.986	25.0	1.8	0.846	2.6
Garnacha	CFT	20	7	8.1	0.7	0.991	14.9	1.3	0.971	6.0
	AT	20	6	6.1	1.5	0.979	8.5	2.1	0.959	5.1
	TC	22	5	46.8	2.5	0.967	67.2	3.7	0.932	3.9
Cabernet sauvignon	CFT	27	7	13.9	0.8	0.991	23.2	1.4	0.974	6.3
	AT	23	8	7.9	1.0	0.982	16.1	2.1	0.927	3.8
	TC	25	6	45.0	1.8	0.978	73.0	2.9	0.943	4.3

RMSEC, raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración; **RMSECV**, raíz cuadrada del error cuadrático medio de validación cruzada; **R²_{cal}**, coeficiente de determinación de calibración; **R²_{val}**, coeficiente de determinación de validación; **RPD**, desviación predictiva residual. **CFT**, compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/Kg); **AT**, antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido/Kg); **TC**, taninos condensados (mg catequina/Kg)

IV.4.3.2 Seguimiento de la extracción de los compuestos fenólicos durante la vinificación en tinto mediante FT-MIR

El seguimiento de la extracción de la fracción fenólica de la uva durante la maceración en las vinificaciones en tinto es esencial para conocer la proporción de antocianos y taninos que tiene el vino y, por lo tanto, la posibilidad de destinarlo a crianza. De hecho, el contenido de compuestos fenólicos de un vino tinto está marcado por la variedad y estado de maduración de la uva, pero también por el tiempo de maceración empleado en la vinificación.

Para observar en qué magnitud influyen estas variables en la evolución de la composición fenólica durante la vinificación, se analizaron diariamente por espectrofotometría UV-Vis los compuestos fenólicos totales (CFT), los antocianos totales (AT) y los taninos condensados (TC) de los distintos mostos a lo largo de 10 días de maceración durante los cuales tuvo lugar paralelamente la fermentación de los azúcares. Estos mostos pertenecían a las variedades Syrah, Merlot, Tempranillo, Cariñena y Cabernet sauvignon, muestreadas en diferentes estados de maduración.

Además de realizar los análisis con los métodos espectrofotométricos habituales a la muestra de mosto/vino, se tomó su espectro FT-MIR para realizar las calibraciones posteriores.

La Figura IV.16, muestra que los antocianos totales (AT) comenzaron a extraerse con relativa facilidad cuando el medio aún era acuoso, de ahí que el crecimiento exponencial del contenido de AT tuviese lugar en los primeros 3 días. De hecho, la extracción máxima de antocianos tuvo lugar en pocos días, entre el cuarto y el sexto día de vinificación (en plena fermentación), y luego disminuyó debido posiblemente a la oxidación, la precipitación y los fenómenos de adsorción (128).

Estos resultados son similares a los hallados en otro estudio (119), donde las cantidades máximas de antocianos totales y de color (IC) se alcanzaron durante la primera mitad de la vinificación tradicional, entre el cuarto y quinto día.

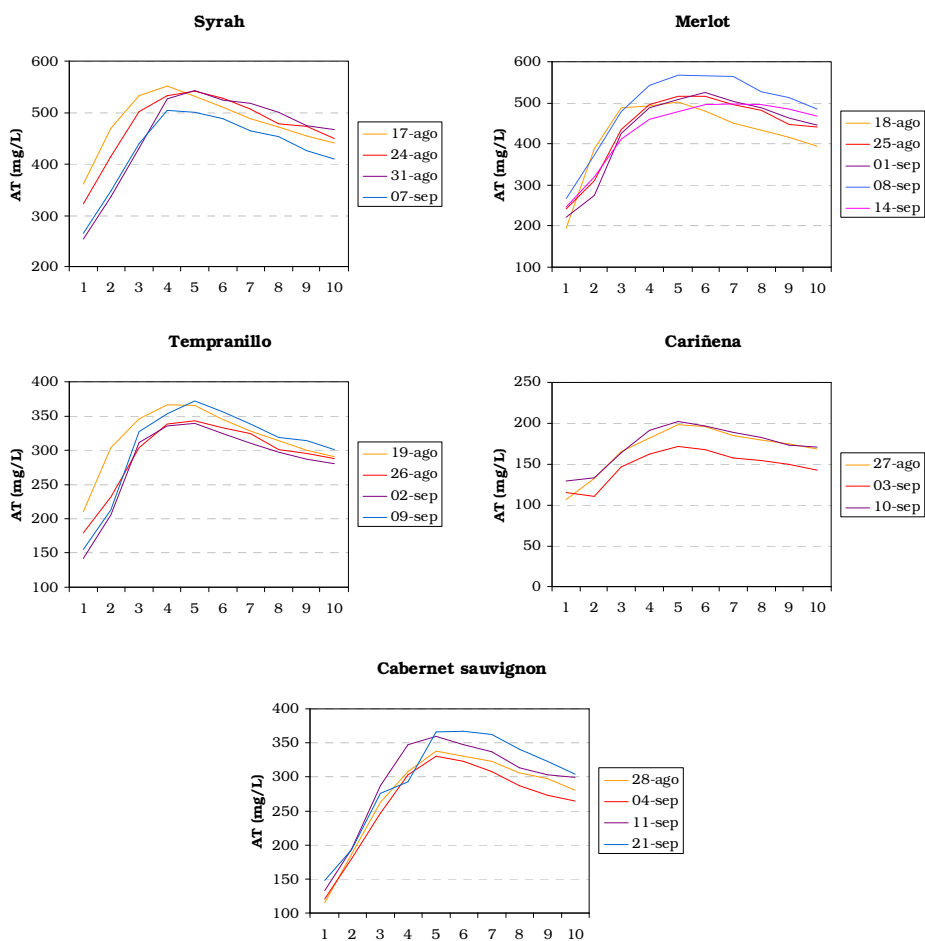


Figura IV.16. Evolución de la concentración de antocianos totales (AT), expresada en mg malvidina-3-glucósido/L de las 5 variedades de uva muestreadas en diferentes estados de maduración a lo largo de 10 días de vinificación

Por otro lado, también se observó que la prolongación del tiempo de maceración no aumentaba el color del vino (IC) (Figura IV.17), de hecho descendió en la segunda mitad de la vinificación, entre el sexto y décimo día (durante la maceración post-fermentativa).

Por el contrario, los compuestos fenólicos totales (CFT) se extraen más lentamente debido a que se disuelven mejor en un medio etanólico (Figura IV.18).

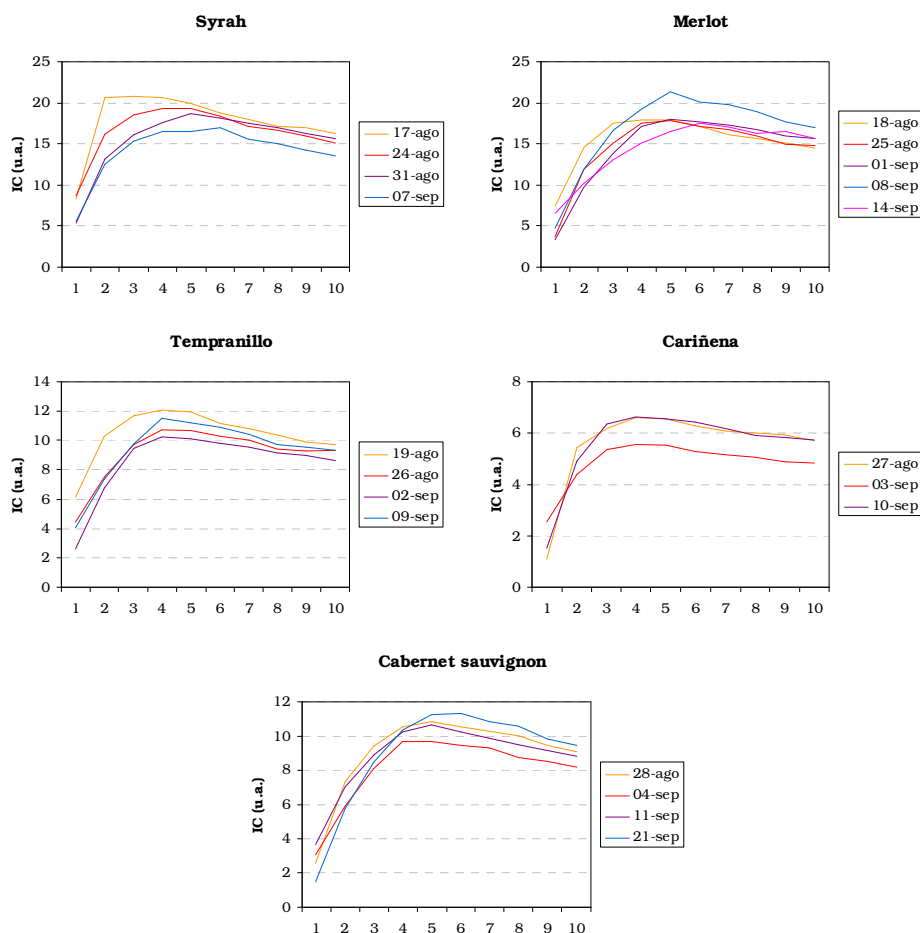


Figura IV.17. Evolución de la intensidad colorante (IC), expresada en unidades de absorbancia (u.a.) de las 5 variedades de uva muestreadas en diferentes estados de maduración a lo largo de 10 días de vinificación

La presencia de etanol favorece la extracción de los CFT de las pepitas, principalmente, los taninos condensados (TC). Así, mientras que el contenido de AT se estabilizó a partir del sexto día de maceración, el contenido de CFT se estabilizó alrededor del octavo día. Esto significa que el mejor momento para el descube se sitúa a partir del octavo día, cuando el contenido de CFT se estabiliza.

La extensión indefinida del tiempo de maceración no produce una mayor extracción de antocianos, sin embargo, se protege el color del vino.

La copigmentación y las reacciones entre antocianos y taninos son dos fenómenos que pueden explicar esta estabilización del color del vino.

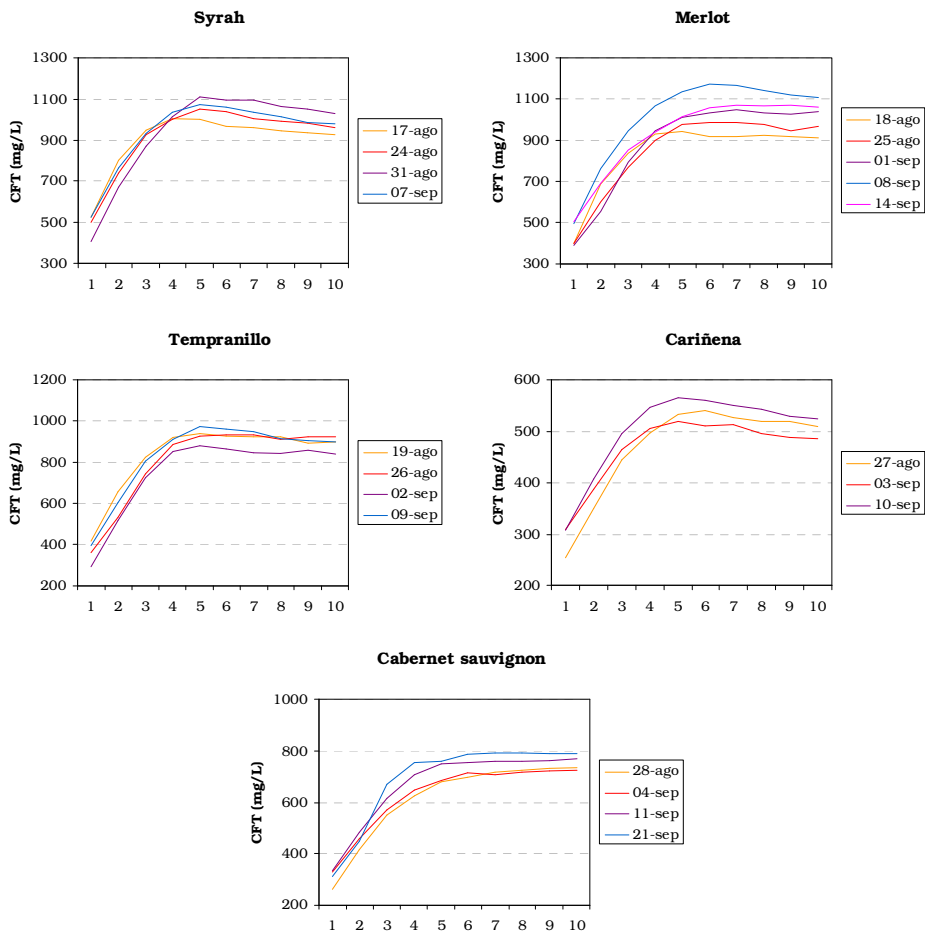


Figura IV.18. Evolución de la concentración de compuestos fenólicos totales (CFT), expresada en mg ácido gálico/L de las 5 variedades de uva muestreadas en diferentes estados de maduración a lo largo de 10 días de vinificación

Así, los vinos elaborados con uvas pobres en CFT, que actúan como copigmentos, no producirán mucha copigmentación (por ejemplo, Tempranillo, Cabernet sauvignon y Cariñena). Los vinos elaborados a partir de uvas con un alto contenido en compuestos fenólicos (Syrah y Merlot) formarán más copigmentación, proporcionando más tonos azules y morados característicos de una copigmentación significativa.

La Figura IV.19 muestra la evolución de los taninos condensados (TC) a lo largo de las vinificaciones.

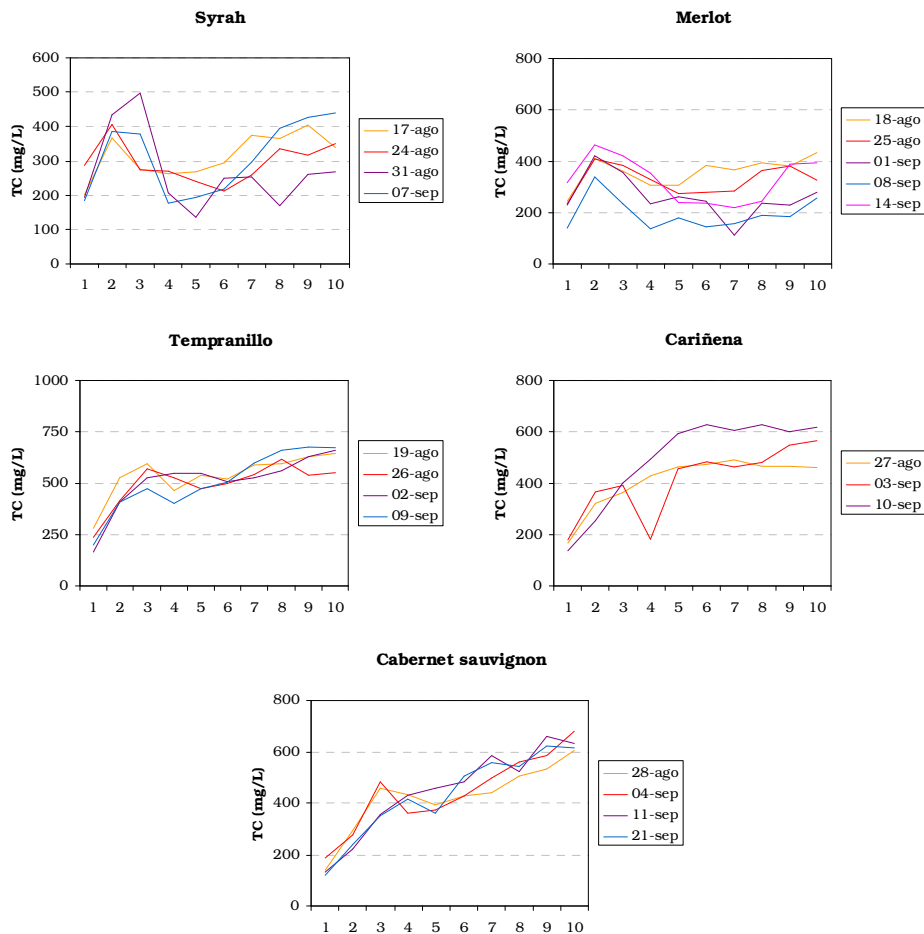


Figura IV.19. Evolución de la concentración de taninos condensados (TC), expresada en mg catequina/L de las 5 variedades de uva muestreadas en diferentes estados de maduración a lo largo de 10 días de vinificación

Son llamativas las fluctuaciones que se producen a lo largo de las vinificaciones y las diferentes tendencias entre variedades, por lo que este comportamiento tan dispar no proporciona resultados concluyentes. Es posible que la forma aserrada de las gráficas pueda deberse a diversos fenómenos que ocurren paralelamente durante la maceración: el de extracción, que incrementa la concentración de TC, y los de polimerización y precipitación,

este último favorecido por las proteínas liberadas (129), que hacen disminuir la concentración de taninos condensados.

Además, la tendencia de los primeros tres días (picos máximos de extracción) coincide con la de los antocianos, lo que pone de manifiesto que los taninos de las pieles se extraen fácilmente cuando el medio es acuoso, y más tarde, cuando el medio se convierte en etanólico, se disuelven los de las pepitas.

Valores de referencia de los compuestos fenólicos para la calibración

Después de realizar el muestreo de los racimos, que consideró la mayor variabilidad natural posible de contenido fenólico en la uva en función de la variedad y estado de maduración, se llevó a cabo la vinificación según el procedimiento descrito en el Capítulo III.

En total se obtuvieron 600 muestras pertenecientes a 60 vinificaciones (tres vinificaciones individuales de cada muestreo), de las que diariamente, a lo largo de 10 días, se tomó una muestra y se analizó.

Estas muestras se distribuyeron en un conjunto de calibración ($n = 400$ muestras) y un conjunto de validación ($n = 200$ muestras) aplicando el algoritmo de Kennard-Stone (104), de manera que el conjunto de calibración incluyera muestras que cubriesen todo el rango de concentración para cada parámetro estudiado.

La Tabla IV.10 resume el contenido de compuestos fenólicos totales (CFT), contenido de antocianos totales (AT) y taninos condensados (TC) obtenido mediante las medidas analíticas de referencia de las vinificaciones de cada variedad a lo largo de todo el proceso de maceración.

En ella se puede apreciar la amplia variabilidad de los resultados sobre la composición fenólica que se produce durante la vinificación, observándose la mayor desviación estándar en el caso de los CFT y TC. Por el contrario, el parámetro que mostró una desviación estándar más baja fue el de los AT.

Tabla IV.10. Parámetros descriptivos de los compuestos fenólicos totales (CFT), antocianos totales (AT) y taninos condensados (TC) de cada variedad

Variedad de uva	Muestras	Parámetro	Min.	Max.	Media	S.D.
Syrah	120	CFT	391	1122	921	183
		AT	238	566	461	74
		TC	80	521	297	96
Merlot	150	CFT	378	1189	896	216
		AT	192	577	444	93
		TC	84	502	294	95
Tempranillo	120	CFT	278	1010	801	192
		AT	119	384	300	57
		TC	139	761	513	128
Cariñena	90	CFT	250	582	476	89
		AT	98	208	163	27
		TC	100	664	440	143
Cabernet sauvignon	120	CFT	252	904	638	165
		AT	99	377	282	70
		TC	91	690	437	150

S.D., desviación estándar; **CFT**, compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/L); **AT**, antocianos totales (mg malvidina-3-glucósido/L); **TC**, taninos condensados (mg catequina/L)

Recordemos que la desviación estándar de los valores de referencia de las muestras repercute directamente en el valor de RPD, de manera que cuanto mayor sea la desviación estándar de las muestras de referencia, más robusto debería ser el modelo.

Espectros de mostos y vinos

Como ocurría en el estudio anterior sobre el control de la maduración fenólica con FT-MIR, cuando se analizaron los compuestos fenólicos en mostos y vinos por espectroscopia FT-MIR, éstos producían absorciones MIR muy similares y en las mismas regiones. Además, en este caso, nos encontrábamos con otro problema adicional y es que el proceso de vinificación implica el consumo de azúcares y la aparición de etanol durante el proceso de fermentación, junto con la disolución de los compuestos fenólicos en el mosto en fermentación.

Por otro lado, las vinificaciones incluían uvas en diferente estado de maduración, por lo que también se producían diferencias en la concentración de azúcares, ácidos orgánicos y compuestos fenólicos. Todas estas variaciones en la matriz de la muestra complicaban la calibración, al enmascarar las vibraciones MIR características de los compuestos fenólicos (11, 13, 17, 19).

Estas características se pueden comprobar en la Figura IV.20, donde se muestran los espectros FT-MIR de las 600 muestras obtenidas diariamente a lo largo de las fermentaciones.

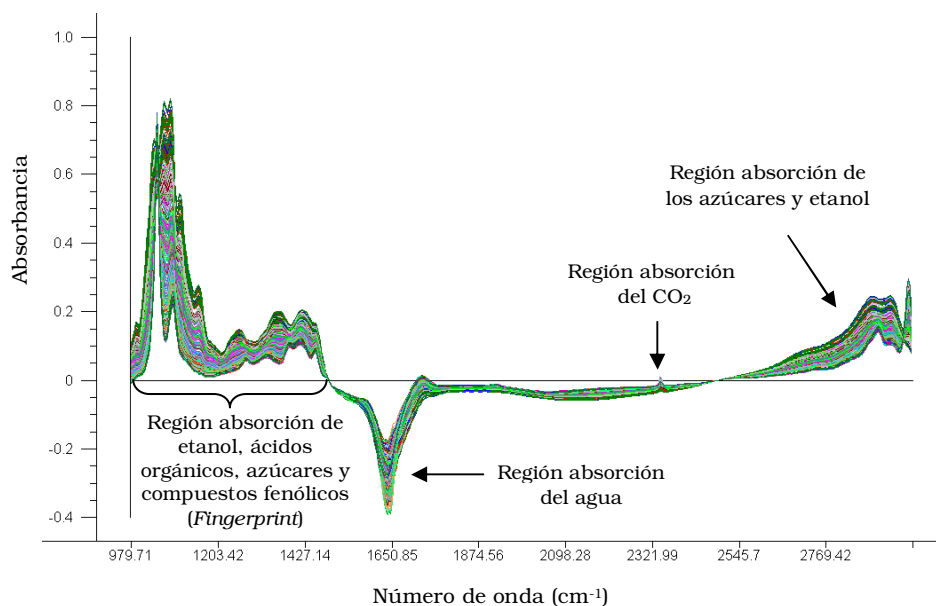


Figura IV.20. Espectros FT-MIR de las 600 muestras (mostos y vinos)

Las bandas de absorción producidas por la fermentación de los mostos se manifestaron entre 979-1477 cm^{-1} , dentro de la región *fingerprint*, y en la región 2599-2989 cm^{-1} dentro de la región de *grupo funcional*.

Basándonos en las referencias bibliográficas existentes sobre el seguimiento de la fermentación con FT-MIR, los picos producidos a 1045 cm^{-1} y 1083 cm^{-1} se debieron al estiramiento C-O del alcohol primario (16, 18, 27) presente en el etanol.

Así mismo, los picos localizados a 2904 y 2981 cm^{-1} se debieron al estiramiento C-H de los CH_2 y CH_3 (13, 16, 18, 27) y a las vibraciones CH_2 (15) de este mismo compuesto.

También la banda entre 1056-1110 cm^{-1} tuvo mucha influencia sobre la varianza espectral, y esta banda se asoció con los enlaces O-H de los grupos alcohol secundarios que presentan los ácidos orgánicos (17).

Los picos localizados a 991, 1037, 1064, 1080, 1103, 1153, 2885 y 2935 cm^{-1} se asociaron con la desaparición de los azúcares y facilitaron la diferenciación entre espectros.

Estos picos se debieron a las vibraciones del enlace C-O, y a los estiramientos del enlace C-O-C (11-15), a los estiramientos del enlace C-OH (16) y los grupos aldehído (1).

En la Figura IV.21 se muestran los espectros FT-MIR del seguimiento diario de la fermentación durante los primeros 4 días, donde se aprecian los picos característicos de la fermentación.

El pico producido a 2350 cm^{-1} se debió a la absorción del CO_2 (28), mientras que la banda de absorción negativa entre 1500-1740 cm^{-1} , como ya se apuntó anteriormente, se produjo por la sustracción automática del blanco que realiza el equipo antes del análisis de las muestras.

Ambas regiones no contienen información útil por lo que se eliminaron de los datos espectrales para los propósitos de calibración.

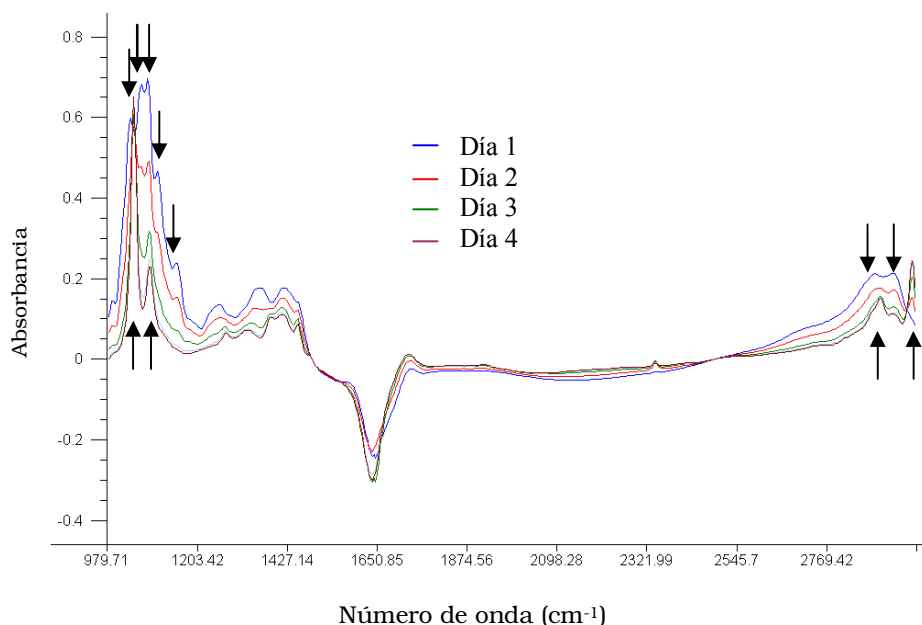


Figura IV.21. Espectros FT-MIR del seguimiento diario de la fermentación durante los 4 primeros días. Principales picos de la glucosa (\downarrow): 991, 1037, 1064, 1080, 1103, 1153, 2885 y 2935 cm^{-1} . Principales picos del etanol (\uparrow): 1045, 1083, 2904 y 2981 cm^{-1}

Análisis de componentes principales

Para llevar a cabo un estudio de la información contenida en el conjunto de datos espectrales, se aplicó un PCA considerando la respuesta obtenida al trabajar con todo el rango espectral (979-2989 cm^{-1}). Los resultados mostraron que los tres componentes principales (CP), explicaban el 99.68% de la variación espectral de las muestras (CP1= 96.78%, CP2 = 2.41%, CP3= 0.50%).

En la Figura IV.22 se muestran los *scores* sobre los dos primeros componentes principales, en los cuales se observa que las muestras pertenecientes a diferentes momentos de vinificación se distribuyeron a lo largo del CP1.

Las muestras de mosto durante los primeros días de fermentación, desde el día 1 hasta el día 6, se mostraron claramente diferenciadas del resto. Cuando los vinos terminaron la fermentación, entre los días 7 y 10, las diferencias ya no fueron tan evidentes y estas muestras aparecieron concentradas (parte izquierda del gráfico).

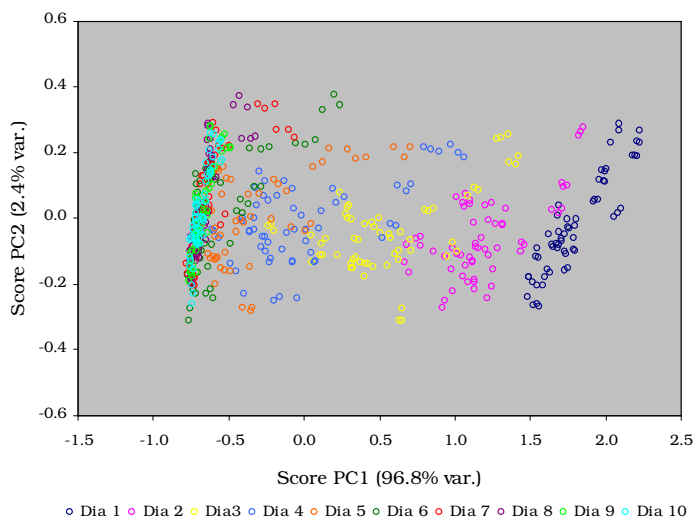


Figura IV.22. Distribución en el espacio de los dos primeros componentes principales de las 600 muestras (mostos y vinos) en función del día de maceración

En la Figura IV.23 se muestran los scores sobre los dos primeros componentes principales, pero esta vez se observa que las muestras pertenecientes a diferentes variedades se distribuyeron a lo largo del CP2.



Figura IV.23. Distribución en el espacio de los dos primeros componentes principales de las 600 muestras (mostos y vinos) en función de la variedad.

Variedades: ○ Merlot, ○ Tempranillo, ○ Syrah, ○ Cariñena, ○ Cabernet s.

Por tanto, a partir de estos resultados se pudo concluir que las diferencias entre las muestras se debían, principalmente, al momento de vinificación, y no tanto a las variedades.

Como se señaló en el trabajo anterior, la región $979\text{-}1477\text{ cm}^{-1}$ contiene casi toda la información que caracteriza las muestras, pues es la zona MIR donde absorben de manera característica los diferentes grupos funcionales de las moléculas (*fingerprint*). De hecho, el análisis PCA utilizando la región *fingerprint* mostró que el primer CP, explicó el 98.76% de la varianza espectral en esta región, y que los tres primeros CP explicaron el 99.98%. Por lo tanto, se consideró que esta región era muy útil para realizar la calibración. Las demás regiones fueron descartadas para evitar ruido en el cálculo.

Dados los buenos resultados de calibración que ofrecieron las regiones empleadas en la creación de los modelos PLS para el seguimiento de la maduración fenólica con FT-MIR, se decidió emplear las mismas regiones espectrales para crear los modelos que permitiesen el seguimiento de la maceración.

Así pues, se construyeron en total cuatro modelos de calibración para la cuantificación de los compuestos fenólicos empleando cuatro rangos espectrales diferentes: $979\text{-}2989\text{ cm}^{-1}$ (rango completo), $979\text{-}1477\text{ cm}^{-1}$ (región *fingerprint*), $1133\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$ (principal región fenólica) y $1168\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$ (región seleccionada), descartando las demás regiones por considerar que no contenían información útil.

Análisis cuantitativo: modelos PLS

Como en el trabajo anterior, se utilizó el método de regresión PLS para la construcción de los modelos de calibración multivariante a partir de los espectros FT-MIR (utilizando los número de onda de cuatro regiones seleccionadas) y los valores de concentración de compuestos fenólicos totales (CFT), antocianos totales (AT) y taninos condensados (TC) de referencia (ver Tabla IV.10), obtenidos mediante las analíticas detalladas en el Capítulo III.

Con las 400 muestras del conjunto de calibración se construyeron 4 modelos mediante regresión PLS empleando las regiones anteriormente comentadas ($979\text{-}2989\text{ cm}^{-1}$; $1457\text{-}1477\text{ cm}^{-1}$; $1133\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$ y $1168\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$), para la predicción de CFT, AT y TC. La presencia de muestras discrepantes se analizó mediante medidas de la importancia de los objetos (*leverage*) en el conjunto de calibración y mediante los residuales

Los modelos de calibración construidos se validaron externamente con el conjunto de 200 muestras para comprobar su capacidad predictiva.

La Tabla IV.11 recoge los parámetros de calibración de los modelos PLS creados para la predicción cuantitativa de los compuestos fenólicos durante la fermentación a partir de los datos espectrales.

En la mayoría de los casos, las cuatro regiones probadas proporcionaron buenos modelos de calibración para los CFT y AT, ya que los análisis de TC no presentaron resultados satisfactorios.

En cualquier caso, cabe destacar que cuando se utiliza la región completa ($979\text{-}2989\text{ cm}^{-1}$) es necesario un elevado número de factores para construir los modelos de calibración de los tres parámetros.

Esto es debido a la presencia de la región del agua, que aporta información redundante (alta varianza espectral no correlacionada), lo que requiere un mayor número de factores PLS para modelar.

Predicción de los compuestos fenólicos totales (CFT)

Dado que los datos correspondientes a la medida de este parámetro mostraban ausencia de sesgo significativo entre los valores de referencia y los valores pronosticados, se procedió con la verificación del buen funcionamiento de los modelos desarrollados.

Para la predicción de los CFT, los modelos construidos usando las regiones “*fingerprint*” ($979\text{-}1477\text{ cm}^{-1}$) y “principal región fenólica” ($1133\text{-}1457\text{ cm}^{-1}$), presentaron los mejores resultados de calibración, con las mayores R^2_{val} y RPD, y las menores RMSEP % (5.8%).

Tabla IV. 11. Resultados de los modelos de calibración obtenidos para los compuestos fenólicos en mostos/vinos

Parámetro	Modelo	Región (cm ⁻¹)	Factores PLS	RMSEC	RMSEC (%)	R ² cal	RMSEP	RMSEP (%)	R ² val	RMSEP _{cor} (%)	RPD
CFT	Espectro completo	979-2989	9	48.6	6.2	0.956	52.0	7.0	0.958	6.9	4.9
	Fingerprint	979-1477	10	39.2	5.0	0.972	42.4	5.7	0.972	5.6	6.0
	Principal región fenólica	1133-1457	9	39.4	5.1	0.971	43.0	5.8	0.971	5.7	5.9
	Región seleccionada	1168-1457	9	40.4	5.2	0.970	45.7	6.1	0.967	6.1	5.5
	Espectro completo	979-2989	10	31.9	9.1	0.936	39.2	11.8	0.912	11.8	3.3
	Fingerprint	979-1477	12	20.6	5.9	0.973	25.1	7.5	0.963	7.5	5.2
AT	Principal región fenólica	1133-1457	9	25.1	7.2	0.960	28.6	8.6	0.952	8.6	4.6
	Región seleccionada	1168-1457	9	25.0	7.2	0.960	29.4	8.8	0.950	8.8	4.5
	Espectro completo	979-2989	15	57.7	14.8	0.858	70.6	18.2	0.777	*	2.1
TC	Fingerprint	979-1477	13	64.0	16.4	0.822	66.9	17.4	0.799	*	2.2
	Principal región fenólica	1133-1457	15	62.5	15.9	0.830	71.2	18.4	0.772	*	2.1
	Región seleccionada	1168-1457	13	63.8	16.3	0.824	77.8	20.1	0.728	*	1.9

RMSEC, raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración; **R²cal**, coeficiente de determinación de calibración; **RMSEP**, raíz cuadrada del error cuadrático medio de predicción; **R²val**, coeficiente de determinación de validación; **RMSEP_{cor}**: RMSEP corregido de sesgo; **RPD**, desviación predictiva residual. * No fue posible calcular este valor como corrección del RMSEP% debido a los valores negativos dentro de las raíces cuadradas. **CFT**, compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/L); **AT**, antocianos totales (mg malvídina-3-glucosido/L); **TC**, taninos condensados (mg catequina/L).

Sin embargo, teniendo en cuenta que el número de factores es clave para seleccionar el modelo más apropiado, ya que refleja que la región seleccionada contiene la información más útil, puede verse que la región “principal región fenólica” era algo mejor que la “*fingerprint*” por requerir un factor menos para modelar. En cualquier caso, todos los modelos construidos presentaron valores de error de predicción inferiores a los obtenidos en el anterior trabajo de seguimiento de la maceración con FT-MIR (27), 245 mg/L.

La Figura IV.24 muestra gráficamente la buena correlación de los CFT en la calibración y la validación cuando se utilizó la región “*fingerprint*” (979-1477 cm^{-1}).

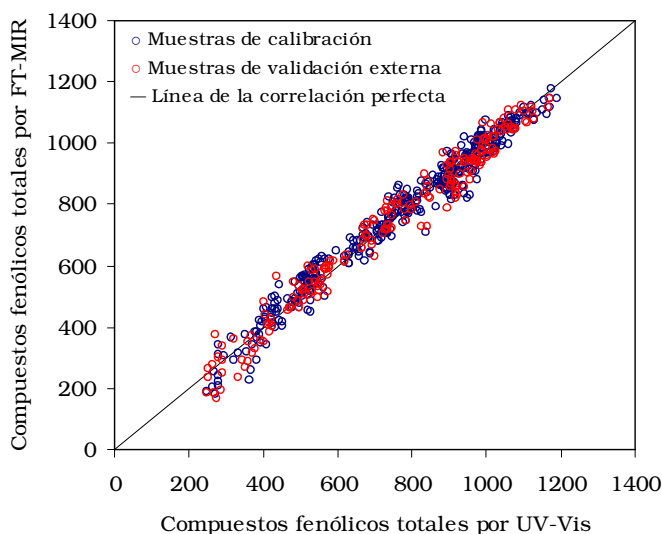


Figura IV.24. Correlación entre los resultados reales y los predichos con el modelo que emplea la región 979-1477 cm^{-1} de los compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/L) de las muestras de calibración y validación

El test conjunto de pendiente e intercepto mostró ausencia de sesgo significativo entre los resultados reales y los pronosticados por los cuatro modelos FT-MIR, resultando comparables.

La desviación estándar relativa (rsd%) del método de cuantificación de los CFT que se obtuvo fue 1.02%. Cuando se realizó la corrección de la RMSEP mediante la sustracción de la varianza del método de referencia, el valor de

RMSEP_{cor} que se obtuvo fue 5.7%, que fue comparable al error de predicción antes de la corrección (5.8%). Estos valores mostraron la validez del método de referencia.

Predicción de los antocianos totales (AT)

Para este parámetro, el análisis de la región de confianza mostró que el modelo desarrollado empleando el rango espectral completo (979-2989 cm⁻¹) no presentaba resultados comparables a los valores de referencia, es decir, que existía un sesgo significativo que causaba esta diferencia (Tabla IV.12). Por esta razón, para la predicción de los AT es preferible recurrir a los otros tres modelos.

Tabla IV.12. Resultados del test conjunto de pendiente e intercepto de los 4 modelos de calibración construidos para los antocianos totales (AT) en mostos/vinos

Parámetro	Modelo	Región (cm ⁻¹)	F calculado	F tabulado
AT (mg M-3-G/L)	Espectro completo	979-2989	4.02	3.04
	<i>Fingerprint</i>	979-1477	3.02	3.04
	Principal región fenólica	1133-1457	2.64	3.04
	Región seleccionada	1168-1457	1.45	3.04

* Nivel de significancia (α) = 0.05

El modelo desarrollado usando la región "*fingerprint*" presentó los mayores R²_{val} (0.963) y RPD (5.2), así como la menor RMSEP % (7.5%), y por ello es el que se muestra en la Figura IV.25.

Los valores de RMSEP obtenidos para los modelos de calibración fueron del orden del error de predicción del anterior trabajo de seguimiento de la maceración con FT-MIR (27) (32.2 mg/L). La desviación estándar relativa (rsd%) de la cuantificación de los AT por el método de referencia fue de 0.25%. Para cualquier región seleccionada, los valores de RMSEP_{cor} que se obtuvieron, aunque aceptables, fueron siempre significativamente mayores que el error estándar del método de referencia, debido al valor tan bajo de éste último.

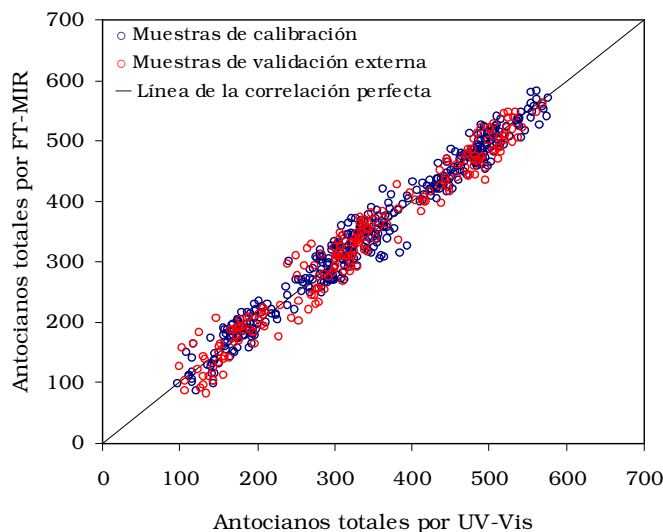


Figura IV.25. Correlación entre los resultados reales y los predichos con el modelo que emplea la región 979-1477 cm^{-1} de los antocianos totales ($\text{mg malvidina-3-glucósido/L}$) de las muestras de calibración y validación

Además, no hay que olvidar que no se pudo corroborar químicamente las bandas espectrales características de los antocianos en el ensayo de enriquecimiento de una muestra real con patrón de malvidina-3-glucósido. Considerando la naturaleza heterogénea de estos pigmentos es razonable pensar que resulta complicado encontrar la región espectral relevante en la que desarrollar la regresión PLS.

Predicción de los taninos condensados (TC)

Para este caso, mediante los gráficos de *scores* y de influencia, se descartaron los puntos que presentaron altos residuales y *leverage* (ver apartado IV.2.2). Concretamente se eliminaron 14 puntos que se sospechaban que eran *outliers* peligrosos. Sin embargo, aún así, los modelos de calibración obtenidos para los TC presentaron falta de ajuste y fueron los menos robustos de todos, como muestra la Figura IV.26. Los modelos obtenidos mostraron valores de RMSEP% mayores que los de los modelos creados para CFT y AT para cualquiera de las regiones seleccionadas. Así pues, la capacidad predictiva no fue suficientemente buena incluso ni con el mejor modelo construido, empleando la región *fingerprint*.

En cualquier caso, aunque los modelos obtenidos no fueron totalmente satisfactorios, hay que remarcar que éstos presentaron valores de RMSEP 3 veces inferiores al obtenido por otros autores (27), de 228 mg/L.

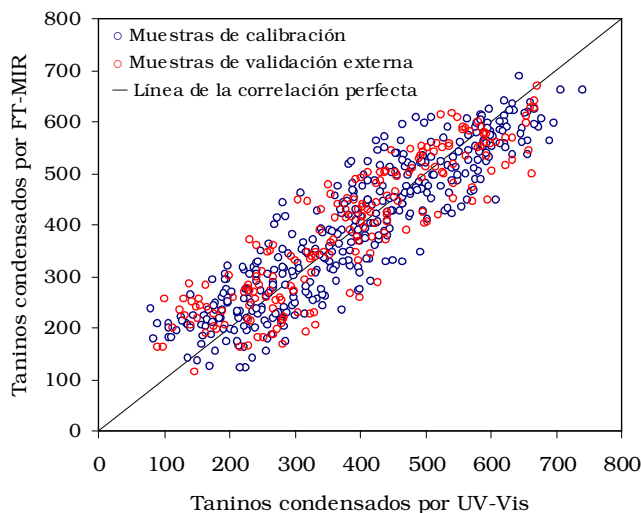


Figura IV.26. Correlación entre los resultados reales y los predichos con el modelo que emplea la región 979-1477 cm^{-1} de los taninos condensados (mg catequina/L) de las muestras de calibración y validación

Además, el análisis de la región de confianza (Tabla IV.13) mostró que los cuatro modelos presentaron un sesgo significativo, por lo que no proporcionaron resultados comparables a los valores de referencia.

Tabla IV.13. Resultados del test conjunto de pendiente e intercepto de los 4 modelos de calibración construidos para los taninos condensados (TC) en mostos/vinos

Parámetro	Modelo	Región (cm^{-1})	F calculado	F tabulado
TC (mg catequina/L)	Espectro completo	979-2989	18.01	3.04
	<i>Fingerprint</i>	979-1477	21.16	3.04
	Principal región fenólica	1133-1457	22.63	3.04
	Región seleccionada	1168-1457	21.25	3.04

*Nivel de significancia (α) = 0.05

El aspecto más importante para obtener buenos modelos de calibración que proporcionen errores de predicción bajos, es contar con muestras de calibración de calidad que presenten valores de referencia fiables.

En otras palabras, el método de referencia utilizado debería proporcionar valores exactos para que el modelo multivariante desarrollado también lo haga y sea válido.

Así pues, se estudió la precisión del método de cuantificación de taninos condensados en vinos, basados en la precipitación con metil-celulosa. Sorprendentemente, se obtuvo una desviación estándar relativa muy alta.

La diferencia tan acusada entre la precisión de este mismo método de análisis aplicado en extractos de uva (<2%) y vinos (>20%) podría deberse a que los taninos en los vinos podrían haber sido estabilizados con los polisacáridos propios del mosto y las manoproteínas liberadas por las levaduras durante la fermentación, que se encuentran localizadas en su pared celular (130, 131), y que podrían impedir que los taninos interaccionasen de manera repetitiva con la metil-celulosa.

De hecho, existen estudios donde se ha demostrado que los taninos, en presencia de polisacáridos y manoproteínas, disminuyen la sensación de astringencia de los vinos (129, 131, 132). Esto es debido a que estos polisacáridos y manoproteínas se agrupan con los taninos en forma de macroestructuras estables y solubles, impidiendo que los taninos establezcan puentes de hidrógeno con las proteínas de la saliva.

De la misma manera, estas mismas moléculas también podrían impedir la formación de puentes de hidrógeno entre los taninos y la metil-celulosa, que es el agente precipitante utilizado en la presente memoria, haciendo que la interacción fuese poco efectiva.

Por otra parte, se observó que los residuos de precipitación obtenidos en el caso de los vinos aparecían muy coloreados, por lo que también se podrían haber contabilizado los taninos asociados a los antocianos, los pigmentos

polímeros, y que la metodología no resultase tan selectiva como en el caso de los extractos de uva.

Como se puede observar en la Tabla IV.11, no fue posible calcular los valores de $RMSEP_{cor}$ debido a los valores negativos obtenidos dentro de las raíces cuadradas (por los valores tan elevados de rsd).

El parámetro de TC en vinos constituye un claro ejemplo de que los modelos multivariantes pueden proporcionar un error similar o incluso menor que el que proporciona el método de referencia, si éste presenta una excesiva incertidumbre en la medida.

Modelos individuales para las variedades

En una última fase del estudio, además de construir rectas de calibrado con todas las variedades, se realizaron calibraciones específicas para los tres parámetros con cada una de las cinco variedades de uva. Se utilizó una nueva región del espectro ($1060-1457\text{ cm}^{-1}$), porque tras numerosas pruebas de selección de diferentes regiones espectrales, se comprobó que mejoraba los resultados de calibración de Merlot y Syrah.

Todas las muestras disponibles de la misma variedad se utilizaron para la construcción de los modelos, en la validación cruzada completa para la selección del número óptimo de factores y en la determinación de la capacidad predictiva global del modelo. Estas calibraciones fueron validadas usando la validación cruzada *leave-one-out*, por lo que el parámetro analizado para evaluar la capacidad predictiva de las ecuaciones obtenidas, fue la $RMSECV$.

La presencia de muestras discrepantes se analizó mediante la observación del gráfico de influencia, construido a partir de la medida de la varianza residual y de la importancia de los objetos (*leverage*) en el conjunto de calibración. Este es el motivo por el cual para una misma variedad, el número de muestras pueda diferir en función del parámetro analizado.

Los resultados de los modelos creados para cada variedad y parámetro se muestran en la Tabla IV.14.

Tabla IV.14. Resultados de los modelos PLS para la predicción de los compuestos fenólicos en los mostos/vinos para cada variedad de uva

Variedad	Parámetro	Muestras	Región (cm ⁻¹)	Factores PLS	RMSEC (%)	R ² _{cal}	RMSECV (%)	R ² _{cal}	RPD
Merlot	CFT	150	1133-1457	3	3.1	0.983	3.2	0.982	7.6
	AT	150	1060-1457	6	4.4	0.956	4.8	0.946	4.3
	TC	143	1060-1457	12	14.5	0.799	17.3	0.715	1.9
Tempranillo	CFT	120	1168-1457	6	3.3	0.980	3.7	0.975	6.4
	AT	120	1133-1457	8	3.9	0.957	4.4	0.946	4.3
	TC	120	979-1477	9	8.1	0.893	9.6	0.850	2.6
Syrah	CFT	120	979-1477	5	2.6	0.982	2.8	0.980	7.0
	AT	120	1060-1457	7	3.5	0.953	3.9	0.941	4.1
	TC	114	1133-1457	11	13.4	0.815	16.3	0.730	1.9
Carifena	CFT	90	1168-1457	4	3.2	0.970	3.7	0.961	5.1
	AT	90	1168-1457	9	3.7	0.951	4.5	0.927	3.7
	TC	90	979-1477	9	10.0	0.905	12.5	0.852	2.6
Cabernet sauvignon	CFT	118	1133-1457	2	3.5	0.981	3.6	0.980	7.1
	AT	117	1133-1457	6	4.0	0.973	4.4	0.966	5.4
	TC	118	1133-1457	6	10.4	0.908	11.4	0.889	3.0

RMSEC, raíz cuadrada del error cuadrático medio de calibración; **R²_{cal}**, coeficiente de determinación de calibración; **RMSECV**, raíz cuadrada del error cuadrático medio de validación cruzada; **R²_{cal}**, coeficiente de determinación de validación; **RPD**, desviación predictiva residual; **CFT**, compuestos fenólicos totales (mg ácido gálico/L); **AT**, antocianos totales (mg/malvidina-3-glucósido/L); **TC**, taninos condensados (mg catequina/L)

Los modelos presentados reflejan las regiones espectrales que mejores resultados de calibración proporcionaron para los tres parámetros fenólicos. Los valores de RMSEC % en los casos de los CFT y de AT fueron muy buenos (< 5.0%). Como puede apreciarse también, cuando se trabajó con variedades por separado, se necesitaron muchos menos factores PLS para calibrar si se comparan con los modelos globales que integraron todas las variedades. Esto está en concordancia con los resultados obtenidos en el estudio de Di Egidio *et al.* (27), donde el número óptimo de los factores PLS utilizados para los modelos de CFT y AT fueron 3 y 7, respectivamente.

De manera general, el número óptimo de factores PLS para modelar los CFT fue el más bajo, mientras que para modelar los TC se necesitó un número de factores mayor para obtener el menor RMSECV. Los modelos para los CFT y AT presentaron unos valores de RPD > 3.0 en todas las variedades, que es lo que se recomienda para los propósitos de predicción (87, 94). Así pues, se estableció una buena relación entre los espectros y los valores de referencia de CFT y AT, con valores de $R^2_{cal} > 0.90$.

De forma global, puede observarse que, para todas las variedades, los resultados de calibración en el caso de los TC no fue tan satisfactorio como los obtenidos para CFT y AT. Los valores de RMSECV oscilaron entre el 10-20% en la mayoría de los casos, lo que demuestra que los modelos desarrollados carecen de suficiente precisión. De nuevo, tal y como ya se ha indicado previamente, el método de referencia no pareció funcionar adecuadamente.

Cabernet sauvignon proporcionó el modelo más exacto y robusto para la predicción de TC, con $R^2_{val} = 0.889$ y RPD = 3.0. Los modelos de Merlot y Syrah presentaron los menores R^2_{val} (0.715 y 0.730, respectivamente) y RPD (1.9, en ambos casos). El modelo de TC para la Cariñena mostró la menor RPD, es decir, el modelo menos robusto, debido a la baja dispersión (SD) de los valores de las muestras de calibración.

Dado que el conjunto de muestras de calibración pertenecía a una única añada, la de 2009, pensamos que no era adecuadamente representativo para construir modelos que puedan considerarse suficientemente robustos.

IV.4.4 Conclusiones

Tal y como ya se ha expuesto a lo largo de este Capítulo, a partir de los resultados obtenidos a partir del estudio del seguimiento de la madurez fenólica de las uvas tintas mediante FT-MIR, se concluye que:

- La espectroscopia FT-MIR en combinación con la calibración multivariante PLS ha permitido al mismo tiempo, una determinación rápida y precisa del contenido en compuestos fenólicos totales, antocianos totales y taninos condensados en los extractos de uva.
- Los modelos de calibración creados para predecir los compuestos fenólicos en los extractos de uva mediante análisis con FT-MIR han proporcionado resultados comparables a los medidos con el método de referencia, presentando errores de predicción inferiores al 8%, por lo que se les considera válidos para el seguimiento de la maduración fenólica.
- La desviación estándar relativa (rsd %) de los métodos de referencia empleados en la cuantificación de los tres parámetros fenólicos en los extractos de uva fue menor que el $RMSEP_{cor}$ de los modelos FT-MIR, por lo que resultan métodos de referencia adecuados para la calibración del equipo.
- También se han conseguido crear modelos de calibración, para predecir los tres parámetros fenólicos de interés a través de FT-MIR, específicos para cada variedad de uva estudiada, ofreciendo resultados satisfactorios ($RMSECV < 3\%$).

Del estudio del seguimiento de la extracción de los compuestos fenólicos durante la vinificación en tinto mediante FT-MIR, se desprenden las siguientes conclusiones:

- Las cuatro regiones espectrales seleccionadas han proporcionado buenos modelos de calibración para los compuestos fenólicos totales y antocianos totales, permitiendo el seguimiento de su solubilización durante la

maceración, aunque en el caso de los taninos condensados, éstos no han sido tan satisfactorios. Así pues, el equipo FT-MIR es capaz analizar los parámetros de interés en matrices cambiantes.

- Los modelos de calibración creados para predecir los compuestos fenólicos totales y antocianos totales (a excepción del que emplea el espectro completo) en mostos y vinos mediante análisis con FT-MIR han proporcionado resultados comparables a los medidos con el método de referencia, presentando errores de predicción inferiores al 10%, por lo que se les considera válidos para el seguimiento de la maceración. Por el contrario, los cuatro modelos creados para la predicción de los taninos condensados han proporcionado resultados significativamente diferentes a los de referencia, mostrando un error sistemático.
- Sin embargo, la imposibilidad de calcular los valores de $RMSEP_{cor}$ por la elevada incertidumbre de los valores de referencia (rsd%), han puesto de manifiesto que estos modelos cometen menos error que el que proporciona el método de referencia.
- Por tanto, es necesario encontrar una metodología de referencia más precisa que la de precipitación con metil-celulosa para determinar los taninos condensados en los mostos/vinos con objeto de mejorar las predicciones del equipo FT-MIR.
- Ha sido posible la creación de modelos de calibración específicos para cada variedad de uva estudiada para la predicción de los tres parámetros fenólicos de interés con FT-MIR, ofreciendo resultados satisfactorios para los compuestos fenólicos totales y antocianos totales ($RMSECV < 5\%$), aunque no tan satisfactorios para los taninos condensados ($RMSECV > 10\%$).

IV.5 Bibliografía

- (1) Stuart B. Infrared spectroscopy: fundamentals and applications. Chichester: John Wiley; 2004.
- (2) Van de Voort F. Fourier-transform infrared-spectroscopy applied to food analysis. *Food Research International* 1992; 25: 397-403.
- (3) Sun D. Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Amsterdam: Academic Press; 2009.
- (4) Hollas JM. Basic atomic and molecular spectroscopy. New York: Wiley-Interscience; 2002.
- (5) Raaman N. Phytochemical techniques. New Delhi: New India Publishing Agency; 2006.
- (6) Mehrotra R. Infrared spectroscopy, gas chromatography/infrared in food analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Ltd. 2006: 1-18.
- (7) Li-Chan E, Griffiths PR, Chalmers JM. Applications of vibrational spectroscopy in food science. Chichester, UK: Wiley; 2010.
- (8) Smith BC. Infrared spectral interpretation: a systematic approach. Boca Raton: CRC Press; 1999.
- (9) Reh C, Irudayaraj J. Nondestructive testing of food quality. Ames, Iowa: Blackwell; 2008.
- (10) Silverstein RM, Webster FX. Spectrometric identification of organic compounds. 6th ed. New York: John Wiley; 1998.
- (11) Mazarevica G, Diewok J, Baena JR, Rosenberg E, Lendl B. On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 2004; 58: 804-810.
- (12) Edelmann A, Diewok J, Schuster KC, Lendl B. Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 1139-1145.
- (13) Armenta S, Garrigues S, de la Guardia M, Rondeau P. Attenuated Total Reflection-Fourier transform infrared analysis of the fermentation process of pineapple. *Analytica Chimica Acta* 2005; 545: 99-106.
- (14) Schindler R, Vonach R, Lendl B, Kellner R. A rapid automated method for wine analysis based upon sequential injection (SI)-FTIR spectrometry. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 1998; 362: 130-136.

- (15) Picque D, Lieben P, Chretien P, Beguin J, Guerin L. Assessment of maturity of Loire Valley wine grapes by mid-infrared spectroscopy. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 2010; 44: 219-229.
- (16) Cozzolino D, Holdstock M, Dambergs R, Cynkar W, Smith P. Mid infrared spectroscopy and multivariate analysis: A tool to discriminate between organic and non-organic wines grown in Australia. *Food Chemistry* 2009; 116: 761-765.
- (17) Moreira JL, Santos L. Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. *Analytical Chimica Acta* 2004; 513: 263-268.
- (18) Bevin CJ, Fergusson AJ, Perry WB, Janik LJ, Cozzolino D. Development of a rapid "fingerprinting" system for wine authenticity by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54: 9713-9718.
- (19) Boulet JC, Williams P, Doco T. A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers* 2007; 69: 79-85.
- (20) Patz CD, Blieke A, Ristow R, Dietrich H. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica Chimica Acta* 2004; 513: 81-89.
- (21) Fernandez K, Agosin E. Quantitative analysis of red wine tannins using Fourier-transform mid-infrared spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; 55: 7294-7300.
- (22) Jensen JS, Egebo M, Meyer A. Identification of spectral regions for the quantification of red wine tannins with Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 3493-3499.
- (23) Vera L, Acena L, Boque R, Guasch J, Mestres M, Busto O. Application of an electronic tongue based on FT-MIR to emulate the gustative mouthfeel "tannin amount" in red wines. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 397: 3043-3049.
- (24) Edelmann A, Lendl B. Toward the optical tongue: Flow-through sensing of tannin-protein interactions based on FTIR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 2002; 124: 14741-14747.
- (25) Dyer JR. Applications of absorption spectroscopy of organic compounds. Englewood Cliffs: Prentice-Hall; 1965.
- (26) Cozzolino D, Cynkar W, Shah N, Smith P. Can spectroscopy geographically classify Sauvignon Blanc wines from Australia and New Zealand? *Food Chemistry* 2011; 126: 673-678.
- (27) Di Egidio V, Sinelli N, Giovanelli G, Moles A, Casiraghi E. NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation. *European Food Research and Technology* 2010; 230: 947-955.

(28) Picinelli-Lobo A, Suárez-Valles B, Fernández-Tascón N, Rodríguez-Madrera R, Fernández-García O. Calibration models for routine analysis of cider by mid-infrared spectroscopy. *LWT - Food Science and Technology* 2006; 39: 1026-1032.

(29) Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS, Vyvyan JR. Introduction to spectroscopy. Belmont (USA): Brooks/Cole; 2009.

(30) Chau F. Chemometrics: from basics to wavelet transform. Hoboken: Wiley-Interscience; 2004.

(31) Patz CD, David A, Thente K, Kurbel P, Dietrich H. Wine analysis with FTIR spectrometry. *Viticultural and Enological Sciences* 1999; 54: 80-87.

(32) Lachenmeier DW. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. *Food Chemistry* 2007; 101: 825-832.

(33) Lobo A, Valles B, Tascón N, Madrera R, García O. Calibration models for routine analysis of cider by mid-infrared spectroscopy. *Food Science and Technology* 2006; 39: 1026-1032.

(34) Lachenmeier D, Richling E, Lopez M, Frank W, Schreier P. Multivariate analysis of FTIR and ion chromatographic data for the quality control of tequila. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 2151-2157.

(35) Hu N, Wu D, Cross K, Burikov S, Dolenko T, Patsaeva S. Structurability: a collective measure of the structural differences in Vodkas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 7394-7401.

(36) Nagarajan R, Gupta A, Mehrotra R, Bajaj M. Quantitative analysis of alcohol, sugar, and tartaric acid in alcoholic beverages using attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Automated Methods Management in Chemistry* 2006; 2006: 1-5.

(37) McIntyre A, Bilyk M, Nordon A, Colquhoun G, Littlejohn D. Detection of counterfeit Scotch whisky samples using mid-infrared spectrometry with an attenuated total reflectance probe incorporating polycrystalline silver halide fibres. *Analytica Chimica Acta* 2011; 690: 228-233.

(38) Lachenmeier D. Rapid screening for ethyl carbamate in stone-fruit spirits using FTIR spectroscopy and chemometrics. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005; 382: 1407-1412.

(39) Arzberger U, Lachenmeier D. Fourier transform infrared spectroscopy with multivariate analysis as a novel method for characterizing alcoholic strength, density, and total dry extract in spirits and liqueurs. *Food Analytical Methods* 2008; 1: 18-22.

- (40) Cocciardi RA, Ismail AA, Sedman J. Investigation of the potential utility of single-bounce attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy in the analysis of distilled liquors and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2005; 53: 2803-2809.
- (41) Sharma K, Sharma S, Lahiri S. Novel method for identification and quantification of methanol and ethanol in alcoholic beverages by gas chromatography-Fourier transform infrared spectroscopy and horizontal attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of AOAC International* 2009; 92: 518-526.
- (42) Nagarajan R, Mehrotra R, Bajaj M. Quantitative analysis of methanol, an adulterant in alcoholic beverages, using attenuated total reflectance spectroscopy. *Journal of Scientific and Industrial Research* 2006; 65: 416-419.
- (43) Duran E, Palma M, Natera R, Castro R, Barroso C. New FT-IR method to control the evolution of the volatile constituents of vinegar during the acetic fermentation process. *Food Chemistry* 2010; 121: 575-579.
- (44) Guerrero E, Mejias R, Marin R, Lovillo M, Barroso C. A new FT-IR method combined with multivariate analysis for the classification of vinegars from different raw materials and production processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2010; 90: 712-718.
- (45) Picque D, Lieben P, Corrieu G, Cantagrel R, Lablanquie O, Snakkers G. Discrimination of cognacs and other distilled drinks by mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2006; 54: 5220-5226.
- (46) Palma M, Barroso CG. Application of FT-IR spectroscopy to the characterisation and classification of wines, brandies and other distilled drinks. *Talanta* 2002; 58: 265-271.
- (47) Sun S, Li C, Wei J, Zhou Q, Noda I. Discrimination of Chinese Sauce liquor using FT-IR and two-dimensional correlation IR spectroscopy. *Journal of Molecular Structure* 2006; 799: 72-76.
- (48) Gorinstein S, Weisz M, Zemser M, Tilis K, Stiller A, Flam I, et al. Spectroscopic analysis of polyphenols in white wines. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 1993; 75: 115-120.
- (49) Vonach R, Lendl B, Kellner R. High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines. *Journal of Chromatogr A* 1998; 824: 159-167.
- (50) Gishen M, Holdstock M. Preliminary evaluation of the performance of the Foss WineScan FT 120 instrument for the simultaneous determination of several wine analyses. *Australian Grapegrower and Winemaker (Annual Technical Issue)* 2000: 75-81.

(51) Picque D, Cattenoz T, Corrieu G. Classification of red wines analysed by middle infrared spectroscopy of dry extract according to their geographical origin. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* 2001; 35: 165-170.

(52) Coimbra MA, Gonçalves F, Barros AS, Delgadillo I. Fourier transform infrared spectroscopy and chemometric analysis of white wine polysaccharide extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2002; 50: 3405-3411.

(53) Edelmann A, Diewok J, Baena J, Lendl B, Diewok J, Baena J, et al. High-performance liquid chromatography with diamond ATR-FTIR detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in red wine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2003; 376: 92-97.

(54) Kupina SA, Shrikhande AJ. Evaluation of a Fourier transform infrared instrument for rapid quality-control wine analyses. *American Journal of Enology and Viticulture* 2003; 54: 131-134.

(55) Versari A, Boulton R, Thorngate J. The prediction of the color components of red wines using FTIR, wine analyses, and the method of Partial Least Squares. *ACS Symposium Series* 2004; 886: 53-67.

(56) Nieuwoudt H, Prior B, Pretorius I, Manley M, Bauer F. Principal component analysis applied to Fourier transform infrared spectroscopy for the design of calibration sets for glycerol prediction models in wine and for the detection and classification of outlier samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2004; 52: 3726-3735.

(57) Moreira JL, Santos L. Analysis of organic acids in wines by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2005; 382: 421-425.

(58) Lleti R, Melendez E, Ortiz M, Sarabia L, Sanchez M. Outliers in partial least squares regression - Application to calibration of wine grade with mean infrared data. *Analytica Chimica Acta* 2005; 544: 60-70.

(59) Dixit V, Tewari JC, Cho B-, Irudayaraj JMK. Identification and quantification of industrial grade glycerol adulteration in red wine with Fourier transform infrared spectroscopy using chemometrics and artificial neural networks. *Applied Spectroscopy* 2005; 59: 1553-1561.

(60) Urbano Cuadrado M, Luque de Castro MD, Pérez Juan PM, Gómez-Nieto MA. Comparison and joint use of near infrared spectroscopy and Fourier transform mid infrared spectroscopy for the determination of wine parameters. *Talanta* 2005; 66: 218-224.

(61) Coimbra MA, Barros AS, Coelho E, Gonçalves F, Rocha SM, Delgadillo I. Quantification of polymeric mannose in wine extracts by FT-IR spectroscopy and OSC-PLS1 regression. *Carbohydrate Polymers* 2005; 61: 434-440.

- (62) Picque D, Cattenoz T, Corrieu G, Berger J. Discrimination of red wines according to their geographical origin and vintage year by the use of mid-infrared spectroscopy. *Sciences des Aliments* 2005; 25: 207-220.
- (63) Versari A, Boulton RB, Parpinello GP. Effect of spectral pre-processing methods on the evaluation of the color components of red wines using Fourier-transform infrared spectrometry. *Italian Journal of Food Science* 2006; 18: 423-431.
- (64) Boulet JC, Doco T, Roger JM. Improvement of calibration models using two successive orthogonal projection methods. Application to quantification of wine mannoproteins. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2007; 87: 295-302.
- (65) Fernandez K, Labarca X, Bordeu E, Guesalaga A, Agosin E. Comparative study of wine tannin classification using Fourier transform mid-infrared spectrometry and sensory analysis. *Applied Spectroscopy* 2007; 61: 1163-1167.
- (66) Urtubia A, Perez Correa J, Soto A, Pszczolkowski P. Using data mining techniques to predict industrial wine problem fermentations. *Food Control* 2007; 18: 1512-1517.
- (67) Soriano A, Pérez-Juan PM, Vicario A, González JM, Pérez-Coello MS. Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 2007; 104: 1295-1303.
- (68) Bevin C, Dambergs R, Fergusson A, Cozzolino D. Varietal discrimination of Australian wines by means of mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta* 2008; 621: 19-23.
- (69) Tarantilis PA, Troianou VE, Pappas CS, Kotseridis YS, Polissiou MG. Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 2008; 111: 192-196.
- (70) Urtubia A, Perez Correa J, Pizarro F, Agosin E. Exploring the applicability of MIR spectroscopy to detect early indications of wine fermentation problems. *Food Control* 2008; 19: 382-388.
- (71) Fu Y, Lim L, McNicholas P. Changes on enological parameters of white wine packaged in bag-in-box during secondary shelf life. *Journal of Food Science* 2009; 74: C608-C618.
- (72) Louw L, Roux K, Tredoux A, Tomic O, Naes T, Nieuwoudt H. Characterization of selected South African young cultivar wines using FTMIR spectroscopy, gas chromatography, and multivariate data analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57: 2623-2632.
- (73) Rudnitskaya A, Nieuwoudt H, Muller N, Legin A, du Toit M, Bauer F. Instrumental measurement of bitter taste in red wine using an electronic tongue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2010; 397: 3051-3060.

(74) Versari A, Parpinello G, Scazzina F, Del Rio D. Prediction of total antioxidant capacity of red wine by Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Control* 2010; 21: 786-789.

(75) Bauer R, Nieuwoudt H, Bauer FF, Kossmann J, Koch KR, Esbensen KH. FTIR spectroscopy for grape and wine analysis. *Analytical Chemistry* 2008; 80: 1371-1379.

(76) Ioannou Papayianni E, Kokkinofa R, Theocharis C. Authenticity of Cypriot sweet wine Commandaria using FT-IR and chemometrics. *Journal of Food Science* 2011; 76: C420-C427.

(77) Cozzolino D, Cynkar W, Shah N, Smith P. A feasibility study on the use of attenuated total reflectance mid-infrared for analysis of compositional parameters in wine. *Food Research International* 2011; 44: 181-186.

(78) Pizarro C, Gonzalez Saiz J, Esteban Diez I, Orio P. Prediction of total and volatile acidity in red wines by Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and iterative predictor weighting. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2011; 399: 2061-2072.

(79) Roussel S, Bellon-Maurel V, Roger JM, Grenier P. Authenticating white grape must variety with classification models based on aroma sensors, FT-IR and UV spectrometry. *Journal of Food Engineering* 2003; 60: 407-419.

(80) Roussel S, Bellon-Maurel V, Roger J, Grenier P. Fusion of aroma, FT-IR and UV sensor data based on the Bayesian inference. Application to the discrimination of white grape varieties. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 2003; 65: 209-219.

(81) Urtubia A, Pérez-Correa JR, Meurens M, Agosin E. Monitoring large scale wine fermentations with infrared spectroscopy. *Talanta* 2004; 64: 778-784.

(82) Schneider R, Charrier F, Moutounet M, Baumesb R. Rapid analysis of grape aroma glycoconjugates using Fourier-transform infrared spectrometry and chemometric techniques. *Analytica Chimica Acta* 2004; 513: 91-96.

(83) Lam H, Proctor A, Howard L, Cho M. Rapid fruit extracts antioxidant capacity determination by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science* 2005; 70: C545-C549.

(84) Swanepoel M, du Toit M, Nieuwoudt H. Optimisation of the quantification of total soluble solids, pH and titratable acidity in South African grape must using Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *South African Journal of Enology and Viticulture* 2007; 28: 140-149.

(85) Wynne L, Clark S, Adams MJ, Barnett NW. Compositional dynamics of a commercial wine fermentation using two-dimensional FTIR correlation analysis. *Vibrational Spectroscopy* 2007; 44: 394-400.

- (86) He J, Rodriguez Saona L, Giusti M. Midinfrared spectroscopy for juice authentication - Rapid differentiation of commercial juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; 55: 4443-4452.
- (87) Versari A, Parpinello GP, Mattioli AU, Galassi S. Determination of grape quality at harvest using Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *American Journal of Enology and Viticulture* 2008; 59: 317-322.
- (88) Passos C, Cardoso S, Barros A, Silva C, Coimbra M. Application of Fourier transform infrared spectroscopy and orthogonal projections to latent structures/partial least squares regression for estimation of procyanidins average degree of polymerisation. *Analytica Chimica Acta* 2010; 661: 143-149.
- (89) Shah N, Cynkar W, Smith P, Cozzolino D. Use of Attenuated Total Reflectance midinfrared for rapid and real-time analysis of compositional parameters in commercial white grape juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2010; 58: 3279-3283.
- (90) Gishen M, Dambergs RG, Cozzolino D. Grape and wine analysis - enhancing the power of spectroscopy with chemometrics. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2005; 11: 296-305.
- (91) Davenel A, Grenier P, Foch B, Bouvier J, Verlaque P, Pourcin J. Filter, Fourier-Transform Infrared, and aerometry, for following alcoholic fermentation in wines. *Journal of Food Science* 1991; 56: 1635-1638.
- (92) Janik LJ, Cozzolino D, Dambergs RG, Cynkar WU, Gishen M. The prediction of total anthocyanin concentration in red-grape homogenates using visible-near-infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Analytica Chimica Acta* 2007; 594: 107-118.
- (93) Cozzolino D, Kwiatkowski MJ, Parker M, Cynkar WU, Dambergs RG, Gishen M, et al. Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytical Chimica Acta* 2004; 513: 73-80.
- (94) Sinelli N, Spinardi A, Di Egidio V, Mignani I, Casiraghi E. Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. *Postharvest Biology and Technology* 2008; 50: 31-36.
- (95) Kramer R. Chemometric techniques for quantitative analysis. Boca Raton, FL: Crc; 1998.
- (96) Massart DL. Chemometrics: a textbook. Amsterdam: Elsevier; 1988.
- (97) Vandeginste BGM. Handbook of chemometrics and qualimetrics. Amsterdam: Elsevier; 1998.
- (98) Martens H, Naes T. Multivariate calibration. Chichester: Wiley; 1989.

- (99) Mardia KV, Kent JT, Bibby JM. Multivariate analysis. London: Academic Press; 1979.
- (100) Ferré J. Calibración multivariante en análisis cuantitativo. El modelo inverso. *Técnicas de Laboratorio* 2006; 310: 262-266.
- (101) Wold S, Martens H, Wold H. The multivariate calibration-problem in chemistry solved by the PLS method. *Lecture Notes in Mathematics* 1983; 973: 286-293.
- (102) Riley MR, Okeson CD, Frazier, BL. Rapid calibration of Near-Infrared spectroscopic measurements of *Mammalian* cell cultivations. *Biotechnology progress* 1999; 15: 1133-1141.
- (103) Chen Q, Zhao J, Liu M, Cai J, Liu J. Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2008; 46: 568-573.
- (104) Kennard RW, Stone LA. Computer aided design of experiments. *Technometrics* 1969; 11: 137-148.
- (105) Wu W, Walczak B, Massart D, Heuerding S, Erni F, Last I. Artificial neural networks in classification of NIR spectral data: Design of the training set. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 1996; 33: 35-46.
- (106) De Groot PJ, Postma GJ, Melssen WJ, Buydens LMC. Selecting a representative training set for the classification of demolition waste using remote NIR sensing. *Analytica Chimica Acta* 1999; 392: 67-75.
- (107) Næs T, Isaksson T. Selection of samples for calibration in near-infrared spectroscopy. Part I: general principles illustrated by example. *Applied Spectroscopy* 1989; 43: 328-335.
- (108) Stone M. Cross-validatory choice and assessment of statistical predictions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 1974; 36: 111-147.
- (109) Wold S. Cross-validatory estimation of the number of components in factor and principal component models. *Technometrics* 1978; 20: 397-405.
- (110) Draper NR, Smith H. Applied regression analysis. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons; 1981.
- (111) CAMO. The Unscrambler User's Guide. Software for multivariate data analysis: PCA, PCR and PLS. 2003;
- (112) Thomas EV. A primer on multivariate calibration. *Analytical Chemistry* 1994; 66: 795A-804A.

- (113) Wu D, He Y, Shi J, Feng S. Exploring near and midinfrared spectroscopy to predict trace Iron and Zinc contents in powdered milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2009; 57: 1697-1704.
- (114) Williams P, Norris K. Near-infrared technology in the agricultural and food industries. 2nd ed.: American Association of Cereal Chemists Press; 2000.
- (115) Faber K, Kowalski B. Improved prediction error estimates for multivariate calibration by correcting for the measurement error in the reference values. *Applied Spectroscopy* 1997; 51: 660-665.
- (116) Peynaud E. The taste of wine. The art and science of wine appreciation. 2d ed. Nueva York: Wiley & Sons; 1996.
- (117) Glories Y. La maturità fenolica delle uve: primo parametro da controllare per una corretta vinificazione in rosso. *Vignevine* 1999; 3: 46-50.
- (118) Sacchi KL, Bisson LF, Adams DO. A review of the effect of winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* 2005; 56: 197-206.
- (119) Pardo-Castellví R, De Castro-Martín JJ. Estudio de la extracción de compuestos fenólicos de variedades tintas durante la vinificación en la D.O. Penedés. *Viticultura y Enología Profesional* 2003; 87: 37-42.
- (120) González-Manzano S, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C. Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta* 2004; 513: 283-289.
- (121) Samappito S, Butkhup L. Effect of skin contact treatments on the aroma profile and chemical components of mulberry (*Morus alba* Linn.) wines. *African Journal of Food Science* 2010; 4: 52-61.
- (122) Ribéreau-Gayon P. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique* 1970; 52: 627-631.
- (123) Puissant A, Léon H. La matière colorante des grains de raisins de certains cépages cultivés en Anjou en 1965. *Annales de Technologie Agricole* 1967; 6: 217-225.
- (124) Blouin J. Techniques d'analyses des moûts et des vins. Paris: Dujardin-Salleron; 1992.
- (125) Mercurio M, Damberg R, Herderich M, Smith P. High throughput analysis of red wine and grape phenolics - Adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified Somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2007; 55: 4651-4657.

- (126) Sarneckis CJ, Dambergs RG, Jones P, Mercurio M, Herderich MJ, Smith PA. Quantification of condensed tannins by precipitation with methyl cellulose: development and validation of an optimised tool for grape and wine analysis. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2006; 12: 39-49.
- (127) Hidalgo-Togores J. Tratado de enología. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa; 2003.
- (128) Zamora F. Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. Madrid: A. Madrid Vicente; 2003.
- (129) Saucier C, Glories Y, Roux D. Tannin-colloid interactions: new advances concerning the concept of "good" and "bad" tannins. *Revue des Œnologues et des Techniques Vitivinicoles et Œnologiques* 1999; 94: 9-10.
- (130) Zamora F. La crianza del vino tinto con lías, una nueva tendencia. *Enólogos* 2002; 19: 25-26.
- (131) Escot S, Feuillat M, Dulau L, Charpentier C. Release of polysaccharides by yeasts and the influence of released polysaccharides on colour stability and wine astringency. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 2001; 7: 153-159.
- (132) Taira S, Ono M, Matsumoto N. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biology and Technology* 1997; 12: 265-271.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

CAPÍTULO V

Conclusiones generales



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

Como se ha comentado en los objetivos de la presente Tesis Doctoral, y se ha comprobado a lo largo de esta memoria, el color y el cuerpo del vino tinto dependen en buena medida del estado de madurez fenólica de las uvas con que se ha elaborado, constituyendo el parámetro de calidad más determinante a la hora de fijar la fecha de la vendimia y, a su vez, un desafío analítico para los enólogos. No sólo por la dificultad de disponer de un método de análisis de la uva tinta universal y rápido que permita el seguimiento de su composición fenólica a lo largo de la maduración, incluyendo la necesaria etapa de pretratamiento de la muestra, sino también porque los resultados obtenidos se correlacionen con los de sus correspondientes vinos.

Por este motivo, todos los trabajos realizados y presentados en esta Tesis Doctoral, pretenden contribuir de alguna manera al avance en esta línea de investigación. Además de haber optimizado un método de pretratamiento de la muestra para ahorrar tiempo a las bodegas en sus controles de maduración fenólica, también se ha aplicado la espectroscopia FT-MIR para cuantificar los antocianos y taninos tanto en la uva, a partir de sus extractos, como en los vinos, en todos sus estadios de elaboración.

A continuación se exponen las conclusiones derivadas del trabajo experimental realizado durante el desarrollado en la presente Tesis Doctoral.

Extracción de los compuestos fenólicos de las uvas

1. Los métodos comparados en el seguimiento de la madurez fenólica (ITV, AWRI y Glories) han mostrado diferente capacidad de extracción, pero aunque el recuento de compuestos fenólicos totales y antocianos totales en cada uno de los medios de extracción ha mostrado diferencias cuantitativas, la alta correlación entre los resultados, ha permitido establecer correspondencias entre ellos.
2. Una vez seleccionado el método de extracción en términos de sencillez, repetitividad, rapidez y capacidad de solubilización de los compuestos fenólicos, la optimización del método ITV ha permitido reducir el tiempo de pretratamiento de la muestra en un 75% cuando se emplea una temperatura de 40°C durante 15 minutos.

3. Las medidas realizadas sobre uvas conservadas en refrigeración o congelación han proporcionado resultados erróneos a lo largo del tiempo, por lo que, si no se dispone de suficiente tiempo durante los controles de maduración, es preferible procesarlas inmediatamente tras el muestreo y conservar sus extractos en congelación hasta el momento del análisis, para obtener resultados fiables.

4. La alta correlación entre los resultados de color, compuestos fenólicos totales y antocianos totales analizados en los extractos obtenidos a partir de uvas representativas y sus correspondientes vinos, ha respaldado el empleo del método de extracción en los controles de maduración fenólica, ya que podrá permitir al enólogo predecir las características del vino que se obtendrá en el momento de la vendimia.

5. No existe una correlación significativa entre los parámetros de madurez fenólica y tecnológica, por lo que ambos tipos de madurez se deben estudiar simultáneamente para decidir el equilibrio apropiado entre color y grado alcohólico que presentará el vino obtenido en el momento de la vendimia.

Espectroscopia FT-MIR

1. El instrumento FT-MIR empleado en la experimentación ha permitido crear buenos modelos de calibración sin requerir un pretratamiento previo de los espectros para eliminar el ruido espectral, permitiendo manipularlos directamente tras su obtención.

2. La espectroscopia FT-MIR, en combinación con la regresión PLS, ha permitido cuantificar los compuestos fenólicos totales, los antocianos totales y los taninos contenidos en los extractos de uva de manera simultánea y satisfactoria, con errores de predicción inferiores al 6% y ofreciendo resultados comparables a los obtenidos con el método de referencia.

3. El ensayo de enriquecimiento de una muestra real llevado a cabo con compuestos fenólicos de diferente naturaleza, ha permitido revelar las regiones espectrales relacionadas con su presencia, por registrarse diferencias

significativas en la respuesta espectral, facilitando de esta manera dónde se debían centrar las regresiones PLS.

4. Los mejores resultados de los modelos de calibración PLS construidos para la predicción de los compuestos fenólicos se han obtenido cuando se han empleado las zonas espectrales reveladas por el ensayo de enriquecimiento.

5. Por otra parte, se ha demostrado que los instrumentos FT-MIR sirven para predecir estos tres parámetros en variedades concretas de uva, pudiendo diseñar modelos de calibración específicos para cada bodega en particular.

6. El uso del instrumento FT-MIR también ha permitido el seguimiento de la solubilización de los compuestos fenólicos durante la etapa de maceración, a pesar de que la matriz ha experimentado un cambio constante a lo largo del tiempo para pasar de mosto a vino, ofreciendo la posibilidad a las bodegas de supervisar el proceso productivo en tiempo real y decidir el final de la vinificación y momento de descube eficazmente.

7. Para el seguimiento de la maceración, en general se han obtenido buenos modelos de calibración para los propósitos de predicción de los compuestos fenólicos totales y antocianos totales, con errores de predicción inferiores al 10% y ofreciendo resultados comparables a los obtenidos con el método de referencia. Sin embargo, para el caso de los taninos condensados, los modelos han presentado errores de predicción alrededor del 20% y sesgo significativo, por lo que los resultados predichos han diferido significativamente de los de referencia.

8. El valor corregido del error de predicción para el caso de los taninos condensados a través de la sustracción de la varianza del método de referencia, ha demostrado que los modelos multivariantes pueden cometer menores errores de la medida analítica que los métodos de referencia, y que la técnica FT-MIR puede ser incluso más precisa que otras utilizadas habitualmente.

9. También se ha demostrado la capacidad de la técnica FT-MIR y la regresión PLS para construir modelos exclusivos cada variedad de uva que permita predecir los tres parámetros fenólicos en vinos monovarietales de manera satisfactoria.

Perspectivas futuras

1. Desarrollo de modelos de calibración más robustos para la evaluación de los compuestos fenólicos en la uva y el vino de manera más precisa que permita tener una aplicación industrial, mediante la incorporación de un mayor número de muestras pertenecientes a diferentes variedades, añadas y estadios de maduración.

2. Es necesario encontrar una metodología de referencia más precisa para la determinación de los taninos condensados que la de la precipitación con metil-celulosa con objeto de mejorar las predicciones del instrumento FT-MIR.

3. Dado que una de las ventajas que presenta la técnica FT-MIR es que precisa una mínima o nula preparación de la muestra para su análisis, se valorará la posibilidad de sustituir la etapa de pretratamiento de las muestras de uvasobre el que se mide el contenido fenólico, por el análisis directo de la pasta obtenida con la uva triturada. Para ello se hará uso del dispositivo de análisis para muestras sólidas por reflectancia total atenuada (ATR).

4. Para el caso de las grandes bodegas, el empleo de un equipo FT-MIR portable en campo podría permitir el seguimiento de la maduración fenólica de las uvas por parcelas, registrando la información mediante coordenadas GPS. De esta manera se podría seguir, vía satélite, el avance de la maduración en las distintas parcelas para decidir el orden de vendimia. Este concepto de gestión efectiva de los viñedos que permite la separación de uvas de diferentes calidades (vendimia selectiva) entra dentro de lo que se denomina viticultura de precisión.

ANEXO 1

**COMPARISON OF THREE EXTRACTION METHODS USED TO EVALUATE
PHENOLIC RIPENING IN RED GRAPES**

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58 (2010) 4071-4076

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

Comparison of Three Extraction Methods Used To Evaluate Phenolic Ripening in Red Grapes

SANDRA FRAGOSO, MONTSERRAT MESTRES,* OLGA BUSTO, AND JOSEP GUASCH

Grup de Química Analítica Enològica i dels Aliments, Departament de Química Analítica i Química Orgànica, Facultat d'Enologia de Tarragona, Universitat Rovira i Virgili, Campus Sescelades, 43007 Tarragona, Spain

Because there is not a single method for carrying out phenolic ripening analysis, it is very difficult to compare the results obtained by different researchers. In this study, the three most widely used extraction methods of polyphenols (Glories, AWRI, and ITV) have been analytically compared by evaluating two of the most important parameters for the wine industry: total polyphenols and total anthocyanins. Samples from different grape varieties (Tempranillo, Garnacha, Cariñena, Syrah, Merlot, and Cabernet Sauvignon), from three different vintages (2006, 2007, and 2008), and at different ripening states (from the beginning of ripeness until harvest) were analyzed to obtain a wide range of representative phenolic contents. To avoid external interferences on the comparisons, the same grape puree was used to make the maceration assays using the different solvents according to each extraction method. Although every extraction method exhibits a different extraction efficiency, the correlation between the results obtained with each one was very good both for total anthocyanins and for total polyphenols. Thus, after having determined a parameter value of the phenolic ripeness using a specific method, the relationship found can be used to predict the parameter value of the phenolic ripeness provided by the other two methods.

KEYWORDS: Phenolic ripening; anthocyanins; polyphenolic compounds; red grape; extraction methods; correlations

INTRODUCTION

The vintage date has been traditionally decided by the technological maturity of grapes. This term is used to define the state in which grapes achieve an adequate amount of sugars and acids, because they would give to wine its characteristic alcohol–acidity balance after alcoholic fermentation. Nowadays, it is known that it is also necessary to get an optimal phenolic ripeness, because phenolic compounds play an important role in the color and mouthfeel properties (*1, 2*). Among the different parameters that enologists use when evaluating the phenolic ripeness of grapes, two of the most important are the total anthocyanins and the total polyphenols.

To determine the phenolic maturity, winemakers need a methodology as fast and simple as possible to extract the phenolic compounds from grape berries and to analytically measure their concentration. Because the extraction is usually a critical step, several methods have been proposed in the literature, although some of them are unsuitable for cellar quality control because they are tedious, slow, and not repeatable enough. For this reason, instead of the time-consuming methods in which grape solid parts (skins and seeds) and pulp are analyzed separately (*3–6*), it is preferable to use methods in which polyphenols are extracted from the whole grape puree.

Within these methods, the most widely used are the most traditional method, developed by Glories and co-workers (*7*), the one implemented by the Australian Wine Research Institute (AWRI) (*8*), and, finally, the ITV Standard (*9*), a method implemented by the Institut Technique de la Vigne et du Vin in France. All of them measure spectrophotometrically the contents of total anthocyanins and polyphenols. However, the time required and the solvent media used (pH value and ethanol contents) on the maceration process are different for each method and, therefore, the extraction efficiency in each case will be also different.

Because all of the proposed methods are equally valid from an enological point of view, there is a lack of consensus in the choice of one of them. This fact makes difficult the comparison between the results found in the bibliography and obtained by different researchers if they do not use the same method.

The aim of this study was to find correlations between the results obtained with the three extraction methods above-mentioned. With these correlations we would have a very useful tool that, from the values obtained in the analysis of a sample with a specific method, would provide the values that the same sample would provide if it was analyzed with the other methods.

MATERIALS AND METHODS

Samples. Fresh grape berries of six red cultivars (Tempranillo, Merlot, Syrah, Garnacha, Cariñena, and Cabernet sauvignon) were obtained from the experimental vineyard belonging to the Faculty of Enology

*Author to whom correspondence should be addressed (telephone +34977558494; fax +34977558446; e-mail montserrat.mestres@urv.cat).

(Rovira i Virgili University) in Constantí (Tarragona, Spain) during 2006, 2007, and 2008 vintages.

The sampling was carried out by taking into account the variability of the positions of the fruit on the cluster, of the cluster on the vine, and of the vine in the vineyard as well as from variations in sun exposure to assess a representative sample of the vineyard. Each sample consisted of 300 berries randomly collected. Special care was taken to obtain a good distribution between berries from the inside and the outside of the cluster: one was taken from the top, one from the bottom, and one from the middle of the cluster. Moreover, the sampling also considered the complete biological cycle; thus, it was done one day a week from the beginning of ripeness until harvest.

Instrumentation. The grapes were homogenized using a high-speed homogenizer Ultra-Turrax T-18 (IKA, Wilmington, NC) equipped with an S18N-19G rotating shaft (dispensing tool). Sample centrifugation was carried out by a Hettich Universal 32 R centrifuge (Tuttlingen, Germany). The absorbance of the extracts was determined using a Thermo Spectronic ultraviolet-visible spectrophotometer model Helios γ (Thermo Electron Corp., Cambridge, U.K.).

Reagents and Standards. The standard of malvidin-3-glucoside (purity $\geq 90\%$) was supplied by Fluka (Madrid, Spain) and gallic acid monohydrate (99.5%) by Scharlab (Barcelona, Spain). The other chemicals used for the study were ethanol, hydrochloric acid (HCl), and L-(+)-tartaric acid (H₂T), all of them of analytical reagent grade and supplied by Scharlab.

Maceration Conditions. Every set of 300 berries of each sample was destemmed and homogenized (including seeds) at room temperature to obtain a smooth paste using an Ultra-Turrax high-speed at 24000 rpm. This homogenate was distributed into eight different flasks to carry out the maceration in duplicate according to the three methods considered, and which were slightly improved (see below).

Glories Method. This method provides two different extracts because it determines two parameters: total polyphenols and easily extractable polyphenols. Therefore, two different acidic solutions are used: one at pH 1 (by using 0.1 M HCl) and another at pH 3.2 (by using 0.034 M H₂T). Two replicates of 25 g of paste were macerated in 25 mL of different pH solutions in flasks of 250 mL, under agitation, during 4 h and at room temperature. Then, the samples were centrifuged at 8000 rpm during 10 min. The supernatant obtained was decanted, and the volume was brought to 50 mL with extracting solution to guarantee a final constant volume.

AWRI Method. Two grams of paste was put into the centrifuge plastic tube with 20 mL of a 50% v/v ethanol-water solution. The tube was shaken on a rotating wheel at 30 rpm for 1 h at room temperature. Finally, it was centrifuged and the supernatant brought to 25 mL with ethanol-water 50% v/v to ensure a final constant volume.

ITV Standard Method. Fifty grams of paste was macerated in a hydroalcoholic acid solution (85 mL of HCl 0.1% v/v + 15 mL of ethanol 96%) in a flask of 250 mL by 1 h under manual agitation every 15 min. After this time, the sample was centrifuged and the supernatant was brought to 200 mL with the extracting solution to achieve a final constant volume.

Analytical Measurements. The contents of total polyphenols and total anthocyanins were the parameters used to follow the phenolic ripening. They were determined by spectrophotometric analysis of the extracts (diluted at the specified pH conditions in each case) at 280 and 520 nm, respectively.

Total Polyphenols Analysis. The contents of total polyphenols was determined by measuring at 280 nm the absorbance of diluted extracts obtained in each case of study. For the ITV and Glories methods, the extract was diluted 50 times on deionized water (10). For the AWRI method, the extract was diluted 25 times on 1 M HCl (11).

Total Anthocyanins Analysis. Total anthocyanins content was determined by measuring the absorbance at 520 nm of the diluted extract. For the ITV and Glories methods, the extract was diluted 25 times on HCl 1% (w/w) (10). For the AWRI method, the extract was diluted 25 times on 1 M HCl (11).

Calibration Lines. The external standard method was used to quantify the total polyphenols as milligrams of gallic acid per kilogram of grape and anthocyanins as milligrams of malvidin-3-glucoside per

kilogram of grape. Calibration lines were evaluated by the determination coefficient (R^2) and the online linearity (LOL) (12). All of the parameters of the calibration lines have been calculated with ULC 2.0 (Univariate Linear Calibration) computer software (13).

When dealing with polyphenols, we prepared a stock solution of gallic acid of 5000 mg L⁻¹ in ethanol-water (50% v/v) for the AWRI method, an other two stock solutions at pH 1.0 (with HCl) and pH 3.2 (with H₂T) for the Glories method, and another one in a hydroalcoholic acid solution (85 mL of HCl 0.1% v/v + 15 mL of ethanol 96%) for the ITV method. In all cases, we prepared six calibration solutions (concentration ranges between 2 and 20 mg L⁻¹) by diluting the stock solutions with suitable amounts of the required solvent according to each method. We built the calibration lines by plotting the absorbance values at 280 nm of each calibration solution against their corresponding concentrations.

With regard to anthocyanins, a single stock solution of malvidin-3-glucoside of 2000 mg L⁻¹ was prepared in HCl 1% (w/w) to be used for the three methods. As with polyphenols, we prepared six calibration solutions (concentration range from 5 to 15 mg L⁻¹) by diluting the stock solutions with suitable amounts of the required solvent according to each method. In this case, we built the calibration lines by plotting the absorbance values at 520 nm of each calibration solution against concentrations.

For the Glories method, only a calibration line was built for anthocyanins because, in this determination, there is a dilution 1:25 of the extract in HCl, which means that, when measured spectrophotometrically, the medium is practically the same regardless of the pH at which maceration takes place.

Comparative Study of the Three Methods. To carry out this study, the results obtained with one of the three methods were plotted versus the results obtained with each of the other two methods. In this way, we obtained six graphs for each of the two parameters studied (total polyphenols and anthocyanins). Because these representations showed a linear trend, the regression and the performance parameters were calculated and evaluated again by using ULC 2.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Extraction Method Precision. As is well known, the recovery of an analyte depends on the extraction method used. Therefore, because the different cellars are using different extraction procedures to determine the phenolic content of grapes, the results obtained will be also different. To compare these results, which is the objective of this study, evaluation of the precision of the extraction methods used is essential since the viability of this comparison depends on the value of this parameter.

To estimate the repeatability of the three methods considered in this study, suitable amounts of the same grape variety harvested on the same date were crushed to obtain a single grape homogenate. This homogenate was divided into 24 different portions to get 24 identical samples. In that way, we could take 6 identical replicates to be macerated under the conditions specified for each of the three methods studied. Once the different extracts were obtained, the absorbances at 280 and 520 nm were measured to determine the total polyphenols and total anthocyanins values, respectively. The results obtained showed relative standard deviation values of 3.9 and 4.6 for AWRI, 2.2 and 0.7 for ITV, 1.4 and 1.6 for Glories (whatever the pH used), respectively. A statistical comparison showed that all of these values were comparable for all of the methods evaluated. Therefore, considering the similar and high precisions in all cases, comparison between the results obtained by using the three different methods could be carried out.

Calibration Lines. We consider it to be of interest to study the linearity of the models, determining both the determination coefficient (R^2) and the LOL values, because they indicate the dispersion degree of the data around the calibration line, helping to evaluate the linearity of the model.

The calibration lines obtained for total polyphenols by using gallic acid as standard showed very good determination coefficient

Article

values ($R^2 \geq 0.999$) and excellent linearity was confirmed by $LOL > 99.5\%$ regardless of the method evaluated.

For anthocyanins, the calibration lines obtained from the solutions of malvidin-3-glucoside also presented very good coefficient values ($R^2 \geq 0.999$) and good linearity over the concentration ranges evaluated, because LOL values are $>98.5\%$ in all cases.

Table 1. Concentration Ranges of Total Polyphenols (Milligrams of Gallic Acid per Kilogram of Grapes) and Total Anthocyanins (Milligrams of Malvidin-3-glucoside per Kilogram of Grapes) Determined by Using the Extraction Methods Evaluated

method	no. of samples	range (mg kg ⁻¹)	
		total polyphenols	total anthocyanins
ITV	120	1042–2097	350–1310
AWRI	66	1323–2869	255–1307
Glories pH 1.0	58	719–1587	265–1227
Glories pH 3.2	58	500–1082	151–597

Comparative Study of the Methods. After the calibration lines for each of the three different methods had been obtained, the total polyphenols and total anthocyanins were quantified in many different samples. The samples analyzed included a wide range of varieties and ripening state (see Samples, above) to consider the most possible variability in the study. Table 1 summarizes the concentration ranges of the parameters determined by the three methods. The concentration values for both parameters are the usually expected in red grapes, including both grape variety and ripening state. As can be noted, whereas the AWRI method provides the more effective extraction for total polyphenols, the ITV method provides the more effective one for total anthocyanins. The different extraction efficiencies obtained by each method could be explained by two factors: the extraction capacity of the solvent used and the total time employed in the extraction. Thus, an increase in the ethanol content facilitates the seed polyphenols extraction (14). However, although an acidic medium does not provide a relevant extraction over the seeds as it does ethanol media, when this content increases, a higher degradation of vacuolar membrane and therefore a higher extraction from the

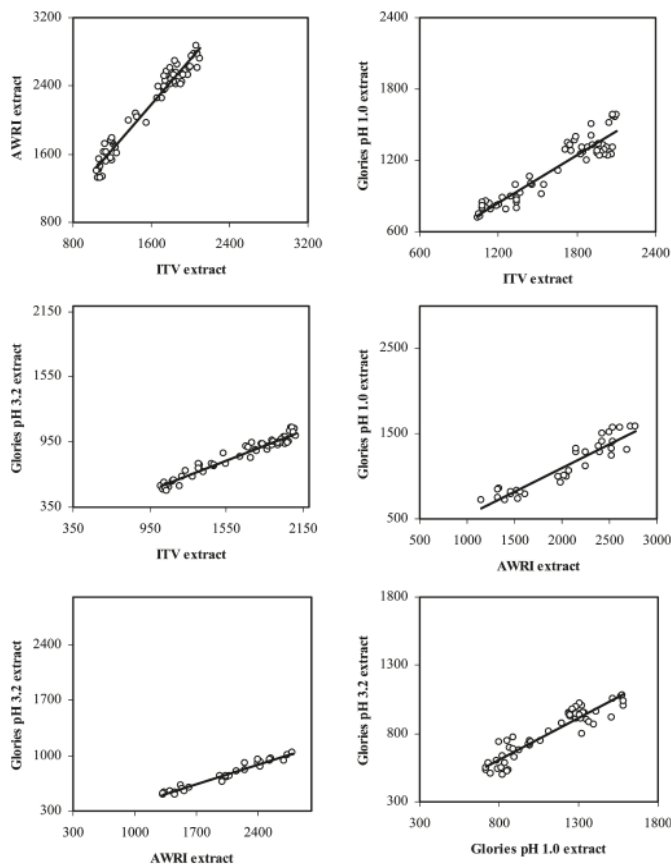


Figure 1. Graphical representation of the linear regression between total polyphenols quantified in all extracts (in mg of gallic acid per kg of grape).

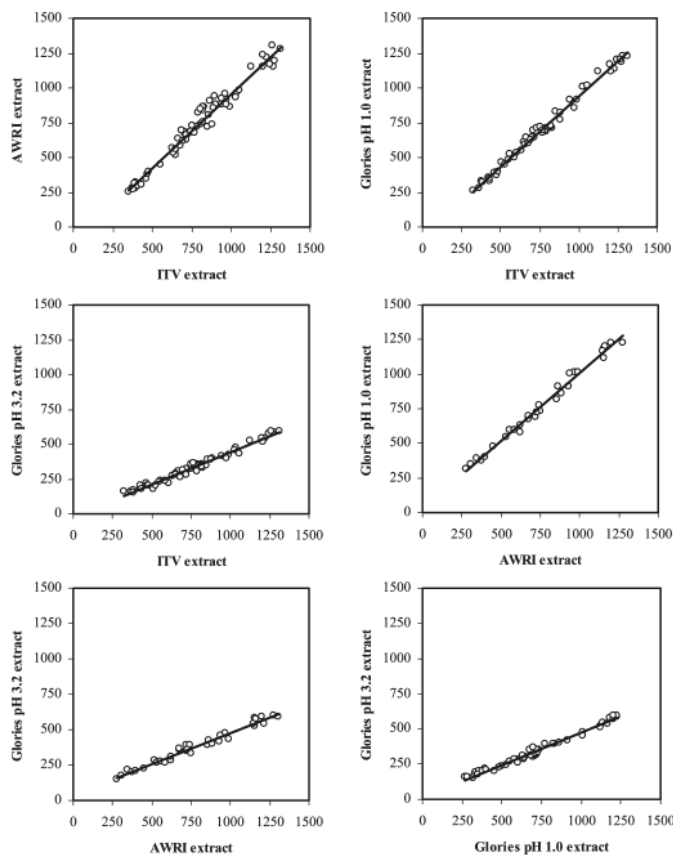


Figure 2. Graphical representation of the linear regression between total anthocyanins quantified in all extracts (in mg of malvidin-3-glucoside per kg of grape).

skins will be achieved. All of these effects are most favored the longer the maceration time.

To proceed with the comparative study, we calculated and evaluated the regression parameters of the different lines obtained when the results obtained were plotted with the methods studied (two by two). Figures 1 and 2 show graphically these regressions.

For total polyphenols, there is a very good correlation and linearity in all cases, as shown by the values of R^2 and LOL (Table 2). Therefore, this mathematical expression can be used for predicting the value of the studied variable by using a different method from that used to obtain the extract analyzed.

On the other hand, it can be noted that the extent of extraction clearly differs between methods, because the slopes obtained when correlating the results from the pair-to-pair comparison are different from 1. Thus, for example, a value of 0.56 in the slope of the regression line obtained when the Glories method is compared with the AWRI method means that the first method extracts only about 56% of what is extracted by using the second one. Therefore, from the different slope values we can conclude that, whereas the AWRI method gives the highest extraction

Table 2. Regression Parameters on the Comparative Study of the Three Methods for Total Polyphenols

methods compared	slope \pm CI ^a	intercept \pm CI ^a	R^2	LOL (%)
AWRI—Glories pH 1.0	0.56 \pm 0.08	-17 \pm 165	0.870	93.16
AWRI—Glories pH 3.2	0.36 \pm 0.03	25 \pm 57	0.964	96.30
ITV—Glories pH 1.0	0.67 \pm 0.07	36 \pm 113	0.874	94.93
ITV—Glories pH 3.2	0.47 \pm 0.03	53 \pm 47	0.953	96.97
ITV—AWRI	1.32 \pm 0.07	66 \pm 121	0.953	97.17
Glories pH 1.0—Glories pH 3.2	0.61 \pm 0.06	115 \pm 76	0.869	94.66

^aCI, confidence intervals with a significance level (α) = 0.05.

yield, the Glories pH 3.2 method provides a lower extraction efficiency value. This behavior coincides with the fact that whereas the AWRI method provides a nearly complete extraction, the method of Glories at pH 3.2 extracts only the polyphenols called "easily extractable polyphenols".

The correlation parameters for the results of anthocyanins obtained by the three methods were even better than those obtained for total polyphenols (Table 3).

Article

Table 3. Regression Parameters on the Comparative Study of the Three Methods for Total Anthocyanins

methods compared [method 1 (x) vs method 2 (y)]	slope ± CI ^a	intercept ± CI ^a	R ²	LOL (%)
AWRI–Glories pH 1.0	0.98 ± 0.04	27 ± 34	0.988	97.90
AWRI–Glories pH 3.2	0.43 ± 0.03	42 ± 22	0.972	97.01
ITV–Glories pH 1.0	1.01 ± 0.03	−72 ± 24	0.989	98.58
ITV–Glories pH 3.2	0.46 ± 0.02	−24 ± 16	0.977	97.94
ITV–AWRI	1.08 ± 0.05	−118 ± 39	0.971	97.84
Glories pH 1.0–Glories pH 3.2	0.46 ± 0.02	16 ± 13	0.982	98.13

^a CI, confidence intervals with a significance level (α) = 0.05.

Table 4. Mean Values of EA% and SM% Indices Calculated from the Extracts Obtained with the Glories Method and the Values Predicted from Regression Lines

	no. of samples	EA%			SM%				
		calcd	predicted	recovery (%)	calcd	predicted	recovery (%)	bias	
ITV	58	52.0	52.3	100.6	0.36	44.2	44.0	99.5	0.18
AWRI	35	51.8	51.6	99.6	0.13	48.5	48.2	99.4	0.24

With regard to the extraction efficiency of the total anthocyanins obtained with the different methods, we can observe two different behaviors. On the one hand, the slopes ITV–AWRI, ITV–Glories pH 1.0, and AWRI–Glories pH 1.0 are very close to 1, so the extraction efficiencies of anthocyanins obtained by the three methods are comparable. This behavior is due to the fact that the three extraction methods carry out an almost total extraction of anthocyanins. On the other hand, the comparison of the Glories pH 3.2 method with the other ones gives slope values of the linear regression close to 0.5, so in this case the extraction efficiency of this method is only half that achieved by using the other three methods.

Measurement of Phenolic Ripening Indices. To demonstrate the application feasibility of the correlations found in this study to the enological field, we applied the correlation models developed to predict two indices widely used in enology: the cellular extractability index or extractable anthocyanins index (EA) and the phenolic maturity index or seed maturity index (SM).

The EA% index represents the percentage of anthocyanins that have not been extracted during winemaking and, usually, decreases during ripening. The SM% index represents the fraction of polyphenols provided by seeds, commonly known as astringent tannins, and its value also decreases with ripening. Both indices are determined in an empirical way and allow us to know the quality phenolic ripening and the state of grapes and, therefore, to set the harvest date.

These phenolic potential parameters (in mg L^{−1}) were calculated as

$$EA(\%) = \left[\frac{C_{pH1.0} - C_{pH3.2}}{C_{pH1.0}} \right] \times 100 \quad (1)$$

$$SM(\%) = \left[\frac{(C_{280(pH3.2)} \times DF) - \left(C_{pH3.2} \times \frac{40}{1000} \right)}{(C_{280(pH3.2)} \times DF)} \right] \times 100 \quad (2)$$

where C_{pH1.0} = total content of anthocyanins (mg L^{−1} malvidin-3-glucoside), C_{pH3.2} = extractable anthocyanins (mg L^{−1} malvidin-3-glucoside), and C_{280(pH3.2)} × DF = total polyphenols easily extracted at pH 3.2 measured at 280 nm, previously diluted in

deionized water. This parameter is widely called the total polyphenols index. C_{pH3.2} × (40/100) = skin polyphenols estimated by extractable anthocyanins (I5), and (C_{280(pH3.2)} × DF) − [C_{pH3.2} × (40/100)] = seed polyphenols.

Because these indices are from the measure of the extracts obtained with the time-consuming Glories method, the challenge was to predict these indices from the extracts obtained with the ITV and AWRI methods, which are much faster.

Thus, several samples of different varieties and at different ripening stages were analyzed under the Glories method conditions and the EA% and SM% were calculated. In that way we had a wide range of values for the indices to be predicted from AWRI and ITV and, therefore, we could check the prediction ability in a wide range of concentrations.

Table 4 shows the mean values of both indices calculated from the extracts obtained according to the Glories method and also the predicted values from the extracts obtained with the AWRI and ITV methods. To assess the goodness of the predictions we defined the recovery parameter as the ratio predicted value/calculated value and expressed it as a percentage. As can be seen, in all cases the recovery was very satisfactory, close to 100%. Because the values shown corresponded to the mean of several samples, it was interesting to examine also the value of bias, which should be as close as possible to 0. The statistics showed that for both methods and also for both parameters, the bias values are comparable to 0 for a significance level of 0.05. However, given that the parameter providing more direct information about the results obtained is the prediction error, we also evaluated it from the ratio bias/calculated value. When the values were predicted from the AWRI method, the prediction error for EA% was <0.3% and <0.5% for SM%. For the prediction from the ITV method, the results were also very satisfactory because the prediction error for EA% was <0.7% and <0.3% for SM%.

Therefore, although the recoveries of the polyphenolic compounds obtained with each of three methods are not comparable, we can conclude that the regression lines obtained for total polyphenols and total anthocyanins analyzed by different methods are suitable tools to compare information about phenolic ripening obtained in laboratories that use different methodologies.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Karine Traulle and Joe Luis Villa Medina for valuable help in the realization of this study.

LITERATURE CITED

- Escribano-Bailon, T.; Alvarez-Garcia, M.; Rivas-Gonzalo, J.; Heredia, F. J.; Santos-Buelga, C. Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-O-glucoside and (+)-catechin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1213–1217.
- Llaudy, M. d. C.; Canals, R.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence of ripening stage and maceration length on the contribution of grape skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-simulated macerations. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 337–344.
- Venencie, C.; Uveira, M. N.; Guiet, S. Maturité polyphénolique du raisin mise en place d'une méthode d'analyse de routine. *Rev. Fr. Oenol.* **1997**, *167*, 36–41.
- Spagna, G.; Barbagallo, R. N.; Todaro, A.; Durante, M. J.; Pifferi, P. G. A method for anthocyanins extraction from fresh grape skin. *Ital. J. Food Sci.* **2003**, *15*, 337–345.
- Di Stefano, R.; Cravero, M. C. Metodi per lo studio dei polifenoli dell'uva. *Riv. Vitic. Enol.* **1991**, *2*, 37–45.
- Muñoz, S.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin

4076 *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 58, No. 7, 2010

- extracts by HPLC-DAD: validation study and response comparison of different standards. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *628*, 104–110.
- (7) Saint-Cricq, N.; Vivas, N.; Glories, Y. Maturité phénolique: définition et contrôle. *Rev. Fr. Oenol.* **1998**, *173*, 22–25.
- (8) Iland, P.; Bruer, N.; Wilkes, E.; Edward, G. Anthocyanins (colour) and total phenolics of grape berries. In *Chemical Analysis of Grapes and Wine: Techniques and Concepts*, 1st ed.; Winetitles: Broadview, Australia, 2004; pp 44.
- (9) Cayla, L.; Cottureau, P.; Renard, R. Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard. *Rev. Fr. Oenol.* **2002**, *193*, 10–16.
- (10) Ribereau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology. The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*; Wiley: Chichester, U.K., 1999; Vol. 2, pp 554.
- (11) Iland, P. *Chemical Analysis of Grapes and Wine: Techniques and Concepts*; Patrick Iland Wine Promotions: Campbelltown, Australia, 2004; pp 110.
- (12) Cuadros Rodríguez, L.; García Campaña, A. M.; Bosque Sendra, J. M. Statistical estimation of linear calibration range. *Anal. Lett.* **1996**, *29*, 1231–1239.
- (13) Boque, R.; Rius, F. X. Straight line calibration: something more than slopes, intercepts, and correlation coefficients. *J. Chem. Educ.* **1994**, *71*, 230–232.
- (14) Jensen, J. S.; Blachez, B.; Egebo, M.; Meyer, A. S. Rapid extraction of polyphenols from red grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* **2001**, *58* (4), 451–460.
- (15) Glories, Y. Caractérisation du potentiel phénolique: adaptation de la vinification. *Prog. Agric. Vitic.* **2001**, *118*, 347–350.

Fragoso et al.

Received for review November 20, 2009. Revised manuscript received February 23, 2010. Accepted February 24, 2010. We acknowledge the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (Project AGL2007-61550) for financial support.

ANEXO 2

**ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA
ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE MADUREZ FENÓLICA DE LA UVA
TINTA**

Enólogos, 58 (2009) 38-43

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

ORIGINAL

Estudio y optimización de un método analítico para la estimación de los parámetros de madurez fenólica de uvas tintas

Frago García, S.; Mestres Solè, M.; Busto Busto, O.; Guasch Torres, J.

*Grupo de Química Analítica Enológica y de los Alimentos. Departamento de Química Analítica y Química Orgánica. Facultad de Enología, Universitat Rovira i Virgili.
C/ Marcel·lí Domingo, s/n, 43007 -Tarragona. - e-mail: qaea@urv.cat
Grupo certificado según norma UNE-EN ISO 9001-2000*

RESUMEN

En el siguiente trabajo se presenta la optimización de un método analítico para la extracción de los compuestos fenólicos de las uvas, responsables del color y astringencia de los vinos tintos, que permite un seguimiento eficaz de la madurez fenólica. Trabajando con el método optimizado se acorta considerablemente el tiempo de análisis, comparando con otros métodos de extracción. Asimismo, se ha evaluado la estabilidad de las muestras de uva tomadas durante el control de maduración y almacenadas durante distintos períodos de tiempo en diferentes condiciones de conservación. Los resultados de este trabajo son de gran utilidad para estudios experimentales de madurez fenólica en los que se requiera disponer de un gran número de muestras que proporcionen resultados analíticos repetitivos y reproducibles en el tiempo.

PALABRAS CLAVE

Madurez fenólica, polifenoles, antocianos, tratamiento y conservación de la muestra.

ABSTRACT

This study presents the optimization of an analytical method for the extraction of phenolic compounds of grapes, which give the color and astringency properties to red wines, in order to get an effective monitoring of the phenolic ripening. Over other extraction methods, this optimized method save time of analysis. It has also been assessed the stability of the grape samples taken over the ripening and stored, under different conditions, different periods of time. The results of this last study are useful for experimental studies about phenolic maturity that require having a large number of samples to provide reliable analytical results over time.

INTRODUCCIÓN

El momento en que se realiza la vendimia está determinado por el grado de maduración de la uva y es uno de los factores fundamentales en la obtención de vinos de calidad [1]. El estado de madurez de la uva se establece en función de la concentración de azúcares y de ácidos de la baya, en lo que se conoce como "madurez tecnológica". En el caso de las variedades tintas,

además, también es necesario determinar la concentración de antocianos y polifenoles totales, en lo que se ha venido a denominar "madurez fenólica" [2-3] puesto que los compuestos fenólicos son los responsables del color y las propiedades gustativas del vino final.

Actualmente, cuando se realizan controles de maduración en los laboratorios, la madurez tecnológica puede determinarse de forma rápida y simple midiendo los azúcares del mosto por refractometría y su acidez total por valoración con una solución patrón alcalina. Sin embargo, para determinar la madurez fenólica no existe aún un método universalmente aceptado que permita determinar de forma eficaz este parámetro, a pesar de que en la bibliografía hay un gran número de métodos descritos. Gran parte de este problema se debe a que es necesario establecer no sólo la concentración de los compuestos fenólicos en la uva, sino también estimar su extractabilidad durante la vinificación [4].

Dentro de los métodos publicados sobre la extracción de los compuestos fenólicos, se puede distinguir entre los que procesan la uva entera [5-9] y los que procesan por separado las pieles de las pepitas [10-12].

En el trabajo que aquí se presenta se ha optado por la utilización de un método de extracción relativamente rápido y de fácil implantación en bodega, por lo que se ha elegido uno que no precisa la separación de las distintas partes de la baya. Concretamente se tomó como punto de partida el método de Cayla *et al.* [7], que es el procedimiento propuesto por el *Institut Technique de la Vigne et du Vin (ITV)*, ya que se conocían algunos de sus parámetros de calidad analítica.

El otro propósito de este trabajo ha sido garantizar la fiabilidad de los resultados cuando se llevan a cabo estudios de investigación más exhaustivos en los que es necesario preservar las muestras. Para ello se ha evaluado el tiempo de conservación tanto de las uvas como de sus extractos para conocer la repercusión que tiene un almacenamiento prolongado sobre los compuestos fenólicos y, más en concreto, sobre los antocianos responsables del color (ya que se trata de compuestos inestables que evolucionan

a lo largo del tiempo).

2.- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Reactivos

Los reactivos utilizados, todos ellos de calidad analítica, son los que se detallan a continuación: ácido clorhídrico (HCl) 37% y etanol (EtOH) 96% (Scharlau) y metabisulfito sódico ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) (Panreac).

2.2 Equipos

Para llevar a cabo el estudio de trituración de la muestra se utilizaron un Homogencizador Ultra-Turrax T25 y una Batidora Taurus Bapi600 de 10 velocidades. Para centrifugar las muestras se usó una Centrifuga Universal 32 R de Hettich. Las medidas colorimétricas se realizaron con un Espectrofotómetro Helios g de Thermo Electrón.

2.3 Muestras

El seguimiento de la maduración fenólica se realizó evaluando el contenido fenólico de las uvas recogidas en diferentes estadios de maduración de 7 variedades tintas (Pinot noir, Merlot, Tempranillo, Syrah, Garnacha, Cariñena y Cabernet sauvignon) en la finca y bodega experimental de *Mas dels Frares*, con la que cuenta la Facultad de Enología en Constantí (Tarragona).

2.3.1 Selección de las bayas en la parcela

Para asegurar la representatividad de la muestra analizada se seleccionaron 100 uvas sanas tomadas por el mismo analista, a primera hora de la mañana, de calles centrales y cepas alternadas, combinando sol, sombra y distintas partes del racimo (hombros, parte central y puntas).

2.3.2 Preparación de las uvas para el análisis

Se contaron 100 bayas y se pesaron, tras quitar el pedicelo, para poder expresar los resultados en términos de peso o baya. Seguidamente las bayas se trituraron enteras asegurándose de obtener una pasta homogénea.

2.4 Método de extracción

El método utilizado en este trabajo se ha basado en una micro-maceración en medio hidroalcohólico ácido a 40°C. Para ello, después de triturar las uvas, se pesan exactamente 50 g de pasta y se llenan a un vaso de precipitados de

250 ml donde se maceran con solución extractante (85 ml de ácido clorhídrico 0.1 % v/v + 15 ml de etanol 96 % v/v) durante 15 min a 40°C, en un recipiente tapado, bajo agitación constante. Transcurrido este tiempo, la muestra se centrifuga y el sobrenadante se filtra sobre lana de vidrio. Se lava el residuo con unos mililitros de solución extractante para asegurarnos de extraer todo el color y, a continuación, se centrifuga de nuevo y se añade el líquido de lavado al sobrenadante obtenido anteriormente. Para acabar, el extracto obtenido se lleva a un matraz aforado de 200 ml y se enrasa con la misma solución extractante para trabajar siempre con un volumen final constante.

2.5 Medidas analíticas

Los parámetros medidos para determinar el potencial fenólico de las uvas fueron:

Intensidad colorante (IC): Este parámetro nos indica la cantidad de color del extracto, y es la suma de las absorbancias a 420, 520 y 620 nm medidas en una cubeta de cuarzo de 10 mm de camino óptico [13]:

$$I.C. = (A_{420} + A_{520} + A_{620})$$

Índice de polifenoles totales (IPT): Los compuestos fenólicos totales se estimaron por la medida de la absorbancia a 280 nm del extracto, previamente diluido 1/50 en agua destilada, en una cubeta de cuarzo de 10 mm [14]:

$$IPT \text{ (u.a.)} = A_{280} \times FD$$

Para expresar el contenido polifenólico total (CPT) en g/kg de uva, se multiplica el IPT por 0.08 (referido en g/L de tanino extraído de Masquelier) y por la relación volumen extracto (ml)/ peso triturado (g) [6]:

Antocianos totales (AT): La concentración de Antocianos totales se midió mediante el método de Puissant & Leon [15], y por el método Ribereau-Gayon & Stonestreet [16], con el fin de comparar los resultados obtenidos con ambos métodos.

a) **Método de Puissant & Leon:** Se diluye el extracto 1/20 con HCl 1% y se mide la A₅₂₀ en una cubeta de 10 mm.

$$AT \text{ (mg/L)} = A_{520} \times 22.76 \times FD$$

b) **Método de Ribereau-Gayon & Stonestreet:** Se mezclan 250 µl de extracto, 250 µl de etanol (96%) y 5 ml de HCl (0.7%). Se divide la mezcla resultante en dos porciones de 2.5 ml y se llevan a dos tubos de ensayo. A uno de ellos se le añade 1 ml de agua destilada (tubo 1) y al otro 1 ml de una disolución saturada de Na₂S₂O₅ (tubo 2). Después de 10 min, se mide la diferencia entre las absorbancias de los dos tubos a 520 nm.

$$AT \text{ (mg/L)} = dA_{520} \times 875$$

El valor 875 es el coeficiente de extinción molar de la malvidina-3-glucósido corregido para expresar el resultado en mg/L de extracto.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tal y como ya se ha comentado anteriormente,

este estudio consta de dos partes. En una primera etapa se procedió al estudio y optimización de un método analítico para la estimación de los parámetros de madurez fenólica más utilizados en uvas tintas y el establecimiento de sus parámetros de calidad analítica. En la segunda parte se realizó el seguimiento de la estabilidad de las muestras en el tiempo.

3.1. Optimización del método analítico

Para conseguir un método analítico que nos permitiera evaluar los parámetros del color de la uva a lo largo del proceso de maduración fenólica, se tomó como punto de partida el método ITV estándar [7]. Este es un método que, según los autores, fue validado mediante datos procedentes de diferentes regiones vitícolas francesas y a partir de los cuales se obtuvo un coeficiente de variación <5%. Considerando la buena reproducibilidad, éste parecía un método apropiado, y más, teniendo en cuenta que el método se había aplicado en regiones vitícolas próximas a la nuestra, con clima, prácticas encaminadas a obtener productos de máxima calidad, en términos de rendimiento de producción. Así pues, con el fin de obtener un método lo más rápido posible y con una fiabilidad adecuada, se han

minar concentraciones de analitos a niveles de traza.

Batidora Taurus Bapi600 de 10 velocidades (a velocidad máxima), de uso doméstico.

Se hicieron cuatro replicados (para cada tipo de homogenizador) de obtención de triturados a partir de 50 uvas de la variedad Pinot Noir y también de la variedad Tempranillo. Se escogieron estas variedades para comparar la extracción de los compuestos responsables del color en uvas de diferentes tamaños de baya y en diferentes estadios de maduración ya que, en la misma fecha, la Pinot Noir está madura, por ser una variedad de maduración muy temprana, mientras que el Tempranillo está aun en las primeras etapas de maduración.

Después de analizar la varianza (ANOVA) de los datos y comparar el valor crítico teórico con el valor experimental, se concluyó que, en concordancia con los resultados de Cynkar *et al.* [17], no existen diferencias estadísticamente significativas entre utilizar homogeneizador o batidora sobre los parámetros medidos (IC, IPT y Antocianos totales). Por esta razón se ha optado por utilizar el de más fácil manejo y limpieza que es la batidora doméstica. En la tabla 1 se muestran los resultados del ensayo:

Muestra	50 uvas (g)		Volumen (ml)	Extracto					
	IC	IPT		AT (mg/kg)	IC	IPT	AT (mg/kg)	IC	IPT
U-T (1)	74,4	91,7	130	9,38	6,12	30,85	32,10	508,30	139,30
U-T (2)	75,1	92,7	130	9,93	5,95	35,55	30,55	551,98	139,07
U-T (3)	74,6	92,1	130	10,17	6,62	35,13	30,63	593,32	156,82
U-T (4)	74,8	92,1	130	10,26	6,58	37,55	33,65	581,10	152,27
Batidora (1)	74,6	85,7	130	9,98	7,02	33,25	30,35	536,12	152,50
Batidora (2)	74,8	85,5	130	9,71	6,85	34,48	30,20	499,98	154,55
Batidora (3)	73,0	85,8	130	9,10	6,62	34,50	30,05	494,78	148,17
Batidora (4)	75,2	85,5	130	9,29	6,61	35,23	30,38	523,64	148,85
Análisis de la Varianza				<i>F</i> (experimental)					
				<i>F</i> (valor crítico)					

Tabla 1. Influencia de la trituración de las muestras sobre la extracción. Variedad: Pinot Noir y Tempranillo. Nota: IC: A420+A520+A620; IPT: A280; AT: A520, método HCl 1%.

estudiado y optimizado las principales etapas: trituración de las uvas y tiempo y temperatura de maceración.

3.1.1. Trituración de las uvas

Uno de los objetivos de la preparación de la muestra a analizar es convertir su forma original en una forma estable y homogénea. Si la muestra no está apropiadamente preparada para su análisis, los resultados no serán reproducibles. Se compararon dos tipos muy distintos de equipos homogenizadores para saber si los parámetros de calidad de las uvas podrían estar influenciados por la diferente trituración de las mismas:

Homogeneizador Ultra-Turrax T25 a 24.000 r.p.m., diseñado para uso de laboratorio y deter-

3.1.2. Tiempo y temperatura de maceración

Uno de los factores más determinantes a la hora de realizar cualquier análisis es el tiempo necesario para llevarlo a cabo. En el caso que nos ocupa, la etapa más crítica, en términos de tiempo, es la extracción de los polifenoles. Es por ello que se realizó un estudio de la cinética de extracción de estos compuestos en 4 variedades de nuestra finca (Tempranillo, Merlot, Pinot Noir y Syrah) en el transcurso de una maceración de 2 horas tomando submuestras cada 15 minutos y midiendo los distintos parámetros de color (IC, IPT y AT). Para obtener valores lo más fiables posible, se comprobó esta cinética sobre las distintas variedades de uva estudiadas por duplicado y en diferentes estadios de madu-

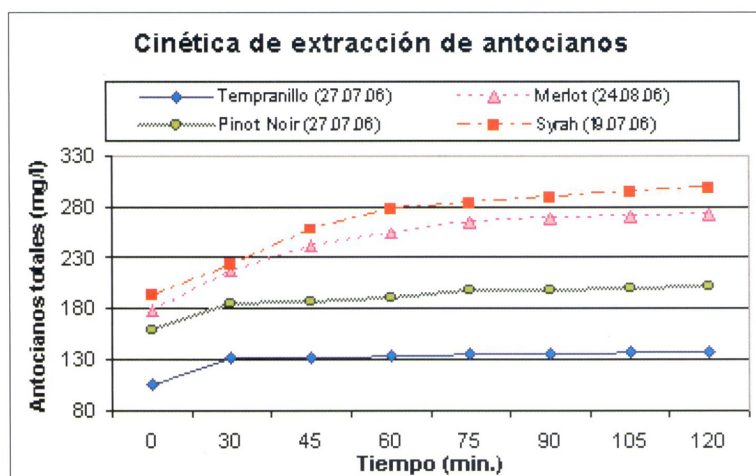


Fig. 1. Cinética de extracción de antocianos.

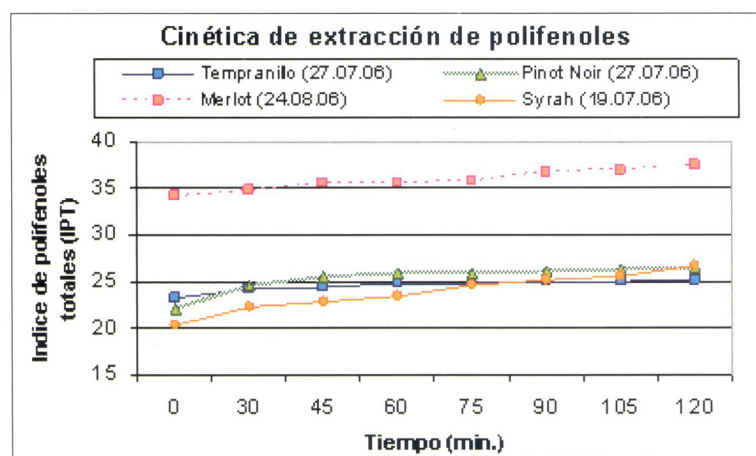


Fig. 2. Cinética de extracción de polifenoles.

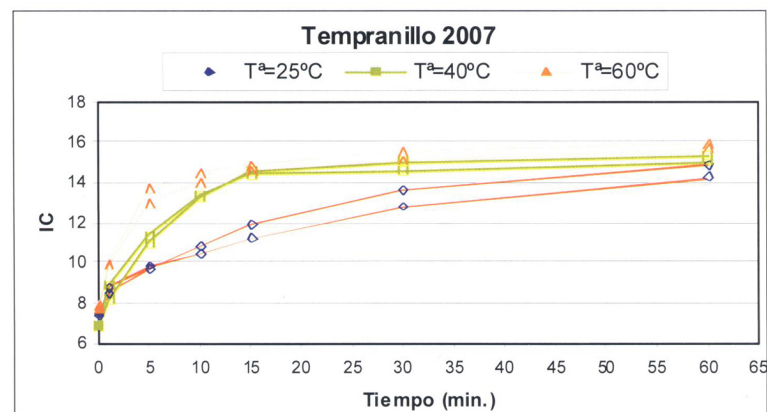


Fig. 3. Cinética de extracción del color en uva Tempranillo a tres temperaturas diferentes (25°C, 40°C y 60°C).

ración, ya que la madurez es un factor a tener en cuenta sobre la extractabilidad de polifenoles [18-20]. Los resultados obtenidos mostraron la misma tendencia cualquiera que fuera el parámetro medido. A modo de ejemplo, en las Fig. 1 y 2 se presentan la evolución de los antocianos y polifenoles totales del homogenizado en el transcurso de 2 horas. Valorando el compromiso entre el tiempo de maceración y la eficacia de la extracción, se puede comprobar que 1 hora de maceración del triturado de uva es suficiente para la extracción de la mayoría de los compuestos fenólicos.

Por otra parte, teniendo en cuenta que, aparte del momento de maduración de la uva, la temperatura también puede influir sobre la extracción de compuestos, se hacía necesario evaluar el efecto de este parámetro. Para ello se compararon los resultados obtenidos trabajando a temperatura ambiente, a 40°C y 60°C. Con el fin de conseguir unos resultados lo más representativos posible, se realizaron ensayos con diferentes variedades de uva y estadios de madurez. En cada ensayo se tomaron 300 uvas y después de triturar se repartieron entre 6 erlenmeyers (50 g de triturado en cada uno), de manera que las 3 maceraciones (a Tª ambiente, 40°C y 60°C) se hicieron por duplicado. Las submuestras se tomaron a t = 0, 1, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos. Tras centrifugarlas y filtrarlas se midió la Intensidad colorante (IC), el IPT y los antocianos (AT) de cada una de ellas. Los resultados obtenidos demostraron que, a mayor temperatura de maceración, más favorecida se ve la cinética de extracción de los analitos. Este comportamiento fue similar para todas las variedades de uva y se ilustra en las Fig. 3, 4 y 5 con la variedad Tempranillo.

La explicación a estos resultados la encontramos en el hecho de que temperaturas próximas a 40°C hacen más frágiles las paredes celulares de los hollejos, favoreciéndose el rendimiento de la extracción. A 60°C se obtienen resultados similares que a 40°C pero, a valores tan elevados de temperatura, los antocianos pueden degradarse y evolucionar hacia otros compuestos que ya no poseen color rojo. Así pues, queda claro que, de entre las opciones evaluadas, la mejor resulta ser la de 40°C ya que esta temperatura permite obtener, en sólo 15 minutos de maceración, el mismo rendimiento de extracción de polifenoles que el que se obtiene con 1 hora de maceración a temperatura ambiente.

3.1.3.- Determinación de Antocianos totales (AT)

La optimización del método pasa por la utilización de una técnica de medida de antocianos totales precisa, sencilla y rápida. Por ello, se compararon los dos principales métodos de medida de antocianos totales: el método de Puissant & Leon [15] por acidificación del medio con HCl 1% y el método de Ribéreau-Gayon & Stonestreet [16] por decoloración con SO₂.

En ambos métodos, para expresar el resultado de antocianos totales referido a Kg de uva, empleamos la fórmula:

$$AT \text{ (mg/ Kg)} = AT \text{ (mg/L)} \times \frac{\text{(ml extracto obtenido / g triturado)}}{\text{(ml extracto obtenido / g triturado)}}$$

Para llevar a cabo esta comparación, se aplicaron ambos métodos de medida de antocianos a 200 muestras de uvas que agrupaban variedades distintas y diferentes grados de maduración. Tal y como se refleja en la Fig. 6, los resultados obtenidos con uno y otro método presentaron una buena correlación, aunque cabe destacar que difieren ligeramente en términos de magnitud.

Concretamente, con el método de Puissant & Leon se obtienen resultados un 20-25% más bajos que por el de Ribéreau-Gayon & Stonestreet, aunque hay que tener en cuenta que el primero es más sencillo y directo.

El hecho de tener una respuesta distinta según el método utilizado, nos llevó seguidamente a calcular la corrección que habría que aplicar sobre el coeficiente 22.76 de la fórmula original del método de de Puissant & Leon, para obtener un resultado comparable al del método de Ribéreau-Gayon & Stonestreet. Tras la corrección, la fórmula a emplear queda de la siguiente manera:

$$\text{Antocianos totales (mg/L)} = A_{520} \times 28,6 \times \text{FD}$$

Por otro lado, se comprobó la repetitividad de ambos métodos midiendo los antocianos totales del mismo extracto 10 veces con cada uno de los dos métodos. Para el ensayo se analizaron los extractos de dos variedades de uva diferentes, Syrah y Pinot noir. Los resultados mostraron que el método de Puissant & Leon es más preciso, con un coeficiente de variación < 1%, mientras que el método de Ribéreau-Gayon & Stonestreet presenta un coeficiente de variación algo mayor (< 3%). Ambos métodos muestran una precisión aceptable, pero se adoptó el método de Puissant & Leon por ser más rápido y cómodo.

3.2. Estudio de la estabilidad de las muestras

Como se ha indicado anteriormente, en estudios de investigación a menudo se requiere conservar la uva para evitar su deterioro hasta el momento de procesarla, desconociéndose el impacto sobre el recuento de los compuestos fenólicos. Para evaluar la estabilidad de las muestras, se estudió el efecto sobre el color (IC) y el contenido polifenólico (IPT y AT) que tiene una conservación prolongada de las uvas tintas en distintas condiciones. En todos los casos, para comprobar la posible degradación de la muestra durante su almacenamiento se midieron los valores de estos parámetros de distintas muestras (diferentes variedades en distintos estados de maduración y, por lo tanto, con distinta concentración de compuestos fenólicos)

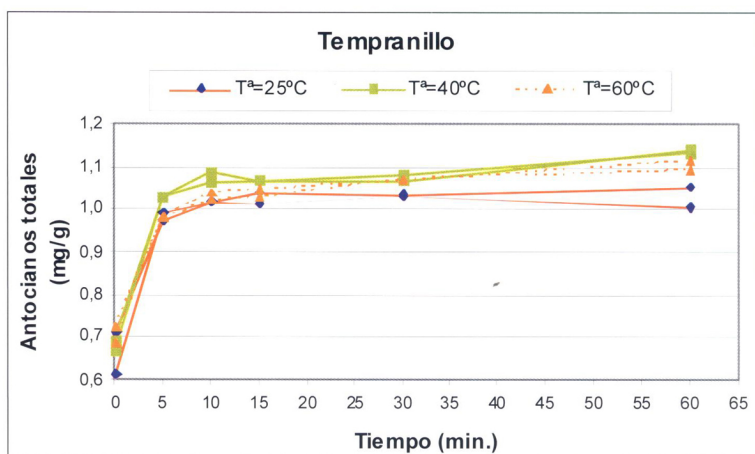


Fig.4. Cinética de extracción de antocianos en uva Tempranillo a tres temperaturas diferentes (25°C, 40°C y 60°C)

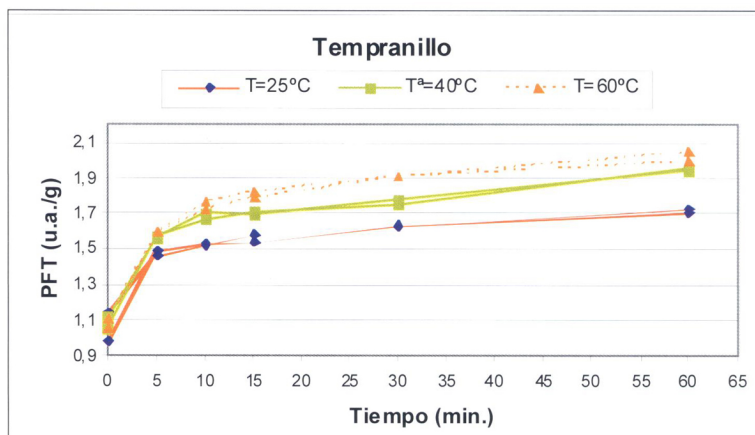


Fig.5. Cinética de extracción de polifenoles totales en uva Tempranillo a tres temperaturas diferentes (25°C, 40°C y 60°C)

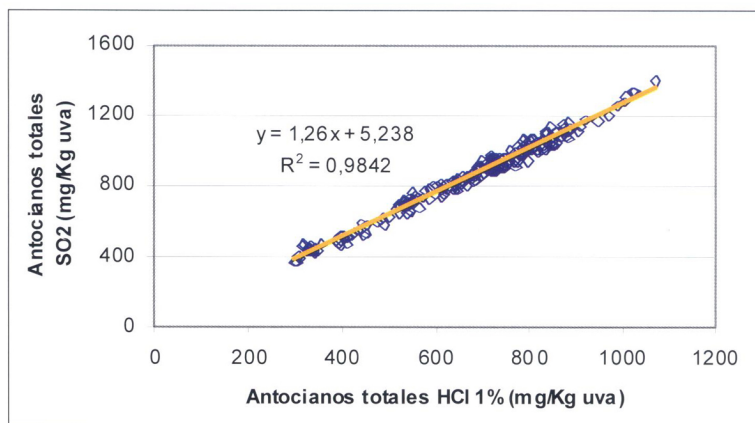


Fig. 6. Contenido de antocianos según el método de Puissant & Leon vs el de Ribéreau-Gayon & Stonestreet.

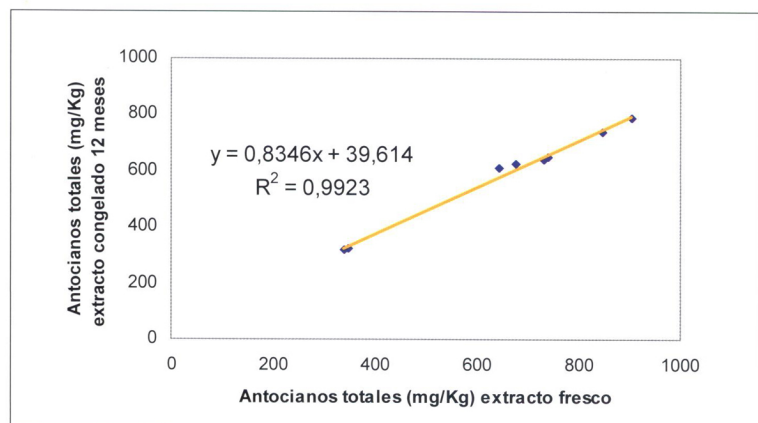


Fig. 7. Relación entre los antocianos medidos en el extracto fresco y en el congelado transcurridos 12 meses.

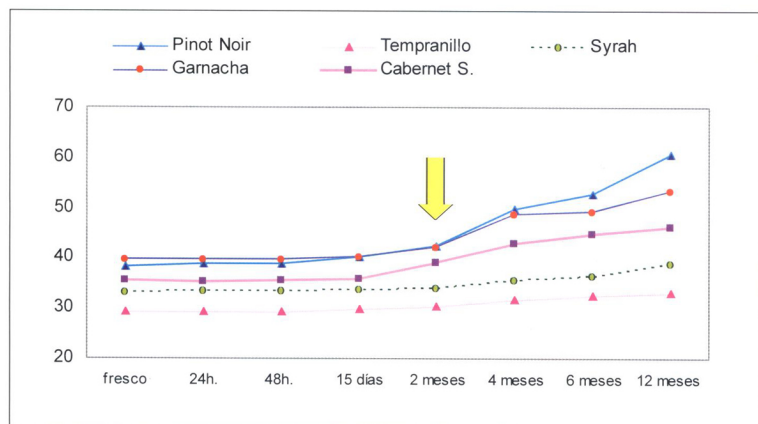


Fig. 8. Evolución de la tonalidad [(A420/A520) x 100] de extractos conservados en refrigeración (4°C) a lo largo de 1 año.

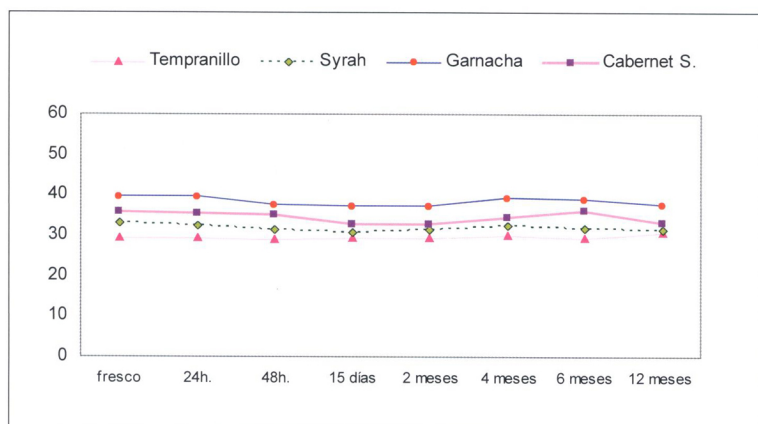


Fig. 9. Evolución de la tonalidad [(A420/A520) x 100] de extractos conservados en congelación (-20°C) a lo largo de 1 año

tras distintos periodos de conservación y se compararon con los valores de las mismas muestras frescas, es decir, analizadas recién recolectadas.

3.2.1. Estabilidad de las uvas refrigeradas y congeladas
 El primer estudio que se llevó a cabo consistió en comprobar el efecto que tiene sobre el color y los compuestos fenólicos el conservar las uvas refrigeradas (4°C) y congeladas (-20°C).

En el caso de la conservación de las uvas en el refrigerador a lo largo de dos semanas, los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la ineficacia de dicho tipo de conservación. A esta conclusión se llega si se tiene en cuenta que al correlacionar los valores de IC, IPT y AT de las muestras frescas con las refrigeradas sólo se obtienen unos coeficientes de regresión de 0.90, 0.83 y 0.75, respectivamente. Estas diferencias podrían estar relacionadas con que la uva pierde agua y firmeza con el tiempo, lo cual influiría en el recuento de los compuestos fenólicos.

En el estudio del efecto de la congelación de las uvas se observó algo parecido. En este caso, el coeficiente de regresión entre uvas frescas y congeladas fue de 0.73 en AT, de 0.84 en IPT y de 0.78 en IC. Estas variaciones se deben, muy probablemente, a que en las uvas congeladas los cristales de hielo rompen las membranas de las células de los hollejos facilitando la salida de los antocianos, lo cual falsearía el resultado [17, 21].

A la vista de los resultados obtenidos se hace patente que ni un análisis de uva refrigerada más de 24 horas ni un análisis de uva congelada reflejan la realidad de la uva en la cepa para un estudio de seguimiento de madurez fenólica.

3.2.2. Estabilidad de los extractos

Prosiguiendo con el estudio, se decidió comprobar la estabilidad en el tiempo de los extractos obtenidos a partir de las muestras recién recolectadas utilizando el método optimizado. Una vez obtenidos los extractos, una parte de éstos se mantuvo en refrigeración a 4°C y el resto se congeló a -20°C.

Los parámetros de color de los extractos refrigerados mostraron una correlación lineal perfecta a las 24h respecto al extracto fresco ($R^2 > 0.99$). Al prolongarse el estudio de la conservación de los extractos refrigerados a lo largo del tiempo (48 h, 15 días, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 12 meses) se comprobó que esta correlación se mantiene hasta los dos meses ya que, a partir de aquí, el valor del coeficiente de correlación empieza a bajar hasta que, a los 12 meses, llega a un valor de 0.93.

Por otro lado, se quiso también comprobar los resultados obtenidos congelando el extracto obtenido y midiendo los parámetros de color a lo largo del tiempo (24 h, 48 h, 15 días, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 12 meses). En este caso, se comprobó que los extractos congelados son mucho más estables que los refrigerados ya que la correlación de estos con los frescos presentaba un $R^2 = 0.99$, valor que se mantuvo a lo largo

de los 12 meses que se prolongó el estudio.

Estos resultados demostraron que el extracto no sufre una variación significativa en su composición. Esto significa que el extracto congelado es estable y que, por lo tanto, es la herramienta perfecta para conservar intactos los parámetros de la uva en el momento del muestreo, lo cual permitiría el seguimiento de la madurez fenólica de forma fiable.

3.2.3. Influencia del tiempo en la calidad de los extractos

Con los estudios presentados en los párrafos anteriores, se demostró que los parámetros de color medidos en los extractos no variaban con el tiempo si se mantenían en unas determinadas condiciones. Sin embargo, para comprobar la validez real de este método de conservación, se hacía necesario comprobar también la conservación de la calidad del extracto, es decir, comprobar si se mantenía el color original de la muestra recién recolectada. Se sabe que con el tiempo, el color rojo (A_{520}) de los antocianos se pierde por oxidación o por combinaciones con otros compuestos que hacen aumentar la componente amarilla (A_{420}). Así pues, en esta parte del estudio se hizo un seguimiento de las componentes roja ($\%A_{520}$), amarilla ($\%A_{420}$) y tonalidad (importancia relativa del amarillo sobre el rojo $(A_{420} / A_{520}) \times 100$) de los extractos refrigerados y congelados.

La gráfica 8 muestra la evolución de la tonalidad de los extractos conservados en refrigeración y la 9 muestra la evolución de la tonalidad de los extractos conservados en congelación. Se observa un crecimiento progresivo de la componente amarilla en los extractos refrigerados, que se hace patente a partir de los 2 meses, mientras que este comportamiento no se aprecia en los extractos congelados. El estudio de la evolución de la componente roja a lo largo del tiempo confirmó que los extractos refrigerados pierden su color rojo con el tiempo.

Podemos afirmar que el extracto refrigerado muestra el mismo comportamiento que un vino: crece ligeramente su componente amarilla en detrimento de la roja. Esto se explica por las combinaciones directas entre taninos y antocianos que disminuyen el color rojo y elevan la tonalidad anaranjada del extracto. La congelación evita este tipo de reacciones de manera que los extractos congelados se mantienen estables durante más tiempo, permitiendo un análisis más fiable que el de los extractos refrigerados.

3. CONCLUSIONES

Tal y como ya se ha expuesto a lo largo de este trabajo, y a partir de los resultados obtenidos en la optimización del método de extracción de los compuestos fenólicos se concluye que:

El empleo de equipos homogenizadores de distinta naturaleza no supone diferencias significativas sobre el recuento de compuestos fenólicos, por lo que cada laboratorio puede optar por el que considere más conveniente, siempre

que ambos trituren las mismas partes de la baya.

Si en lugar de trabajar a temperatura ambiente (como se trabaja en el método de partida) se aumenta la temperatura de trabajo a 40°C, el tiempo de extracción pasa de 1 hora a tan solo 15 minutos, lo que disminuye considerablemente el tiempo de análisis. Para llevar a cabo el recuento de antocianos totales de manera más rápida y sencilla que con el método de Ribéreau-Gayon & Stonestreet [16], y obteniendo resultados similares, puede utilizarse el método de Puissant & Leon [15] aplicando una corrección sobre su fórmula. Respecto al estudio realizado sobre la conservación de muestras se llega a las siguientes conclusiones. Hay que evitar trabajar con uvas que no sean frescas (sea cual sea el método de conservación empleado) dada la escasa fiabilidad de los resultados que éstas proporcionan. Se puede trabajar con extractos de uvas conservados de manera controlada ya que éstos aportan toda la información de la uva fresca, tanto en términos de concentración de polifenoles como en facilidad para ser extraídos. En lo que al método de conservación se refiere, los extractos congelados se muestran más estables en el tiempo que los refrigerados, por tanto, la congelación de los extractos (y no de las uvas) es el procedimiento correcto de conservación de muestras.

Agradecimientos:

Los autores agradecen al MCyT por la financiación de este trabajo a partir del proyecto AGL 2003-04995.

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Barceló, J.M. 1997. La gestion de la maturation: le premier acte œnologique. Incidence sur les profils de vins de Syrah dans les Côtes du Rhône. *Revue Française d'Œnologie*, 165 (24-26).
- [2] González-Sanjosé, M. L.; Diez, C., 1992. Relationship between anthocyanins and sugars during the ripening of grape berries. *Food Chemistry* 43 (193-197).
- [3] Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D., 2000 *Handbook of Enology (Vol 2). The Chemistry of Wine. Stabilization and Treatments.* Wiley.
- [4] Freitas, V.; Glories, Y. 2000. Developmental changes of procyanidins in grapes of red *Vitis vinifera* varieties and their composition in respective wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51 (4): 397-401.
- [5] Saint-Criq, N.; Vivas, N.; Glories, Y., 1998. Maturité phénolique : définition et contrôle. *Revue Française d'Œnologie*, 173 (22-25).
- [6] Lamadon, F., 1995. Protocole pour l'évaluation de la richesse polyphénolique des raisins. *Revue des Œnologues*, 76 (37-38).
- [7] Cayla, L.; Cottareau, Ph. ; Renard, R., 2002. Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard.

Revue Française d'Œnologie, 193 (10-16).

- [8] Iland, P.; Bruer, N.; Edwards, G.; Wilkes, E., 2004. *Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts.* Ed. Wineitles.
- [9] Glories, Y., 2001. Caractérisation du potentiel phénolique : adaptation de la vinification. *Progress Agricole et Viticole* 118, N° 15-16 (347-350).
- [10] Venencie, C.; Uveira, M.-N.; Guiet, S., 1997. Maturité polyphénolique du raisin mise en place d'une méthode d'analyse de routine. *Revue Française d'Œnologie*, 167 (36-41).
- [11] Spagna, G.; Barbagallo, R.N.; Todazo, A.; Durante, M.J.; Pifferi, P.G., 2003. A method for anthocyanin extraction from fresh grape skin. *Italian Journal of Food Science*, 3, vol.15 (337-345).
- [12] Di Stefano, R.; Clavero, M.C., 1991. Metodi per lo studio dei polifenoli dell'uva. *Rivista di viticoltura e di enologia* 2, (37-45).
- [13] Glories Y., 1984. La couleur des vins rouges. 2^e Partie : Mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, 18(253-271).
- [14] Ribereau-Gayon, J.; Peynaud, E. ; Sudraud, P. ; Riberau-Gayon, P., 1980. *Tratado de Enología. Ciencias y Técnicas del vino. Análisis y control de vinos.* Tomo I. Buenos Aires (Argentina), Ed. Hemisferio Sur S.A.
- [15] Puissant, A.; Leon, H., 1967. La matière colorante des grains de raisins de certains cépages cultivés en Anjou en 1965. *Annales de technologie agricole*, 16, 3, (217-225).
- [16] Ribereau-Gayon, P.; Stonestreet, E., 1965. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin de la Société de Chimie*, 9 (2649-2652).
- [17] Cynkar, W.U.; Cozzolino, D.; Damberg, R.G.; Janik, L.; Gishen, M., 2004. The effects of homogenisation method and freezing on the determination of quality parameters in red grape berries of *Vitis vinifera*. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, ani Joutei, K.; Glories, Y., 1995. Tanins et anthocyanes : localisation dans la baie de raisin et mode d'extraction. *Revue Française d'Œnologie*, 153 (28-31).
- [19] Saint-Criq, N.; Vivas, N.; Glories, Y., 1998. Apports récents à l'interprétation des critères de la qualité des vins rouges. *Revue Française d'Œnologie*, 169 (19-25).
- [20] Saint-Criq, N.; Vivas, N.; Glories, Y., 1999. Maduración fenólica de las uvas tintas. Relación con la calidad de los vinos. Comparación entre los cepajes Merlot y Tempranillo. *La Semana Vitivinícola*, 2747 (1047-1051) y 2748 (1126-1136).
- [21] Guerra, M.T.; Sánchez, M.I.; Domingo, C.; Santos, C.; Rivas, J.C., 1997. Comparación de los resultados obtenidos en vinificaciones realizadas con uvas frescas y congeladas. XVIII Jornadas de viticultura y enología Tierra de Barros, Almedralgo, 6-10-mayo 1996. ISBN 84-7930-064-7 (379-383).

ANEXO 3

**PREDICTION OF RED WINE COLOUR AND PHENOLIC PARAMETERS
FROM THE ANALYSIS OF ITS GRAPE EXTRACT**

International Journal of Food Science and Technology (pendiente de publicación)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

	1	J	F	S	2	7	8	4	B	Dispatch: 19.8.11	Journal: IJFS	CE: K. Karthik
	Journal Name				Manuscript No.					Author Received:	No. of pages: 10	PE: Sathya Kala

Original article

Prediction of red wine colour and phenolic parameters from the analysis of its grape extract

Sandra Frago, Josep Guasch, Laura Aceña, Montserrat Mestres and Olga Busto*

Group of Analytical Chemistry of Wine and Food, Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry, Faculty of Oenology of Tarragona, Rovira i Virgili University, Campus Sescelades. 43007 Tarragona, Spain

(Received 20 March 2011; Accepted in revised form 1 August 2011)

Summary Herein, the phenolic composition and colour attributes of red grapes extracts (obtained with a fast methodology) were correlated with those of their corresponding wines to predict the final quality properties of wines. The phenolic parameters were evaluated as total phenolic compounds (TPC), total anthocyanins (TA) and total condensed tannins (TCT), whereas the chromatic parameters were evaluated as colour intensity (CI), tonality (To), and the percentages of yellow, red and blue tones. All of them were determined by usual UV-Vis spectrophotometric methods. To get robust models, grapes of five red varieties were collected at three different ripening stages throughout the 2009 vintage. Good correlations between the results from grapes and wines were obtained, showing high regression coefficients and low prediction errors for TPC ($R^2 = 0.929$, RMSE = 5.99%), TA ($R^2 = 0.953$, RMSE = 7.23%) and CI ($R^2 = 0.954$, RMSE = 7.58), concluding that these wine phenolic properties can be predicted reliably from the extracts obtained with an optimised fast extraction method from grapes on the ripening controls along the maturity process.

Keywords Chromatic parameters, phenolic compounds, phenolic ripening, red grapes, wine quality prediction.

Introduction

The harvest date is one of the most critical factors to get quality red wines and it is conditioned by the ripeness grade of grapes. Traditionally, the grape ripeness has been determined by the technological ripening, also called pulp ripening, that implies the measure of the sugar/acid ratio in the pulp of grapes because both parameters give to wine its characteristic alcohol-acidity balance after alcoholic fermentation. However, when considering red grape varieties, it is also necessary to determine the phenolic ripening as it influences the stability of the red wine colour, mainly if that wine will be aged. From an oenological point of view, anthocyanins and tannins are the two most important phenolic families in red grapes. Anthocyanins, located at the red grape skins, are responsible for the red wine colour, while tannins, located at grape seeds and skins, play an important role on some of the mouth-feel properties, as astringency and bitterness, as well as on the colour stabilisation of red wines during storage (Ribéreau-

Gayon *et al.*, 1999). Both the quantity and the extractability of anthocyanins and tannins increase throughout grape ripening. Indeed, wines obtained from well-ripe grapes have much colour and are richer in phenolic compounds than wines obtained from unripe grapes (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1999). Although the phenolic composition of grapes is affected by many factors, the most important are the grape variety (Romero-Cascales *et al.*, 2005) and the climatic conditions (Chorti *et al.*, 2010).

Although there are a great number of different methods to determine the phenolic ripening of grapes, up to now, none universal method is accepted. Among all the published methods about grape phenolics extraction, it can be distinguished between the ones where the whole berries are analysed (Lamadon, 1995; Saint-Cricq *et al.*, 1998; Cayla *et al.*, 2002; Iland, 2004; Jensen *et al.*, 2007; Frago *et al.*, 2011) and the ones where skins and seeds are separately processed (Di Stefano & Cravero, 1991; Venencie *et al.*, 1997; Spagna *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2008).

The main variables that influence the yield and rate of phenolic extraction from grapes are particle size, temperature, maceration time, pH, solvent-to-solid ratio and type of solvent used. All these variables have been

*Correspondent: Fax: + 34977558446;
e-mail: olga.busto@urv.cat

1 optimised in a previous study and the extraction method
2 developed allows obtaining representative phenolic
3 extracts in only 15 min (Fragoso *et al.*, 2011).

4 The correlation between the phenolic composition of
5 grapes and the phenolic composition and the colour
6 properties of their corresponding wines has been already
7 studied, because it could be a good way to predict the
8 wine characteristics after winemaking and, therefore, to
9 determine the optimum harvest date. In some cases, the
10 prediction cannot be performed due to the mismatch
11 between the phenolic composition of grapes and wines
12 (Gonzalez-Neves *et al.*, 2002; Mattivi *et al.*, 2002; Ro-
13 mero-Cascales *et al.*, 2005). On the contrary, there are
14 recent studies that demonstrate that it is possible to
15 obtain good results either by direct regression (Gon-
16 zález-Neves *et al.*, 2004; Cagnasso *et al.*, 2008; Kontou-
17 dakis *et al.*, 2010) or by multivariate calibration
18 (Jensen *et al.*, 2008; Gonzalez-Neves *et al.*, 2010), being
19 this last one widely used in food and wine qualitative
20 analysis (Kallithraka *et al.*, 2001; Tzouros & Arvanito-
21 yannis, 2001).

22 To ensure a high concordance between experimental
23 data and calculated values by using the prediction
24 models it is necessary, not only a high correlation
25 coefficient between the phenolic composition of grapes
26 and wines, but also a low predictive error. Since this
27 information is not provided in the studies carried out up
28 to now and, moreover, the methodologies proposed are
29 time-consuming and difficult to be implemented in
30 cellars, this problem remains unsolved.

31 Thus, the aims of the study herein presented were to
32 find direct relationships between the phenolic composi-
33 tion and the colour attributes of red grapes (determined
34 in the representative extracts obtained by a fast method
35 previously optimised) and those measured in their
36 respective wines, as well as to evaluate the prediction
37 error of these regression models.

38 To build robust models of prediction, we considered
39 the natural variability of the grape samples by using five
40 different red grape varieties collected at different ripen-
41 ing stages.

42 The grape phenolics were extracted by using a fast,
43 simple and accurate extraction procedure that we have
44 previously developed (Fragoso *et al.*, 2011). At the same
45 time, some clusters of these samples were chosen to be
46 microvinified using a standard vinification procedure.
47 The phenolic contents and the chromatic parameters of
48 both sets (grape extracts and wines) were characterised
49 by colorimetric analysis.

50 Materials and methods

51 Reagents and standards

52 The standards of malvidin-3-glucoside (purity $\geq 90\%$)
53 and (+)-catechin (purity $\geq 96\%$) were purchased from

Fluka (Madrid, Spain). Methyl cellulose (M-0387) was
supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Gallic acid
monohydrate (purity of 99.5%) and the rest of chemi-
cals used for the study were of analytical-reagent grade
and provided by Scharlab (Barcelona, Spain). Selected
yeasts (AWRI 596) were purchased from Agrovin
(Ciudad Real, Spain). The fermentation activators
(Actiferm 1 and 2) and the potassium bisulphite
(purity $\geq 95\%$), were supplied by Martin Vialatte Oe-
nologie (Epernay, France).

54 Grape samples

Fresh grapes from five red cultivars (544 vines of
Tempranillo, 424 vines of Merlot, 424 vines of Syrah,
476 vines of Cariñena and 502 vines of Cabernet
sauvignon) were collected from the experimental vine-
yard belonging to the Faculty of Enology (Rovira i
Virgili University) located at Constantí (Tarragona,
Spain). Each grape variety was sampled at three
different ripening stages covering the grapes develop-
ment from 'veraison' (first stage) until harvest (complete
ripeness and last stage) of 2009 vintage.

All along the period of time considered, grape samples
were collected following an identical and precise proto-
col: same vines, properly identified, were sampled in the
morning (8:00 AM) by the same analyst. Then, grapes
were transported immediately to the laboratory.

The sampling was carried out taking into account the
fruit position variability on the cluster, of the cluster on
the vine and of the vine in the vineyard, as well as from
variations in sun exposure to assess a representative
sample of the vineyard. Each sample consisted on 300
berries randomly collected from 100 vines (200 berries
for phenolic ripening and 100 for pulp ripening).
Special care was taken to obtain a wide distribution
of berries in the cluster, so three grapes from each
cluster were selected: one was taken from the top, one
from the bottom, and one from the middle of the
cluster.

56 Grape extracts

The pulp ripening determination at each sampling date
was assessed by measuring the weight corresponding to
100 grapes (g), as well as the total soluble solids ($^{\circ}\text{Brix}$,
by refractometry), total acidity (by titration with
NaOH) and pH of the grape must. Total soluble solids
were directly related to the sugar content of must (g L^{-1})
and probable alcoholic degree (%vol.) of wine.

To carry out the phenolic ripening study, a previ-
ously optimised extraction method (Fragoso *et al.*,
2011) was employed. According to this method, every
set of 200 berries for each sample was de-stemmed and
crushed (including seeds) by a high-speed homogeniser
at 24 000 rpm to obtain a smooth paste. Then, 50 g of

1 homogenate were placed in a stopper flask and 100 mL
2 of extracting solution (85 mL of HCl 0.1% and 15 mL
3 ethanol 96%) were added. Flasks were kept into a
4 thermostatic bath at 40 °C during 15 min under
5 magnetic stirring. This procedure was done in duplicate
6 for each variety and ripening stage. The sample was
7 then centrifuged, the supernatant reserved and the
8 residue re-suspended with 50 mL of the extracting
9 solution. After centrifugation, the supernatant was
10 joined with the first one and the volume was brought
11 to 200 mL with the extracting solution to achieve a
12 constant and exact final volume. Colour and phenolics
13 content of this extract were spectrophotometrically
14 analysed.

16 Micro-vinifications

18 Around 12 kg of grapes of each variety at each of the
19 three ripening stages established were randomly and
20 carefully (only one cluster from each vine and from
21 marked vines which combined sun and shadow) collected
22 and vinified separately. These grapes were collected
23 the same day that the ones used to determine both
24 the pulp and the phenolic ripening analysis.

25 Grapes were manually de-stemmed and crushed using
26 a manual crusher fitted with stainless steel rollers. Then,
27 4 kg of crushed grapes were introduced into a plastic
28 container of 6 L and 0.12 g of K₂S₂O₅ per kilogram of
29 grape was added

30 The alcoholic fermentation was carried out by selected
31 yeasts (AWRI 596), which were inoculated (0.20 g kg⁻¹
32 of grape) the same day of harvest. Fermentation
33 activators were firstly added 24 h after yeast inoculation
34 (Actiferm 1) and also when density values arrived at
35 1040–1050 g L⁻¹ (Actiferm 2). Must density and temperature
36 were daily measured. Must temperature during
37 fermentation was controlled by keeping the plastic
38 containers into a thermo-controlled room in order to
39 prevent the temperature from exceeding 30 °C.

40 When the alcoholic fermentation finished (between
41 the 5th and the 7th day) the subsequent maceration was
42 extended until the 10th day. During both periods, the
43 cap was punched down once a day. The 10th day, an
44 aliquot of 20 mL of each free-run wine was taken to be
45 analysed.

47 Instrumentation

49 Grapes were homogenised using a high-speed homogeniser
50 Ultra-Turrax[®] T-18 (IKA, Wilmington, USA)
51 equipped with a S18N-19G rotating shaft. Sample
52 centrifugation was carried out by a Hettich Universal
53 32 R centrifuge (Tuttlingen, Germany). The absorbances
54 were measured using a Helios γ Thermo Spectronic
55 UV-Vis spectrophotometer (Thermo Electron
56 Corporation, Cambridge, UK).

Analytical measurements

The phenolic parameters measured on both grape
extracts and wines were total phenolic compounds
(TPC), total anthocyanins (TA) and total condensed
tannins (TCT). The chromatic Glories parameters used
to describe their respective colour on both grape extracts
and wines were measured as colour intensity (CI),
tonality (To), percentage of yellow (%Yellow), percentage
of red (% Red) and percentage of blue (%Blue)
(Glories, 1984). All these parameters were determined
by spectrophotometric analyses.

Colour Intensity represents the total amount of colour.
It was calculated as the sum of the absorbances at 420,
520, and 620 nm measured in a 1 mm quartz cuvette,
although it was expressed for a 10 mm optical path
cuvette (Eq. 1).

Tonality indicates the relationship of the yellow-
orange pigments (420 nm) over the red ones (520 nm)
(Eq. 1):

$$CI = A_{420} + A_{520} + A_{620}. \quad To = \frac{A_{420}}{A_{520}} \quad (1)$$

Colour composition indicates the contribution of each
one of the three components (yellow, red and blue) in
the overall colour (Eq. 2):

$$\%Yellow = \frac{A_{420}}{CI} \times 100. \quad \%Red = \frac{A_{520}}{CI} \times 100. \\ \%Blue = \frac{A_{620}}{CI} \times 100 \quad (2)$$

Total phenolic compounds were determined by measuring
the absorbance at 280 nm after dilution 1:50 with
distilled water in a 1 cm quartz cuvette (Ribéreau-
Gayon *et al.*, 1999). TPC content was expressed in mg of
gallic acid by the external standard method.

Total anthocyanins were determined by measuring the
absorbance at 520 nm after dilution 1:25 with HCl 0.1 M
in a 1 cm plastic cuvette (Blouin, 1992). TA content was
expressed as mg of malvidine-3-glucoside by the external
standard method.

Total condensed tannins were determined by precipi-
tation with methyl-cellulose (Mercurio *et al.*, 2007). This
is an indirect analytical method that measures the
absorbance difference between the sample (blank) and
the same sample after precipitation with methyl-cellu-
lose at 280 nm. The total condensed tannins were
expressed as mg of catechin by the external standard
method.

Statistical analysis

To determine the statistically significant differences
among the values of the different samples parameters,
the analysis of the variance (ANOVA) and the least

significant difference (LSD) test were performed considering a significance level of $\alpha = 0.05$. These analyses were carried out using Statgraphics Plus 5.1 (2000).

Correlations between grape and wine mean values of colour and phenolic parameters were established by least squares regression using ULC 2.0 computer software (Boque & Rius, 1994). Correlation lines goodness was evaluated by the determination coefficient (R^2) and the on-line linearity (LOL) (Cuadros Rodriguez *et al.*, 1996) parameters.

The data fit to the model and the goodness of the predictions was evaluated by the root mean square error (RMSE) parameter expressed as percentage (RMSE %) which can be defined as the mean error of the model (Eq. 3):

$$RMSE\% = \frac{100}{\bar{y}_i} \left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \right) \quad (3)$$

where N is the number of samples, y_i is the reference value for sample i , \hat{y}_i is the predicted value for sample i , and \bar{y}_i is the mean of the sample values.

Results and discussion

Grape composition

Table 1 shows the values of the experimental parameters for the pulp ripening. As it can be seen, samples covered a wide range of values for the studied parameters, usual for the vineyard region studied. This wide range allowed building a general model that provided general conclusions about the behaviour of varieties along ripening.

It should be noted that the berry weight decreased as the sugar content increased because of the water loss that takes place along ripening, in agreement with previous studies (Roggero *et al.*, 1986; Downey *et al.*, 2003; Ryan & Revilla, 2003; Pérez-Magariño & González-San José, 2006). However it should be also taken into account that the most pronounced lost of water occurs when the harvest date is delayed and an over-ripening effect takes place.

Furthermore, it is also very important to consider the size of grapes because, since anthocyanins are located in the grape skin, a larger berry weight results in a lower skin-to-flesh ratio. Thus, *a priori*, it should be expected that the varieties with the smallest berries (i.e. Cabernet sauvignon followed by Merlot) provide the highest contents of anthocyanins, whereas the biggest berries (i.e. Cariñena followed by Tempranillo), provide the lowest ones.

Regarding the phenolic and chromatic parameters, Table 2 summarises the results obtained for the grape

Table 1 Values corresponding to the pulp ripening parameters of grapes at the three sampling dates

	Syrah			Merlot			Tempranillo			Cariñena			Cabernet sauvignon		
	10 Aug	24 Aug	7 Sep	11 Aug	1 Sep	14 Sep	12 Aug	26 Aug	9 Sep	27 Aug	3 Sep	10 Sep	28 Aug	11 Sep	21 Sep
Weight of 100 berries (g)	188.4	186.0	163.6	173.6	162.0	155.7	253.9	244.8	247.2	303.6	283.3	303.0	158.3	142.3	154.2
Brix	19.0	22.0	23.1	18.3	22.5	24.0	18.5	20.1	20.5	19.5	20.0	21.0	20.0	20.0	21.0
Sugar content (g L ⁻¹)	181.0	215.1	227.6	173.0	220.8	237.9	175.3	193.5	198.1	186.7	192.4	203.7	192.4	192.4	203.7
Potential alcohol (vol %)	10.8	12.8	13.5	10.3	13.1	14.1	10.4	11.5	11.8	11.1	11.4	12.1	11.4	11.4	12.1
Titratable Acidity (g L ⁻¹ tartaric acid)	8.44	5.97	4.81	7.55	5.38	4.89	6.89	4.65	4.23	6.87	6.30	5.72	7.49	6.10	6.35
pH	3.16	3.46	3.56	3.26	3.54	3.67	3.20	3.43	3.50	3.35	3.40	3.51	3.31	3.37	3.38

Table 2 Mean values (n = 2) corresponding to the parameters of extracts at the three chosen sampling dates

Phenolic parameters	Syrah			Merlot			Tempranillo			Cariñena			Cabernet sauvignon		
	24 Aug	7 Sep	11 Aug	1 Sep	14 Sep	26 Aug	9 Sep	27 Aug	3 Sep	10 Sep	28 Aug	11 Sep	21 Sep		
TPC	1692 ^a ±17	1970 ^b ±34	1807 ^a ±32	1844 ^b ±44	1844 ^b ±44	1941 ^a ±23	1529 ^a ±1	1780 ^b ±15	1650 ^c ±35	1009 ^a ±6	1068 ^b ±15	1052 ^b ±6	1389 ^a ±16	1649 ^b ±13	
TA	917 ^a ±0	996 ^b ±18	885 ^a ±6	844 ^a ±10	844 ^a ±10	959 ^b ±10	600 ^a ±1	730 ^b ±10	665 ^c ±20	487 ^a ±3	526 ^b ±7	554 ^c ±6	720 ^a ±7	714 ^a ±6	
TCT	2512 ^a ±1	2636 ^{ab} ±125	2227 ^{ac} ±169	2776 ^a ±94	2776 ^a ±94	2761 ^a ±96	3206 ^a ±84	3079 ^a ±51	2739 ^b ±45	1349 ^a ±42	1400 ^a ±20	1386 ^a ±21	2894 ^a ±23	2634 ^b ±55	
Chromatic parameters	13.14 ^a ±0.09	13.56 ^b ±0.37	11.66 ^b ±0.13	11.87 ^a ±0.10	11.87 ^a ±0.10	13.04 ^b ±0.18	8.38 ^a ±0.04	9.27 ^b ±0.15	9.22 ^c ±0.22	7.17 ^a ±0.19	7.37 ^a ±0.17	7.95 ^b ±0.15	9.56 ^b ±0.07	8.74 ^b ±0.10	
To	0.279 ^a ±0.004	0.288 ^b ±0.003	0.286 ^{ab} ±0.002	0.287 ^a ±0.004	0.287 ^a ±0.004	0.315 ^c ±0.004	0.257 ^b ±0.002	0.262 ^b ±0.002	0.288 ^c ±0.003	0.288 ^c ±0.001	0.291 ^{ab} ±0.003	0.275 ^c ±0.003	0.292 ^{ab} ±0.001	0.292 ^b ±0.001	
% Yellow	21.1 ^a ±0.23	21.61 ^b ±0.01	21.41 ^{ab} ±0.04	21.67 ^a ±0.20	21.67 ^a ±0.20	23.12 ^c ±0.02	19.87 ^a ±0.09	20.07 ^a ±0.09	21.70 ^b ±0.03	21.74 ^a ±0.04	21.84 ^a ±0.04	21.02 ^b ±0.04	21.94 ^a ±0.05	22.13 ^{ab} ±0.09	
% Red	75.79 ^a ±0.28	75.07 ^b ±0.04	74.90 ^b ±0.05	75.41 ^a ±0.32	75.41 ^a ±0.32	73.47 ^b ±0.01	77.27 ^a ±0.08	76.50 ^b ±0.14	75.47 ^c ±0.02	75.47 ^a ±0.01	74.94 ^b ±0.06	76.37 ^c ±0.05	75.03 ^a ±0.07	74.84 ^a ±0.12	
% Blue	3.10 ^a ±0.05	3.32 ^b ±0.03	3.69 ^c ±0.04	2.93 ^b ±0.11	2.93 ^b ±0.11	3.41 ^b ±0.03	2.86 ^b ±0.01	3.43 ^b ±0.05	3.22 ^b ±0.05	2.79 ^a ±0.02	3.22 ^b ±0.07	2.61 ^a ±0.08	3.03 ^a ±0.02	3.03 ^a ±0.02	

TPC, total phenolic compounds (mg kg⁻¹ gallic acid); TA, total anthocyanins (mg kg⁻¹ malvidine-3-glucoside); TCT, total condensed tannins (mg kg⁻¹ catechin); CI, colour intensity (absorbance units, a.u.); To, tonality. Values with the same letter between sampling dates, for each variety and parameter, were not significantly different according to LSD test ($\alpha = 0.05$).

extracts studied together with the results of the least significant difference test (LSD), which allows determining the influence of the sampling date for each variety.

As it can be seen the chromatic parameters (tonality, % yellow, % red and % blue) of grape extracts did not show a clearly defined trend along ripening among all varieties. Indeed, only the colour intensity (CI) shows a clear increasing tendency throughout ripening, which is especially significant during the first period, i.e. between the first and the second sampling dates. However, although they did not seem to be good phenolic ripening indicators, it is important to measure these parameters to check whether they are correlated with those of the corresponding wines.

For the phenolic parameters, we found a remarkable growth on the TPC and TA phenolic parameters between the first and the second sampling points, followed by a stabilisation or slightly decrease in the third sampling point. This behaviour agrees with the one observed in other studies (Canals *et al.*, 2005) which related the anthocyanins falls with the beginning of the post-maturity process (Pérez-Magariño & González-San José, 2006). The reason for the slight drop of anthocyanins content at the harvest moment could be due to the combination of the anthocyanin with tannins (Jackson, 2008).

Moreover, the values of TPC and TA matched with those expected, except for the Cabernet sauvignon variety that showed an uncommon behaviour. Although Cabernet sauvignon is considered a high coloured variety due to its high skin-to-flesh ratio, it presented a low and changeless value of TA. This is because the vineyard area where this variety grows accumulates a lot of wet, making difficult a proper ripening process in terms of pigments accumulation. However, even with this unusual oenological finding, these samples are suitable to build the correlation models because they increase the natural variability of the samples.

Regarding TCT, the analyses of whole berries, including powdered seeds, did not show a clear trend because, whereas the tannin concentration increases in the skins over ripening, this concentration decreases in the seeds during this process (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1999). Therefore, when considering the whole, these concentrations were balanced along ripening and remained almost constant.

Another issue that should be noted is that, as shown in Table 2, the phenolic parameters showed a wide range of values with a high variability between cultivars. This wide range is because of the suitable sampling performed in the present study where different ripening stages were considered. Therefore, unlike other studies where only ripe grapes were considered (Jensen *et al.*, 2008), this high variability ensures the achievement of robust correlation models.

Finally, once the phenolic and also the pulp ripening parameters were determined and evaluated, a correlation study between both kinds of parameters was performed. As shown in Table 3 and according to previous studies (Mattivi *et al.*, 2002; González-Neves *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2008) no correlation between both ripenings was found. Indeed, only a slight correlation between sugars (expressed as °Brix) and anthocyanins content could be detected. This behaviour may be due to the fact that the gradual accumulation of sugars often favours the synthesis of secondary metabolites, such as anthocyanins (Jackson, 2008). Whatever, the lack of correlation between both kinds of ripeness makes essential the determination of both parameters to guarantee a good quality of the red wines and, mainly, the aged ones.

Wine composition

Table 4 summarises the values of the chromatic and phenolic parameters found for the wines obtained from the grapes harvested at different ripening stages and it also shows the statistically significant differences among wines. As it can be seen, wines from Syrah, Merlot and Tempranillo showed the highest CI, TPC and TA content, while the highest TCT values were provided by Tempranillo, Cariñena and Cabernet sauvignon wines but, in all cases, the values were within the usual range when a traditional protocol of red winemaking is followed. However, although the wines parameters evolution presented a similar behaviour to the evolution of parameters corresponding to the grapes, the concentration magnitudes were different. These differences are due to the fact that, whereas during wine-making the extraction of phenolics is not complete, when dealing with the extraction procedure developed to determine the grape parameters, the extraction was forced to be faster and much more effective. Moreover, during winemaking seeds are not crushed, unlike what occurs in the accelerated process of grapes extraction. This fact implies a higher concentration of tannins (measured as

Table 3 Correlation coefficients between the pulp ripening parameters and the phenolic ripening parameters measured on grapes

Pulp ripening	Phenolic ripening		
	TPC	TA	TCT
°Brix	0.400	0.522*	-0.034
Tritable Acidity	-0.263	-0.090	-0.048
pH	0.234	0.269	-0.157

Tritable acidity (g L^{-1} tartaric acid); TPC, total phenolic compounds ($\text{mg gallic acid kg}^{-1}$); TA, total anthocyanins ($\text{mg malvidine-3-glucoside kg}^{-1}$); TCT, total condensed tannins ($\text{mg catechin kg}^{-1}$).

*P < 0.05

Table 4 Mean values (n = 3) corresponding to the parameters of wines at the three chosen sampling dates

Syrah	Merlot			Tempranillo			Cariñena			Cabernet sauvignon								
	10 Aug	24 Aug	7 Sep	11 Aug	1 Sep	14 Sep	12 Aug	26 Aug	9 Sep	27 Aug	3 Sep	10 Sep	28 Aug	11 Sep	21 Sep			
Phenolic parameters	TPC	781 ^a ±53	781 ^a ±53	963 ^b ±14	979 ^b ±12	915 ^a ±14	1039 ^b ±19	1064 ^b ±8	717 ^a ±29	923 ^b ±43	897 ^b ±22	509 ^a ±25	485 ^a ±19	524 ^a ±15	733 ^a ±9	769 ^b ±17		
	TA	375 ^a ±23	375 ^a ±23	450 ^b ±13	410 ^c ±3	387 ^a ±9	446 ^b ±11	467 ^c ±7	200 ^a ±11	208 ^b ±11	300 ^b ±7	169 ^a ±7	143 ^b ±8	170 ^a ±10	281 ^a ±3	300 ^b ±12	305 ^b ±2	
	TCT	433 ^a ±6	433 ^a ±6	349 ^b ±38	439 ^a ±29	473 ^a ±39	279 ^b ±39	395 ^a ±67	764 ^a ±20	764 ^a ±20	553 ^b ±58	672 ^a ±63	461 ^a ±50	567 ^b ±19	620 ^b ±27	604 ^a ±19	632 ^a ±16	614 ^a ±31
Chromatic parameters	CI	13.90 ^{ab} ±1.12	13.90 ^{ab} ±1.12	15.14 ^a ±0.65	13.55 ^b ±0.43	13.53 ^b ±0.29	15.65 ^b ±0.59	15.65 ^b ±0.59	6.66 ^a ±0.35	9.34 ^b ±0.41	9.37 ^b ±0.32	5.71 ^a ±0.27	4.83 ^b ±0.24	5.75 ^a ±0.32	5.75 ^a ±0.32	9.08 ^a ±0.10	8.85 ^a ±0.24	9.44 ^b ±0.02
	To	0.373 ^a ±0.0004	0.373 ^a ±0.0004	0.435 ^b ±0.005	0.473 ^b ±0.003	0.408 ^b ±0.007	0.459 ^b ±0.006	0.480 ^b ±0.003	0.461 ^a ±0.001	0.461 ^a ±0.001	0.489 ^b ±0.003	0.507 ^c ±0.013	0.453 ^a ±0.001	0.487 ^b ±0.009	0.469 ^b ±0.008	0.463 ^a ±0.004	0.490 ^b ±0.005	0.478 ^c ±0.001
	% Yellow	25.20 ^a ±0.07	25.20 ^a ±0.07	27.56 ^b ±0.21	28.86 ^c ±0.08	26.72 ^a ±0.30	28.64 ^b ±0.24	29.44 ^c ±0.08	29.44 ^c ±0.08	29.16 ^a ±0.06	29.90 ^b ±0.12	30.45 ^c ±0.09	28.97 ^a ±0.06	30.43 ^b ±0.39	29.63 ^c ±0.34	29.11 ^a ±0.15	30.12 ^b ±0.21	29.63 ^c ±0.06
	% Red	67.62 ^a ±0.12	67.62 ^a ±0.12	63.32 ^b ±0.23	60.98 ^c ±0.17	65.55 ^b ±0.36	62.43 ^b ±0.29	61.40 ^c ±0.17	63.23 ^a ±0.08	61.15 ^b ±0.13	60.09 ^c ±0.62	64.02 ^a ±0.34	62.54 ^b ±0.34	63.24 ^c ±0.34	62.85 ^b ±0.18	61.44 ^b ±0.24	62.01 ^c ±0.07	
	% Blue	7.18 ^a ±0.19	7.18 ^a ±0.19	9.11 ^b ±0.02	10.16 ^b ±0.12	7.74 ^a ±0.07	8.93 ^b ±0.05	9.16 ^b ±0.09	7.61 ^a ±0.10	8.95 ^b ±0.10	9.46 ^c ±0.17	7.01 ^a ±0.02	7.03 ^a ±0.08	7.13 ^a ±0.08	8.04 ^b ±0.03	8.43 ^b ±0.08	8.37 ^b ±0.02	

TPC, total phenolic compounds (mg L^{-1} gallic acid); TA, total anthocyanins (mg L^{-1} malvidine-3-glucoside); TCT, total condensed tannins (mg L^{-1} catechin); CI, colour intensity (absorbance units, a.u.); To, tonality. Values with the same letter between sampling dates, for each variety and parameter, were not significantly different according to LSD test ($\alpha = 0.05$).

TCT) in grape extracts than in the wines obtained from their conventional vinification.

Figure 1 shows the ratio between the phenolic content measured in wines and grape extracts of the five varieties over the sampling time. Since this ratio provides the

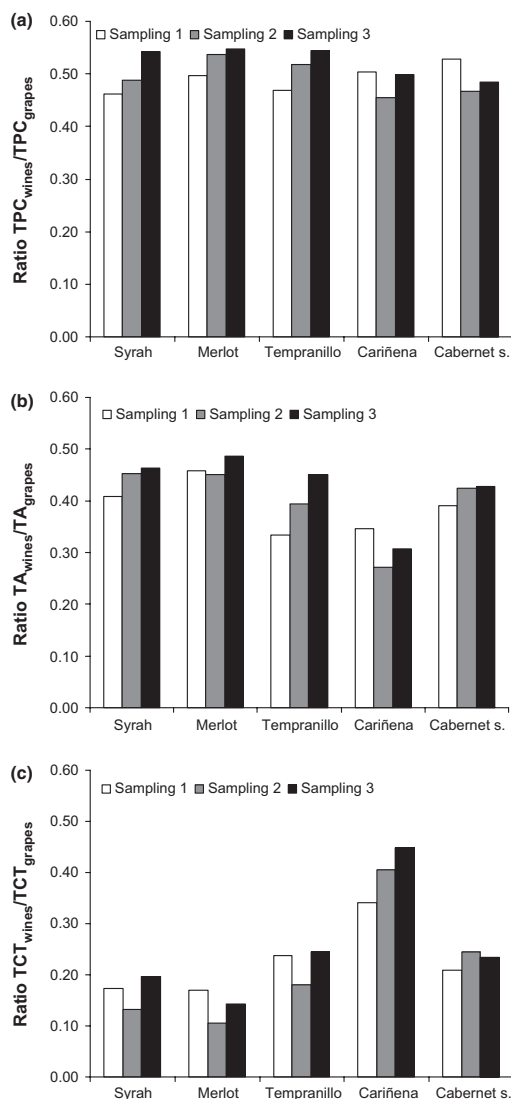


Figure 1 Evolution of the total phenolic compounds, TPC (a), total anthocyanins, TA (b) and total condensed tannins, TCT (c) transfer ratio from grapes to wines, for the five grape varieties over the ripening process.

phenolics transfer rate from grape to wine along ripening, it can be observed a general trend showing that the amounts of the three phenolic compounds in wines increased along grape ripening. This behaviour is due not only to the accumulation of phenolic compounds during ripening, but also to their solubility increase. This increase can be attributed both to the weakening of the cell wall structure that favours their diffusion into the wine (Saint-Cricq *et al.*, 1998; Ribéreau-Gayon *et al.*, 1999) and also to the sugar accumulation which leads to an ethanol content increase after maceration/fermentation that provides a higher extraction of phenolics from seeds and skins (Canals *et al.*, 2005).

However some exceptions to this general trend are observed. Thus, the first TPC value obtained for Cariñena and Cabernet Sauvignon and also the first TA value obtained for Cariñena showed a negative trend. This indicates that, in these cases, the unripeness of these grapes made less efficient the fast extraction method. Related to the TCT values, it should be pointed out that the negative trend that presented three of the varieties studied in their first point was due to the higher standard deviation of the measurements (Tables 2 and 4).

Correlation between grape and wine composition

To determine whether the phenolic and chromatic parameters of grapes were able to predict the ones corresponding to wines, a regression line for each parameter was built by plotting the grape response against the wine response. Taking into account the wide range of values considered when building these lines (five different grape varieties at three ripening stages), the findings coming from this study should be considered highly significant. The suitability of the correlations established was evaluated not only by the correlation coefficients but by the on line linearity values (LOL).

As the correlation coefficients revealed (Table 5), there was a high significant correlation between CI of grape extracts and TPC and TA of wines, and vice versa, and also when considering TPC and TA parameters from wine and grape extracts. The high correlation coefficients between CI and TA in grapes and wines were due to the fact that anthocyanins are the main responsible of the red wines colour (CI). On the other hand, since anthocyanins also absorb at 280 nm, it is obvious TPC contents includes anthocyanins, so a good correlation between both parameters was expected in advance.

In contrast, a lack of correspondence between contents of TCT on grape extracts and on wines ($R = 0.092$) was observed. This bad correlation was attributed to the different amount and type of compounds extracted from grapes by the accelerated

Table 5 Correlation coefficients between phenolic and chromatic parameters of grape extracts and wines

Grape	Wine							
	TPC	TA	TCT	CI	To	% Yellow	% Red	% Blue
TPC	0.964***	0.917***	-0.462	0.885***	-0.167	-0.342	-0.122	0.730**
TA	0.869***	0.976***	-0.729**	0.986***	-0.395	-0.548*	0.110	0.585*
TCT	0.670**	0.521*	0.092	0.476	-0.040	-0.153	-0.134	0.481
CI	0.813***	0.942***	-0.761***	0.977***	-0.510*	-0.650**	0.239	0.485
To	0.315	0.480	-0.526*	0.447	0.123	0.075	-0.198	0.271
% Yellow	0.262	0.434	-0.486	0.401	0.117	0.079	-0.175	0.221
% Red	-0.444	-0.590*	0.630*	-0.557*	-0.124	-0.047	0.247	-0.406
% Blue	0.662**	0.645**	-0.631*	0.636*	-0.066	-0.070	-0.289	0.656**

TPC, total phenolic compounds (mg gallic acid); TA, total anthocyanins (mg malvidine-3-glucoside); TCT, total condensed tannins (mg catechin) expressed per kg of grapes and per litre of wine; CI, colour intensity (absorbance units, a.u.); To, tonality.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

Table 6 Regression parameters of the models built for the calculation of the wine characteristics by the grape extract analysis (n = 15)

Extract (x) versus wine (y)	Slope \pm C.I.	Intercept \pm C.I.	LOL (%)	R ²	RMSE (%)
TPC	0.55 \pm 0.09	-79.14 \pm 149.03	92.35	0.929	5.99
TA	0.62 \pm 0.08	-152.87 \pm 63.31	93.85	0.953	7.23
TCT	0.02 \pm 0.13	473.72 \pm 331.77	-198.92	0.009	24.38
CI*	1.64 \pm 0.21	-6.30 \pm 2.24	93.94	0.954	7.58

TPC: Total phenolic compounds (mg gallic acid); TA: Total anthocyanins (mg malvidine-3-glucoside); TCT: Total condensed tannins (mg catechin) expressed per kilogram on grapes and per litre on wines; CI*: Colour intensity (absorbance units; a.u.). C.I.: confidence intervals. RMSE: The root mean square error, which represents the prediction error of the wines parameters by the grape analysis.

extraction method (where seeds and skins were crushed) than those extracted during winemaking (where the seeds and skins kept intact because wines are obtained by free-run, without pressing). Then, this different composition and polymerisation degree of condensed tannins in grapes and wines would provide different interactions with methyl cellulose what would affect the analytical measurement. To corroborate this different behaviour, we evaluated the precision of the precipitation method (replicates = 10) and whereas the coefficient of variation (CV%) in grape extracts was around 3%, when working with wines this value was greater than 20%. Thus, this high uncertainty of the TCT results in wines would be the responsible for the lack of correlation between grapes and wines.

Therefore, among the phenolic parameters evaluated, TCT was the only one not reliable enough to be used as a predictor of wine quality when using the extraction and analytical methods chosen in this work.

Another interesting finding is related to the mismatch between the values of the chromatic parameters found for grape extracts and those corresponding to wines. This divergence was due to the different pH for both solutions (the pH of grape extracts was below 2.0 and pH of wines was around 3.4) which affects the pigments

equilibrium and determines their colour (Kontoudakis *et al.*, 2010). Thus, although chromatic parameters are widely used when determining colour characteristics of wines using different red grape varieties (González-Neves *et al.*, 2004), different oenological treatments on the winemaking process (Gordillo *et al.*, 2010) and also when studying colour development by natural (Pérez-Magariño & González-San José, 2006) or accelerated aging (Cano-Lopez *et al.*, 2006), the chromatic parameters are not suitable to establish direct correlations between grape extracts and wines.

Since only the phenolic parameters were suitable to predict the wine properties from grape extracts, then, we evaluated the regression parameters of their correlation lines. Table 6 shows these values together with the regression coefficients (R^2), the on line linearity values (LOL) and the predictive error. Moreover, Fig. 2 shows graphically the correlations between the values of CI, TPC, TA and TCT obtained for the grape extracts and their corresponding wines. As it can be seen, good results were obtained except for TCT mainly due to the great structural diversity of wine tannins in contrast to grape tannins.

Regarding the slopes of the different lines obtained, these provided very interesting information. Thus, the values of TPC (0.55) and TA (0.62) suggested that

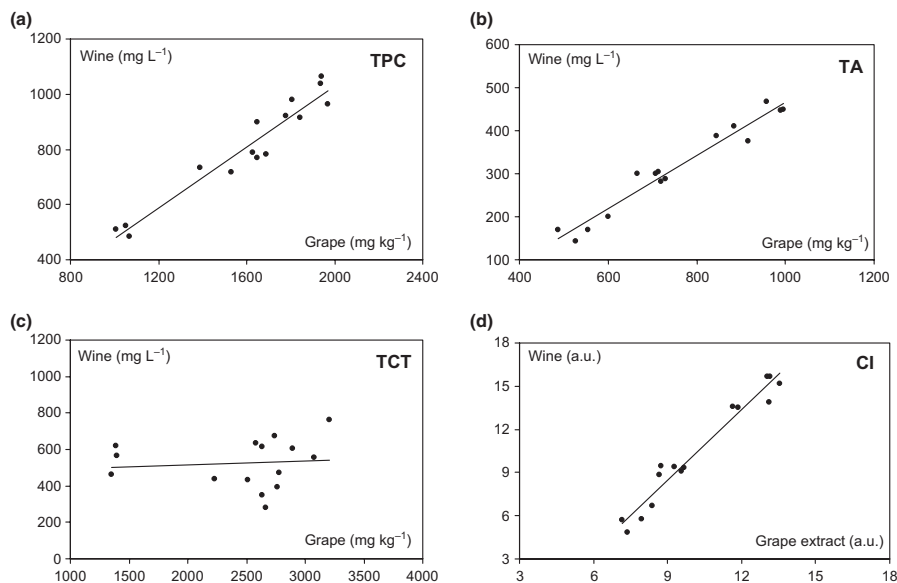


Figure 2 Regression plots between total phenolic compounds, TPC (a); total anthocyanins, TA (b); total condensed tannins, TCT (c) and colour intensity, CI (d) of the grape extracts and wines obtained from 5 grape varieties harvested at three different ripening stages along 2009 vintage.

during winemaking process the grape extraction yield was about 55% when considering TPC and about 62% when measuring TA. On the other hand, the slope value corresponding to CI (1.64) suggested that the amount of colour of the obtained wines was 1.64 times greater that the amount of colour measured in grape extracts.

However, the most remarkable results are the good linearity of the regression lines calculated for CI, TPC and TA in the range of concentrations studied (LOL > 90% and $R^2 > 0.92$) and the very satisfactory predictive errors obtained when using these regression lines or models. To evaluate the predictive ability of these models, which was an unsolved matter in this type of studies, we calculated the root mean square error (RMSE %) and we obtained error values of 5.99% for TPC, 7.23% for TA and 7.58% for CI when the wine results were predicted from the values obtained through grapes analysis. From these good results we can conclude that the extraction method used in this study provides suitable grape extracts to predict their wine phenolic parameters (except TCT).

Conclusions

The extraction method of red grapes used is fast and simple what implies an advantage over other methodologies described that are more time-consuming.

With the method proposed it is possible to obtain very good correlations ($R^2 > 0.9$) between phenolic parameters of the grape extracts and those of their corresponding wines. Thus, the colour intensity (CI), the total phenolic compounds (TPC) and total anthocyanins (TA) could be suitable predictors of some quality attributes of wine quality with predictive errors < 8%.

Moreover, the goodness of the models obtained by direct relationships between grape and wine phenolics would provide an interesting analytical tool to the enologists when trying to predict wine features from grape analysis along the ripening period.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Spanish Ministry of Science and Technology (projects AGL2007-61550 and AGL2010-19688) for the financial support given.

References

- Blouin, J. (1992). *Techniques d'analyses des moûts et des vins*. Paris: Dujardin-Salleron.
- Boque, R. & Rius, F. X. (1994). Straight line calibration: Something more than slopes, intercepts, and correlation coefficients. *Journal of Chemical Education*, 71, 230–232.

- Cagnasso, E., Rolle, L., Caudana, A. & Gerbi, V. (2008). Relationship between grape phenolic maturity and red wine phenolic composition. *Italian Journal of Food Science*, **20**, 365–380.
- Canals, R., Llaudy, M. C., Valls, J., Canals, J. M. & Zamora, F. (2005). Influence of Ethanol Concentration on the Extraction of Color and Phenolic Compounds from the Skin and Seeds of Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4019–4025.
- Cano-Lopez, M., Pardo-Minguez, F., Lopez-Roca, J. & Gomez-Plaza, E. (2006). Effect of microoxygenation on anthocyanin and derived pigment content and chromatic characteristics of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **57**, 325–331.
- Cayla, L., Cottereau, P. & Renard, R. (2002). Estimation de la maturité phénolique des raisins rouges par la méthode I.T.V. standard. *Revue Française d'Oenologie*, **193**, 10–16.
- Chorti, E., Guidoni, S., Ferrandino, A. & Novello, V. (2010). Effect of different cluster sunlight exposure levels on ripening and anthocyanin accumulation in Nebbiolo grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **61**, 23–30.
- Cuadros Rodriguez, L., García Campaña, A. M. & Bosque Sendra, J. M. (1996). Statistical estimation of linear calibration range. *Analytical Letters*, **29**, 1231–1239.
- Di Stefano, R. & Cravero, M.C. (1991). Metodi per lo studio dei polifenoli dell'uva. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, **2**, 37–44.
- Downey, M., Harvey, J. & Robinson, S. (2003). Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **9**, 15–27.
- Fragoso, S., Aceña, L., Guasch, J., Busto, O. & Mestres, M. (2011). Application of FT-MIR spectroscopy for fast control of red grape phenolic ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **59**, 2175–2183.
- Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 2e Partie: mesure, origine et interpretation. *Connaissance de la Vigne et du Vin*, **4**, 253–271.
- Gonzalez-Neves, G., Gil, G. & Ferrer, M. (2002). Effect of different vineyard treatments on the phenolic contents in Tannat (*Vitis vinifera* L.) grapes and their respective wines. *Food Science and Technology International*, **8**, 315–321.
- Gonzalez-Neves, G., Gil, G., Ferrer, M., Charamelo, D., Balado, J. & Boichichio, R. (2010). Prediction of the colour and polyphenolic composition of the young red wines from the phenolic potential of the grapes. *International Journal of Food Science and Technology*, **45**, 1843–1851.
- González-Neves, G., Charamelo, D., Balado, J. et al. (2004). Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Analytica Chimica Acta*, **513**, 191–196.
- Gordillo, B., Lopez-Infante, M., Ramirez-Perez, P., Gonzalez-Miret, M. & Heredia, F. (2010). Influence of prefermentative cold maceration on the color and anthocyanic copigmentation of organic Tempranillo wines elaborated in a warm climate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**, 6797–6803.
- Iland, P. (2004). *Chemical Analysis of Grapes and Wine: Techniques and Concepts*. Campbelltown: Patrick Iland Wine Promotions.
- Jackson, R. S. (2008). *Wine Science*. San Diego: Academic Press.
- Jensen, J. S., Blachez, B., Egebo, M. & Meyer, A. S. (2007). Rapid extraction of polyphenols from red grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **58**, 451–461.
- Jensen, J. S., Demiray, S., Egebo, M. & Meyer, A. S. (2008). Prediction of wine color attributes from the phenolic profiles of red grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 1105–1115.
- Kallithraka, S., Arvanitoyannis, I.S., Kefalas, P., El-Zajouli, A., Soufleros, E. & Psarra, E. (2001). Instrumental and sensory evaluation of Greek red and white wines; Implementation of Principal Component Analysis for classification according to geographic origin. *Food Chemistry*, **73**, 501–514.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. & Zamora, F. (2010). Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes: Correlation between predicted and obtained parameters. *Analytica Chimica Acta*, **660**, 127–133.
- Lamadon, F. (1995). Protocole pour l'évaluation de la richesse polyphénolique des raisins. *Revue des Oenologues*, **76**, 37–38.
- Mattivi, F., Prast, A., Nicolini, G. & Valenti, L. (2002). Validazione di un nuovo metodo per la misura del potenziale polifenolico delle uve rosse e discussione del suo campo di applicazione in enologia. *Rivista di Viticoltura e di Enologia*, **55**, 55–74.
- Mercurio, M., Damberg, R., Herderich, M. & Smith, P. (2007). High throughput analysis of red wine and grape Phenolics - Adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified Somers color assay to a rapid 96 well plate format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, 4651–4657.
- Muñoz, S., Mestres, M., Busto, O. & Guasch, J. (2008). Determination of some flavan-3-ols and anthocyanins in red grape seed and skin extracts by HPLC-DAD: Validation study and response comparison of different standards. *Analytica Chimica Acta*, **628**, 104–110.
- Pérez-Magariño, S. & González-San José, M. L. (2006). Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, **96**, 197–208.
- Ribèreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A. & Dubourdieu, D. (1999). *Handbook of Enology, Vol 2. The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*. Chichester: John Wiley & Sons.
- Roggero, J., Coen, S. & Ragonne, B. (1986). High-performance liquid-chromatography survey on changes in pigment content in ripening grapes of Syrah. An approach to anthocyanin metabolism. *American Journal of Enology and Viticulture*, **37**, 77–83.
- Romero-Cascales, I., Ortega-Regules, A., Lopez-Roca, J. M., Fernandez-Fernandez, J. I. & Gomez-Plaza, E. (2005). Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *American Journal of Enology and Viticulture*, **56**, 212–219.
- Ryan, J. & 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.
- Saint-Cricq, N., Vivas, N. & Glories, Y. (1998). Maturité phénolique: définition et contrôle. *Revue Française d'Oenologie*, **173**, 22–25.
- Spagna, G., Barbagallo, R. N., Todaro, A., Durante, M. J. & Pifferi, P. G. (2003). A method for anthocyanins extraction from fresh grape skin. *Italian Journal of Food Science*, **15**, 337–346.
- Tzourou, N.E. & Arvanitoyannis, I.S. (2001). Agricultural produces: Synopsis of employed Quality Control methods for the authentication of foods and for the classification of foods according to their variety of geographical origin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **41**, 287–319.
- Venencie, C., Uveira, M.N. & Guiet, S. (1997). Maturité polyphénolique du raisin mise en place d'une méthode d'analyse de routine. *Revue Française d'Oenologie*, **167**, 36–41.

ANEXO 4

**APPLICATION OF FT-MIR SPECTROSCOPY FOR FAST CONTROL OF RED
GRAPE PHENOLIC RIPENING**

Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59 (2011) 2175-2183

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

Application of FT-MIR Spectroscopy for Fast Control of Red Grape Phenolic Ripening

Sandra Frago, Laura Aceña, Josep Guasch, Olga Busto, and Montserrat Mestres*

Group of Analytical Chemistry of Wine and Food, Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry, Campus Sescelades, Faculty of Oenology of Tarragona, Rovira i Virgili University, 43007 Tarragona, Spain

ABSTRACT: The content of phenolic compounds determines the state of phenolic ripening of red grapes and is a key criterion in setting the harvest date to produce quality red wines. In this study, the feasibility of Fourier transform mid-infrared (FT-MIR) spectroscopy combined with partial least-squares (PLS) regression to quantify phenolic compounds is reported. The reference methods used for quantifying these compounds (which were evaluated as total phenolic compounds, total anthocyanins, and condensed tannins) were the usual ones used in cellars that employed UV-vis spectroscopy. To take into account the high natural variability of grapes when building the calibration models, fresh grapes from six varieties, at different phenolic ripening states were harvested during three vintages. Destemmed and crushed grapes were subjected to an accelerated extraction process and used as calibration standards. A total of 192 extracts (objects) were obtained, and these were divided into a training set (106 objects) and a test set (86 objects) to evaluate the predictive ability of the models. Among the different MIR regions of the extract raw spectra, those that provided the highest variability on the absorption were selected. The results showed that the best PLS regression model was the one obtained when working in the region of $1168\text{--}1457\text{ cm}^{-1}$ because it gave the most accurate and robust prediction for total phenolic compounds (RMSEP % = 4.3 and RPD = 4.5), total anthocyanins (RMSEP % = 5.9 and RPD = 3.5), and condensed tannins (RMSEP % = 5.8 and RPD = 3.8). Therefore, it can be concluded that FT-MIR spectroscopy can be a fast and reliable technique for monitoring the phenolic ripening in red grapes during the harvest period.

KEYWORDS: FT-MIR spectroscopy, phenolic compounds, PLS regression, phenolic ripening

INTRODUCTION

The study of phenolic compounds has taken on a special significance in recent years due to their contribution to the organoleptic properties of red wine. The two most important classes of phenolic compounds found in grapes are anthocyanins and tannins.¹ Anthocyanins, located in grape skins, are responsible for the color of red grapes.² Tannins, located in grape seeds and skins, are mainly responsible for mouthfeel properties such as astringency and body of wine.³ Moreover, tannins are important because they affect the development of color during wine aging. The concentration of the phenolic compounds increases during grape ripening, although it is affected by many factors including grape variety,⁴ climatic and soil conditions ("terroir"),^{5,6} and viticulture techniques and enological treatments.^{7,8} Therefore, the determination of this concentration, which has a direct relationship with the phenolic ripening state, is a key criterion in setting the harvest date to produce quality red wines.

The usual analytical methods used to quantify the phenolic parameters in grapes are based on spectrophotometric measurements at 520 nm for total anthocyanins⁹ and at 280 nm for total phenolic compounds² and condensed tannins.¹⁰ These methods are generally used in cellars because they are sufficiently simple and precise. However, during grape ripening controls, a large number of samples have to be analyzed daily and, then, these methods become tedious and time-consuming.

The use of spectrometric techniques, such as Fourier transform mid-infrared (FT-MIR) spectroscopy, has recently emerged as a powerful analytical tool that allows the fast and simultaneous analysis of several parameters in a large number of samples. Due to the great amount of information about the sample composition that each FT-MIR spectrum provides, it is necessary to use of chemometrics tools

to make the most of its potential both for qualitative analysis and for quantitative analysis. Partial least-squares (PLS) regression is a multivariate calibration method that is particularly useful when we need to predict a set of dependent variables from a large set of independent variables (i.e., predictors).¹¹

FT-MIR equipments have already been demonstrated to be suitable for routine qualitative analysis and process control in wineries by analyzing raw materials,¹² monitoring the fermentation^{13,14} or determining some of the main compounds in wine such as ethanol, organic acids, or sugars.¹⁵⁻¹⁷ In regard to the analysis of phenolic compounds, there are also some applications of FT-MIR spectroscopy related to the quantification of these compounds in white¹⁸ and red wines.¹⁹⁻²⁴ However, studies to determine the concentration of phenolic compounds in red grape homogenates have been developed using near-infrared spectroscopy (NIR).^{25,26} Moreover, in this study frozen samples were used for developing the calibration models, and this sample conservation treatment affects the accuracy of the predictive results as we demonstrated in previous studies,²⁷ mainly due to the effect of the rupture of the cell membrane of the skins by the ice crystals, which could affect the precision of the extraction step.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the potential of FT-MIR, combined with PLS multivariate calibration, for quantifying phenolic compounds in red grape. With this objective, the phenolic contents (evaluated as total phenolic compounds, total

Received: October 15, 2010

Accepted: January 25, 2011

Revised: January 25, 2011

Published: February 18, 2011

anthocyanins, and condensed tannins) of different fresh red grapes at different degrees of maturity were spectrophotometrically determined according to the methods usually employed in cellars, and the results obtained were correlated with FT-MIR response. Then, the models obtained were used to predict the concentration of new samples. From these predictions we evaluated the reliability of this technique for providing the value of some phenolic parameters commonly used in cellars, which would allow this technique to be used to monitor phenolic ripening in red grapes.

MATERIALS AND METHODS

Sample Preparation. Fresh grape berries of six red varieties (Merlot, Tempranillo, Syrah, Garnacha, Cariñena, and Cabernet sauvignon), at different states of phenolic ripening (from veraison until harvest) and from three different vintages (2007, 2008, and 2009) were obtained from the experimental vineyard of the Faculty of Oenology of Tarragona (Rovira i Virgili University, Spain). To ensure a representative sampling, 200 berries from central rows and alternative vines, combining sunlight and shadow and different parts of the cluster (upper, middle, and bottom) were chosen.

Grapes were destemmed and ground at room temperature using an Ultra-Turrax high-speed homogenizer at 24000 rpm for 2 min to get a smooth paste. The phenolic compounds of each sample were extracted by using the method previously optimized in our laboratory²⁷ that provides a recovery of total phenolic compounds of >95%. Therefore, 50 g of paste was macerated during 15 min at 40 °C in a hydroalcoholic acid solution (85 mL of HCl 1% v/v + 15 mL of ethanol 96%) under constant agitation. Then the sample was centrifuged for 10 min at 8000 rpm, and the precipitate was resuspended in 50 mL of extracting solution and re-centrifuged. Finally, the supernatants of both centrifugations were joined, and the volume was completed to 200 mL with the extracting solution.

Instrumentation. The grapes were ground using a high-speed homogenizer Ultra-Turrax T-18 (IKA, USA) equipped with a S18N-19G rotating shaft. Sample centrifugation was carried out by a Hettich Universal 32 R centrifuge (Tuttlingen, Germany). The reference analytical measurements were performed by using a Thermo Spectronic ultraviolet–visible spectrophotometer model Helios γ (Thermo Electron Corp., Cambridge, U.K.). All spectra of the extracts were collected using a FT-MIR Nexus (Thermo, USA), equipped with a deuterated triglycine sulfate detector (DTGS). The instrument was connected to a TDI Bacchus (Gavà, Spain) autosampler. The software package OMNIC version 6.2 from Thermo Nicolet was used for spectra acquisition. The software used for data analysis and calibration was the Unscrambler package (version 9.0, CAMO ASA, Norway).

Reagents and Standards. The standards of malvidin-3-glucoside (purity \geq 90%) and (+)-catechin (purity \geq 96%) were supplied by Fluka (Madrid, Spain). Gallic acid monohydrate (99.5%), tannic acid (99.9%), and ammonium sulfate (99.5%) were supplied by Scharlab (Barcelona, Spain). Methyl cellulose (M-0387) was supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). The rest of the chemicals used for the study were of analytical reagent grade and supplied by Scharlab.

Reference Analytical Measurements. The phenolic ripening of grapes was evaluated by three parameters: total phenolic compounds, total anthocyanins, and condensed tannins. The reference methods used for quantifying them were based on UV–vis spectroscopy.

Total Phenolic Compounds Content (TPC). This value was determined by measuring at 280 nm the absorbance of extract sample, in a 10 mm quartz cuvette, previously diluted 50 times in deionized water² and using a calibration line built with gallic acid monohydrate as standard at six different concentrations in the range of 2.2–18.0 mg L⁻¹. The total

phenolic compounds content was expressed in milligrams of gallic acid per kilogram of grape.

Total Anthocyanins Content (TA). This parameter was determined by measuring the absorbance at 520 nm of the extract, in a 10 mm plastic cuvette, previously diluted 25 times with 0.1 M HCl⁹ to get a pH close to 1.0 and using a calibration line built using malvidin-3-glucoside as standard at six different concentrations in the range of 2.4–20.0 mg L⁻¹. The total anthocyanin content was expressed in milligrams of malvidin-3-glucoside per kilogram of grape.

Condensed Tannins Content (CT). The quantification of these phenolic compounds was carried out by using the indirect method of precipitation with methyl cellulose¹⁰ and using a calibration line built with (+)-catechin as standard at six different concentrations in the range of 19.2–76.9 mg L⁻¹. This content was expressed in milligrams of (+)-catechin per kilogram of grape.

Mid-Infrared Scanning Spectra. The MIR spectra of the samples were collected using a FT-MIR Nexus (Thermo, USA), connected to a TDI Bacchus autosampler, which was equipped with an online and automatic system of sample filtration (stainless steel filter of food grade with a pore size of 50 μ m, Teflon coated). The FT-MIR spectrum acquisition takes only 30 s per sample.

All spectra were averaged from 32 scans and collected in absorbance mode, at 4 cm⁻¹ spectral resolution, on the 979–2989 cm⁻¹ wavenumber range (MIR vibrational zone). To eliminate the possible equipment drift over time, every 10 h, the equipment collected an environmental spectrum (considering water vapor together with CO₂) and redefined the background.

On the other hand, because water dominates the spectrum of aqueous samples, prior to the analysis of the grape extracts, a blank of distilled water was acquired automatically by the spectrometer to isolate the water absorption bands as done in other studies.²⁸

Enrichment Experiments. During grape ripening, changes in the concentration of chemical compounds different from the phenolic compounds, such as sugars or organic acids, take place. Therefore, it is difficult to determine which compound or compounds are responsible for the changes observed in the spectral response. To locate the spectral regions associated with phenolic compounds we compared a grape extract spectrum with the spectra from the same grape extract enriched with four phenolic compounds of different chemical structure. Thus, different concentration levels (ranging from 0.5 to 5 g L⁻¹) of gallic acid, (+)-catechin, and tannic acid, as well as 1 mg of malvidin-3-glucoside (commercial standard format), were added to different grape extracts. Because these compounds present different chemical compositions and polymerization grades, they were very helpful and appropriate for identifying the absorbance regions of FT-MIR spectra related to phenolic compounds present in grapes and, therefore, for selecting the suitable wavenumbers used on the calibration of phenolic compounds. Chemical structures of the four different phenolic compounds are shown in Figure 1.

Development and Validation of the FT-MIR Models. Chemometrics was used to perform both descriptive and quantitative analysis of the data. The descriptive analysis was done using the principal components analysis (PCA) method. PCA is used to describe the maximal quantity of information present in the data set using a small number of latent variables (i.e., not directly measured), and it is very useful to reveal possible grouping samples and to visualize the presence of outliers.²⁹

Quantitative analysis was done using PLS regression. PLS regression is a method used for relating a matrix of predictor variables, X (i.e., spectra), and a matrix of chemical properties, Y (i.e., concentration values), by a linear multivariate model.¹¹ For this, X is divided into a training set to build the model and a set to evaluate the prediction ability of the model. A critical step in the model building is the selection of the number of optimal factors (latent variables) to ensure the prediction

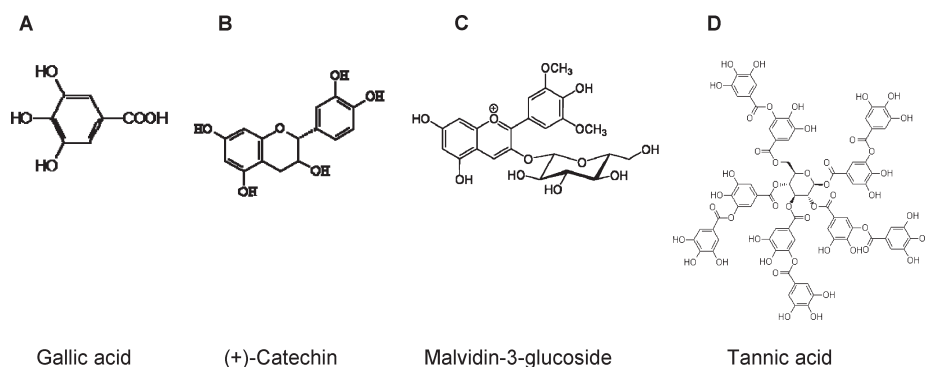


Figure 1. Chemical structures of the four different standards used to determine the FT-MIR spectra absorbance regions of the phenolic compounds: gallic acid (A), (+)-catechin (B), malvidin-3-glucoside (C), and tannic acid (D).

ability and to avoid overfitting. In this paper the number of optimal factors was obtained by means of leave-one-out cross-validation.²⁹ In that way, one object of the training set is removed and a PLS model is built with the remaining ones and, then, this model is used to predict the removed object. This procedure is repeated until all of the objects in the training set are selected for a number of given factors. The optimal number of factors in the PLS model was determined by the lowest root mean square error of cross-validation (RMSECV) (eq 1)

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N_{CV}}} \quad (1)$$

where N_{CV} is the number of cross-validation samples (i.e., $N_{CV} = N$, N being the number of samples in the training set), y_i is the reference measurement, and \hat{y}_i is the estimated result when the model is built without sample i .

Related to the calibration step, we evaluated the model fit to the data with the root mean square error of calibration (RMSEC) expressed as a percentage (RMSEC %) (eq 2) that can be defined as the mean error of model.

$$\text{RMSEC \%} = \frac{100}{\bar{y}} \left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \right) \quad (2)$$

N is the number of samples of training set, y_i is the reference value for sample i , and \hat{y}_i is the predicted value for sample i .

To test the predictive accuracy of the calibration models built, the minimal root mean square error of prediction (RMSEP) was determined in percent (eq 3)

$$\text{RMSEP \%} = \frac{100}{\bar{y}} \left(\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N}} \right) \quad (3)$$

where N is the number of samples of the test set, y_i is the reference value for sample i , and \hat{y}_i is the predicted value for sample i . The results of future predictions can then be expressed as "predicted value $\pm 2 \times \text{RMSEP}$ ".³⁰

Additionally, to standardize the predictive accuracy, for each model the residual predictive deviation (RPD) was calculated as the ratio

Table 1. Descriptive Statistics of Training and Test Sets^a

phenolic parameter	training set (samples = 106)				test set (samples = 86)			
	min	max	mean	SD	min	max	mean	SD
TPC	1005	2140	1626	363	1058	2035	1623	315
TA	348	1316	810	258	392	1225	791	184
CT	984	3351	2298	595	1320	2912	2258	487

^a TPC, total phenolic compounds in mg of gallic acid kg^{-1} ; TA, total anthocyanins in mg of malvidin-3-glucoside kg^{-1} ; CT, condensed tannins in mg of (+)-catechin kg^{-1} ; min, minimum value; max, maximum value; SD, standard deviation.

between the standard deviation (SD) of the validation samples and the RMSEP.³¹ If the RMSEP is large compared to the spread of that compound in all samples (SD), a relatively small RPD is obtained. This means that the model is not able to model suitably the variability. An RPD value ranging between 2.5 and 3.0 is considered to be poor, and the models could be applied only for very rough screening. However, generally, an RPD of >3 could be considered to be very satisfactory for prediction purposes.^{12,32}

Estimation of the True Prediction Error. Because the reference values used to construct the models are not known with negligible uncertainty but instead are obtained with a standard error, the validation of multivariate calibration models using these values leads to a so-called apparent prediction error, which systematically overestimates the true prediction error. To solve this problem we used the simple correction procedure proposed by Faber et al.³³ that yields a more realistic estimate of the true prediction error (eq 4)

$$\text{MSEP}_{\text{cor}} = \text{MSEP}_{\text{app}} - \hat{\sigma}^2 \quad (4)$$

where MSEP_{cor} is the bias-corrected MSEP, MSEP_{app} is the apparent MSEP (i.e., the value that we obtained with the test set), and $\hat{\sigma}^2$ is the variance of the measurement error in the reference values.

RESULTS AND DISCUSSION

Reference Values. All of the samples harvested at different phenolic ripening states to consider the high natural variability of phenolic amount in grapes were extracted by the methodology described. In this way, 192 extracts were obtained. These were distributed into a training or calibration set ($n = 106$ samples) and a test or validation set ($n = 86$ samples). The reference values of the contents of total phenolic compounds (TPC), total

anthocyanins (TA), and condensed tannins (CT) were determined by using the reference analytical measurements. The reliability of these methods was previously tested (eight analyses of the same grape extract sample), and we found that the relative

Table 2. Concentration of the Phenolic Compounds in Each Variety Studied (Samples from 2007, 2008, and 2009 Vintages)^a

grape variety	no. of samples	phenolic parameter	min	max	mean	SD
Merlot	38	TPC	1679	2140	1943	117
		TA	843	1296	1021	139
		CT	1771	2921	2435	270
Tempranillo	34	TPC	1625	1996	1812	92
		TA	651	1002	782	103
		CT	2291	3351	2879	247
Syrah	32	TPC	1648	2120	1848	121
		TA	826	1316	1024	142
		CT	1950	2828	2415	178
Cariñena	30	TPC	1005	1196	1092	47
		TA	485	759	639	70
		CT	984	1495	1358	95
Garnacha	24	TPC	1023	1295	1173	82
		TA	348	482	411	41
		CT	1448	2217	1825	260
Cabernet sauvignon	34	TPC	1328	1856	1659	150
		TA	686	883	784	58
		CT	937	2911	2453	479

^a TPC, total phenolic compounds in mg of gallic acid kg⁻¹; TA, total anthocyanins in mg of malvidin-3-glucoside kg⁻¹; CT, condensed tannins in mg of (+)-catechin kg⁻¹; min, minimum value; max, maximum value; SD, standard deviation.

standard deviation (%rsd) was 1.21 for TCP, 0.73 for TA, and 1.27 for CT.

Table 1 summarizes the contents of the parameters studied considering all of the samples harvested and analyzed weekly during the August–October period throughout three different vintages (2007, 2008, and 2009). As can be seen, both sets had similar contents of the compounds studied, and the highest standard deviation value was associated with the CT, which could be associated with the different size (polymerization degree) of condensed tannins in grapes from its “veraison” to full ripeness.

Table 2 summarizes the concentration of the phenolic compounds evaluated considering each variety separately. We can see, for example, that Cariñena, which is characterized by its low tannic content, presented the lowest CT value or that Merlot and Syrah, varieties that are known for their intense red color, presented the highest values of TA, whereas Garnacha, which has low color intensity, presented the lowest TA value. However, we also detected the uncommon behavior of the Cabernet sauvignon because, although this is considered a highly colored variety, it presented a low value of TA. This is because the field zone where this variety grows is very wet, and this high humidity makes difficult a proper ripening process.

Grape Extracts Spectra. Although the spectral peaks in the MIR frequencies are usually sharp and well resolved, there were two main problems when the phenolic compounds of the studied extracts were analyzed by FT-MIR spectroscopy. The first was that the phenolic compounds considered (anthocyanins, tannins) are chemically very similar and therefore displayed similar MIR absorption characteristics. The second problem was that the contents of water, organic acids, and sugars, which are the major components of the grapes, vary during ripening and all of them absorb in the same MIR region, masking the distinctive MIR vibrations of phenols.^{14,28,34–36} In Figure 2 are shown the FT-MIR spectra of 192 grape extracts and, as can be seen, the water and ethanol (from the extraction step)

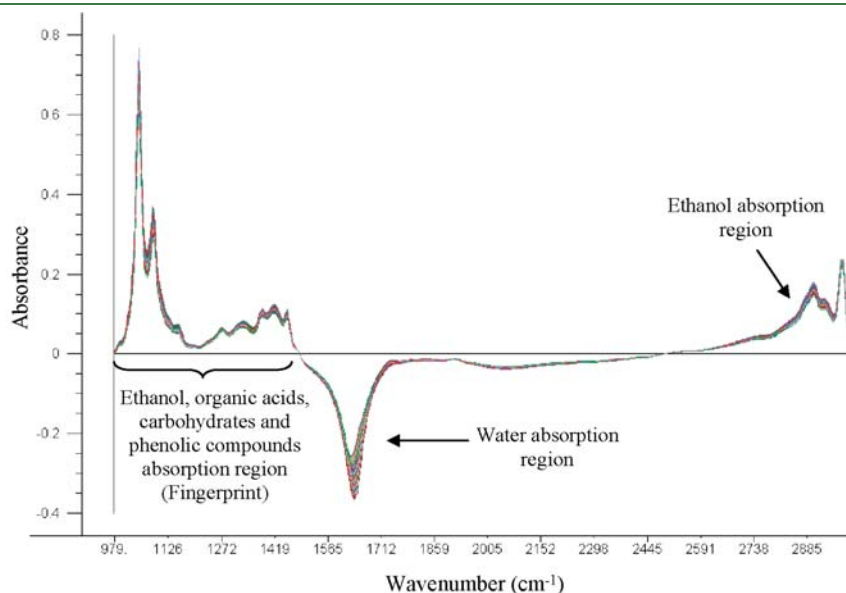


Figure 2. FT-MIR raw spectra of the 192 extracts (979–2989 cm⁻¹) with the three dominant absorption zones pointed out.

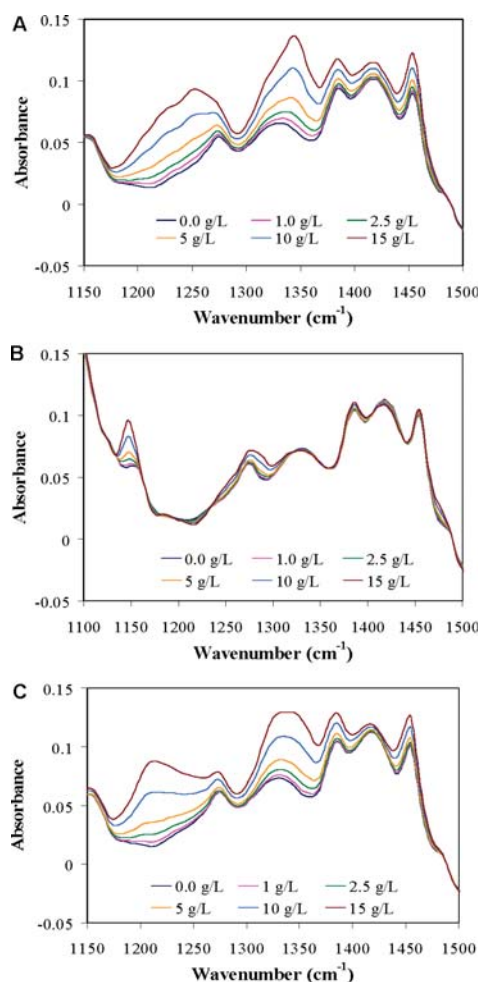


Figure 3. Spectral responses of different concentrations of gallic acid (A), (+)-catechin (B), and tannic acid (C) added to a grape extract sample.

absorption peaks dominate the spectrum. For ethanol, the most intense bands are located at 1045 and 1083 cm^{-1} due to the contribution of C–O stretch (oxygen belonging to a primary alcohol). Other less intense bands located around 2850–2960 cm^{-1} are due to C–H stretch.^{36,37} For water, a negative absorption band located in the 1500–1740 cm^{-1} region can be observed. This negative peak is due to the automatic subtraction of the blank that the equipment makes by using distilled water prior to the sample analysis.²⁸ Related to other compounds present in the samples, on the one hand can be seen an absorption band from 900 to 1100 cm^{-1} , which can be assigned to C–O valence vibrations and C–O–C stretching vibrations of the carbohydrates, including fructose and glucose.^{14,36,38} On the other hand, it is well-known that organic acids present an alcohol functional group and, therefore, C–O and the O–H bonds. These different bonds absorb around 1060–1150 cm^{-1} due to the C–O stretch (oxygen belonging to a secondary alcohol) and around 1320–1420 cm^{-1} due to the O–H bend.²⁸

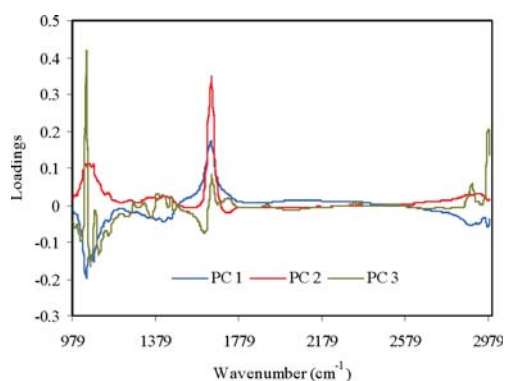


Figure 4. Loadings for the three first PCs on the full range (979–2989 cm^{-1}) corresponding to the 192 sample spectra.

Taking into account this great number of absorption bands, it was not easy to know which were the spectral regions where the phenolic compounds absorbed. Therefore, we investigated the spectral response of four different phenolic compounds by adding increasing amounts of these compounds in a real sample (grape extract). These compounds were gallic acid, (+)-catechin, malvidin-3-glucoside, and tannic acid.

These additions revealed particularly evident variations in the spectral region from 1168 to 1457 cm^{-1} for gallic and tannic acids and in the spectral regions from 1133 to 1160 cm^{-1} , from 1238 to 1322 cm^{-1} , and from 1373 to 1457 cm^{-1} for (+)-catechin (Figure 3). When malvidin-3-glucoside was added to determine the region where anthocyanins absorb, no variations in the spectra were detected due to the low concentration of the commercial standards of these compounds.

Therefore, from these enrichment experiment results, we may conclude that, for phenolic compounds calibration purposes, the best spectral region ranged between 1133 and 1457 cm^{-1} , whereas the remaining wavenumbers (from 979 to 1129 cm^{-1} , from 1457 to 1477 cm^{-1} , and from 2649 to 2989 cm^{-1}) present small and not distinguishing signals of grape phenolic compounds.

Principal Components Analysis. To carry out a study of the information contained in the data set, we applied a PCA considering the response obtained when working with the full range (979–2989 cm^{-1}). The results showed that three principal components (PCs) explained 97.90% of the spectral variation of the samples (first PC, 60.39%; second PC, 35.05%; third PC, 2.46%). Figure 4 shows the loadings plot, which determines the influence of each wavenumber on the variance along this region and, as expected, the three main zones with high influences in the variance of the spectra samples coincided with the three regions where the signal is higher: 979–1477, 1500–1740, and 2869–2989 cm^{-1} . Because the second region corresponds to the water signal and the third region is related to the ethanol contents, it can be concluded that the 979–1477 cm^{-1} region contains almost all of the information that characterizes the samples. Indeed, a PCA of this region showed that the first PC explained 93.77% of variance and that the three first PCs explained 99.41% of variance. Therefore, we considered this region as very useful for calibration purposes and called it the *fingerprint* region. However, taking into account the results of enrichment experiments and also considering that inside this wavenumber range could be observed several sharp absorption bands, it was reasonable

Table 3. Analytical Performance Parameters of the Multivariate Calibration Models Built by PLS Regression Using Different Spectral Regions of Grape Extracts^a

dependent variable	model	region (cm ⁻¹)	PLS factors	RMSEC	RMSEC (%)	R ² _{cal}	RMSEP	RMSEP (%)	R ² _{val}	RMSEP _{cor} (%)	RPD
TPC	full-range	979–2989	13	56.5	3.5	0.976	72.5	4.5	0.946	4.3	4.3
	fingerprint	979–1477	11	74.7	4.6	0.956	86.9	5.4	0.935	5.3	3.7
	main phenolic region	1133–1457	8	83.4	5.1	0.947	85.7	5.3	0.930	5.2	3.7
	selected region	1168–1457	9	67.3	4.1	0.965	70.6	4.3	0.951	4.1	4.5
TA	full-range	979–2989	15	28.0	3.4	0.988	38.9	4.9	0.959	4.8	4.8
	fingerprint	979–1477	10	47.3	5.8	0.966	51.4	6.5	0.930	6.5	3.6
	main phenolic region	1133–1457	9	48.3	6.0	0.965	51.1	6.4	0.927	6.4	3.5
	selected region	1168–1457	10	41.3	5.0	0.973	46.8	5.9	0.928	5.9	3.5
CT	full-range	979–2989	11	130.6	5.7	0.947	171.6	7.6	0.905	7.5	2.9
	fingerprint	979–1477	10	121.4	5.3	0.961	179.5	8.0	0.900	7.9	2.9
	main phenolic region	1133–1457	10	121.5	5.3	0.957	134.0	5.9	0.934	5.8	3.7
	selected region	1168–1457	9	128.2	5.6	0.953	130.8	5.8	0.937	5.7	3.8

^a Calibration set $n = 106$ samples; validation set = 86 samples. TPC, total phenolic compounds in mg of gallic acid kg⁻¹; TA, total anthocyanins in mg of malvidin-3-glucoside kg⁻¹; CT, condensed tannins in mg of (+)-catechin kg⁻¹; RMSEC, root mean square error of calibration; RMSEP, root mean square error of prediction; R², coefficient of determination; RPD, residual predictive deviation; RMSEP_{cor} bias-corrected RMSEP.

to consider other smaller intervals in the calibration. After different attempts, the intervals that were shown to contain more information were the 1133–1457 and 1168–1457 cm⁻¹ ranges, both coincident with some of the ranges chemically determined.

Quantitative Analysis: PLS Models. When one is working with IR, it is important to determine whether spectra preprocessing is necessary before data analysis. However, because our FT-MIR instrument allows high levels of signal stability and reproducibility to be achieved over time, we decided not to preprocess the spectral data and work with the raw spectral data.

With a quantification purpose, we used the PLS regression method to build four different multivariate calibration models between the FT-MIR spectra (using the four wavenumber ranges selected) and the reference values of the phenolic concentration. The results of each model are reported in Table 3.

As can be seen, in most of cases, the four regions tested provided good calibration models (RMSEC% < 6.0) for the three types of phenolic compounds with accurate prediction (RMSEP % < 8.0 and RPD > 3.0). Nevertheless, it can be also observed that the regions where we found the main phenolic spectral features were, in general, the best correlated with the concentration, providing the best results of the parameters that evaluate the accuracy assessment such as RPD (>3.0) or RMSEP % (<6.0).

Total Phenolic Compounds (TPC) Prediction. To verify the absence of bias between the reference values and the predicted values, we carried out a *joint confidence region* analysis. With this study we could conclude that the results obtained by the four FT-MIR models are reliable because, with a significance level of 0.05, the slope and intercept of the four regression lines obtained were not significantly different from 1 and 0, respectively.

Indeed, when dealing with this phenolic parameter, the RMSEP % values obtained were satisfactory for all regions tested, but the smallest calibration error and also the best R²_{cal} were obtained when we used the full-range region. However, seeing the relatively high number of factors and also the high difference between the values of RMSEC and RMSEP, we concluded that this model was slightly overfitted.

The comparison of the other three models showed that the 1168–1457 cm⁻¹ range provided the best results with both calibration and prediction errors. This behavior suggested that

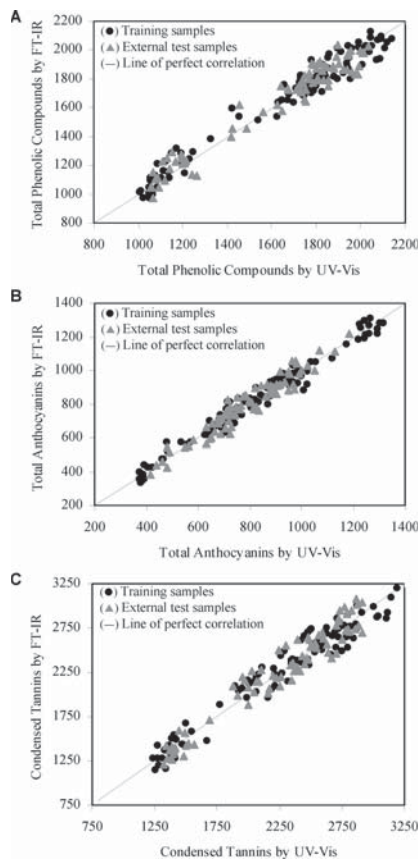


Figure 5. Correlation plot of training and test for the prediction of total phenolic compounds (expressed as mg kg⁻¹ of gallic acid) (A), total anthocyanins (expressed as mg kg⁻¹ of malvidin-3-glucoside) (B), and condensed tannins (C) (expressed as mg kg⁻¹ of catechin) using selected region model (1168–1457 cm⁻¹).

Table 4. Analytical Performance Parameters of the Individual Multivariate Calibration Models Built by PLS Regression for Each Variety and Using the 1168–1457 cm⁻¹ Spectral Region^a

grape variety	dependent variable	samples	PLS factors	RMSEC	RMSEC (%)	R ² _{cal}	RMSECV	RMSECV (%)	R ² _{val}	RPD
Merlot	TPC	27	10	5.0	0.3	0.998	22.7	1.2	0.953	4.7
	TA	29	7	14.6	1.4	0.988	24.2	2.4	0.966	5.5
	CT	21	9	15.8	0.6	0.996	66.7	2.8	0.923	3.7
Tempranillo	TPC	24	8	7.5	0.4	0.992	17.9	1.0	0.954	4.7
	TA	22	7	10.1	1.2	0.992	18.7	2.3	0.971	6.0
	CT	23	6	24.4	0.8	0.989	33.4	1.4	0.979	7.1
Syrah	TPC	24	5	18.1	1.0	0.980	25.6	1.4	0.961	5.2
	TA	30	9	7.7	0.8	0.997	24.2	2.4	0.972	6.1
	CT	22	7	21.0	0.9	0.976	41.7	1.7	0.906	3.3
Cariñena	TPC	20	10	1.8	0.2	0.998	12.7	1.2	0.904	3.3
	TA	26	8	5.1	0.8	0.995	15.4	2.4	0.955	4.8
	CT	20	7	7.3	0.5	0.986	25.0	1.8	0.846	2.6
Garnacha	TPC	20	7	8.1	0.7	0.991	14.9	1.3	0.971	6.0
	TA	20	6	6.1	1.5	0.979	8.5	2.1	0.959	5.1
	CT	22	5	46.8	2.5	0.967	67.2	3.7	0.932	3.9
Cabernet sauvignon	TPC	27	7	13.9	0.8	0.991	23.2	1.4	0.974	6.3
	TA	23	8	7.9	1.0	0.982	16.1	2.1	0.927	3.8
	CT	25	6	45.0	1.8	0.978	73.0	2.9	0.943	4.3

^a TPC, total phenolic compounds in mg of gallic acid kg⁻¹; TA, total anthocyanins in mg of malvidin-3-glucoside kg⁻¹; CT, condensed tannins in mg of (+)-catechin kg⁻¹; RMSEC, root mean square error of calibration; RMSEP, root mean square error of prediction; R₂, coefficient of determination; RPD, residual predictive deviation.

this spectral region was more specific for the phenolic compounds than the other regions considered or that the masking effect produced by the interfering substances is less important.²⁸ Moreover, when the correction of the RMSEP was made, we obtained a RMSEP_{cor} of 4.1%, so this good value, together with the RPD of 4.5, ensures the robustness of the model for the prediction of TPC.

Figure 5A shows graphically the good correlation plot of calibration and validation for the prediction of TPC using the selected 1168–1457 cm⁻¹ wavenumber range. Indeed, although from the distribution of the samples shown in Figure 5A, it can be thought that it shows bimodality (due to the fact that some grape varieties presented lower amounts of phenolic compounds than others), it was not necessary to build two calibrations because the validation samples of the external set (i.e., test set) were correctly predicted. Therefore, this behavior demonstrated that there was no overfitting.

Total Anthocyanins (TA) Prediction. For this phenolic parameter the *joint confidence region* analysis showed that there is no bias between the reference and the predicted values, so they are comparables. As can be observed in Table 3, the four wavenumber intervals assayed showed good values for all of the parameters, and these were slightly higher than those of the TPC.

From the results presented in Table 3, we conclude that the best TA prediction was obtained when using the full range because this model presented the smallest error values, the best R²_{val}, and the highest RPD. However, the difference between RMSEC and RMSEP is the highest, and the number of PLS factors is also higher than those necessary to build the other models. Indeed, the models obtained when using the other regions are also very suitable, especially the one obtained in the selected region 1168–1457 cm⁻¹, as can be seen in Figure 5B.

Because we did not chemically corroborate the spectral features of the anthocyanins and, taking into account the heterogeneous

nature of these pigments given by the presence of glycoside anthocyanins, it is reasonable to think that the relevant spectral information could not be totally coincident with the main phenolic spectral frequencies. Therefore, for these compounds, although a good calibration was obtained in the 1168–1457 cm⁻¹ region, it is possible to obtain better calibration and prediction results when more spectral information is considered (i.e., full range). However, the corrected prediction error obtained, RMSEP_{cor}, although acceptable whatever the region selected, was always significantly higher than the standard error of the reference method due to the low value of this latest.

Condensed Tannins (CT) Prediction. When evaluating the data for this parameter, we had to remove some samples from the training set because they behaved as outliers. The outliers were identified by their high values of residual *y*-variance and leverage and subsequently subtracted from the model. The presence of outliers can be attributed, on the one hand, to the fact that the degree of polymerization of these compounds may be very different depending on the grape characteristics and, on the other hand, to the fact that the value of this parameter is strongly dependent on the method used for its determination. Taking into account that the methylcellulose precipitation assay is an indirect method of measurement and that it determines only the phenols with a high size, the accuracy of this method, even suitable, could make more difficult the correspondence with the spectral response. Once these samples were obviated, the models built were satisfactory (Table 3) and the *joint confidence region* analysis for all of the models constructed showed the absence of significant bias. However, we could clearly see that the spectral information obtained chemically helped to improve the model. Thus, whereas the wider regions provided the less accurate prediction (with the highest RMSEP % values and the worst R²_{val}) and the models constructed in these regions are less robust (RPD < 3.0), the models obtained in the regions in which the enrichment

experiments gave the best results, mainly when the selected region of 1168–1457 cm^{-1} was used. Figure 5C illustrates the good correlation obtained for this parameter in this region. As occurred with TPC correlation, it could be thought that Figure 5C shows bimodality but, because the validation samples of the external set were correctly predicted, we could conclude that there was no overfitting.

Models for Individual Grape Varieties. Provided the good results obtained with the full data set of the samples analyzed and especially in the spectral range of 1168–1457 cm^{-1} , we decided to check the FT-MIR spectroscopy ability to predict the phenolic parameters but working with each grape variety individually.

For this purpose and taking into account the smaller number of samples, the PLS models were constructed using leave-one-out cross-validation. As can be seen in Table 4, for all of the grape varieties the calibration error was very good, with values of <2.5%, and also the calibration lines obtained were very suitable. On the other hand, the low values of the error obtained by cross-validation (<4.0%) also showed the good relationship between the spectra of each variety and the reference values of phenolic compounds. The values of RPD of >3.0 gave an idea of the acceptable robustness of the models built. Only for the CT model of Cariñena did we obtain a not good enough R^2_{val} value (0.846), which coincides with the lowest RPD value. This different behavior can be attributed to the lower range of this parameter values on the calibration samples because the low contents of phenolic compounds is a varietal characteristic of Cariñena grapes. This model only could be applied for rough screening.

From all of these results we conclude that FT-MIR spectroscopy combined with multivariate calibration allows a simultaneously fast and accurate determination of TPC, TA, and CT concentrations in grape extracts. The possibility of predicting these grape parameters is an invaluable tool when a large number of samples needs to be analyzed, as occurs when a phenolic ripening control is necessary.

Moreover, the present work also presents a preliminary attempt to apply the FT-MIR instrument to predict the phenolic composition of specific grape varieties, which is a starting point for the design of specific models according to the requirements of the wineries if a greater number of samples were considered.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: +34977558494. Fax: +34977558446. E-mail: montserrat.mestres@urv.cat.

Funding Sources

We acknowledge the Spanish Ministry of Science and Technology (Projects AGL2007-61550 and AGL2010-19688) for financial support.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Joe Luis Villa Medina for his valuable help in the realization of this study.

REFERENCES

(1) Saint-Cricq, N.; Vivas, N.; Glories, Y. Maturation phénolique des raisins rouges. Relation avec la qualité des vins. Comparaison des cépages Merlot et Tempranillo. *Prog. Agric. Vitic.* **1998**, *115*, 306–318.

(2) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology. Vol. 2. The Chemistry of Wine, Stabilization and Treatments*; Wiley: Chichester, U.K., 1999.

(3) Cheynier, V.; Duenas-Paton, M.; Salas, E.; Maury, C.; Souquet, J. M.; Sarni-Manchado, P.; Fulcrand, H. Structure and properties of wine pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 298–305.

(4) Romero-Cascales, I.; Ortega-Regules, A.; Lopez-Roca, J. M.; Fernandez-Fernandez, J. I.; Gomez-Plaza, E. Differences in anthocyanin extractability from grapes to wines according to variety. *Am. J. Enol. Vitic.* **2005**, *56*, 212–219.

(5) Rodríguez Montealegre, R.; Romero Peces, R.; Chacón Vozmediano, J. L.; Martínez Gascuña, J.; García Romero, E. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food Compos. Anal.* **2006**, *19*, 687–693.

(6) De Andres-de Prado, R.; Yuste-Rojas, M.; Sort, X.; Andres-Lacueva, C.; Torres, M.; Lamuela-Raventos, R. Effect of soil type on wines produced from *Vitis vinifera* L. cv. Grenache in commercial vineyards. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 779–786.

(7) Perez-Lamela, C.; Garcia-Falcon, M.; Simal-Gandara, J.; Orriols-Fernandez, I. Influence of grape variety, vine system and enological treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chem.* **2007**, *101*, 601–606.

(8) Gomez-Miguez, M.; Heredia, F. Effect of the maceration technique on the relationships between anthocyanin composition and objective color of Syrah wines. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5117–5123.

(9) Blouin, J. *Techniques d'Analyses des Moûts et des Vins*; Dujardin-Salleron: Paris, France, 1992.

(10) Mercurio, M. D.; Damberg, R. G.; Herderich, M. J.; Smith, P. A. High throughput analysis of red wine and grape phenolics-adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay and modified somers color assay to a rapid 96 well plate format. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 4651–4657.

(11) Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, *58*, 109–130.

(12) Versari, A.; Parpinello, G. P.; Mattioli, A. U.; Galassi, S. Determination of grape quality at harvest using Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Am. J. Enol. Vitic.* **2008**, *59*, 317–322.

(13) Urtubia, A.; Pérez-Correa, J. R.; Meurens, M.; Agosin, E. Monitoring large scale wine fermentations with infrared spectroscopy. *Talanta* **2004**, *64*, 778–784.

(14) Mazarevica, G.; Diewok, J.; Baena, J. R.; Rosenberg, E.; Lendl, B. On-line fermentation monitoring by mid-infrared spectroscopy. *Appl. Spectrosc.* **2004**, *58*, 804–810.

(15) Vonach, R.; Lendl, B.; Kellner, R. High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines. *J. Chromatogr., A* **1998**, *824*, 159–167.

(16) Moreira, J. L.; Santos, L. Analysis of organic acids in wines by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*, 421–425.

(17) Patz, C. D.; Blicke, A.; Ristow, R.; Dietrich, H. Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 81–89.

(18) Gorinstein, S.; Weisz, M.; Zemsner, M.; Tilis, K.; Stiller, A.; Flam, I.; Gat, Y. Spectroscopic analysis of polyphenols in white wines. *J. Fern. Bioeng.* **1993**, *75*, 115–120.

(19) Soriano, A.; Pérez-Juan, P. M.; Vicario, A.; González, J. M.; Pérez-Coello, M. S. Determination of anthocyanins in red wine using a newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chem.* **2007**, *104*, 1295–1303.

(20) Versari, A.; Boulton, R.; Thorngate, J. The prediction of the color components of red wines using FTIR, wine analyses, and the method of partial least squares. *ACS Symp. Ser.* **2004**, No. 886, 53–67.

(21) Fernandez, K.; Agosin, E. Quantitative analysis of red wine tannins using Fourier-ransform mid-infrared spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 7294–7300.

(22) Versari, A.; Boulton, R. B.; Parpinello, G. P. Effect of spectral pre-processing methods on the evaluation of the color components of

red wines using Fourier-transform infrared spectrometry. *Ital. J. Food Sci.* **2006**, *18*, 423–431.

(23) Vera, L.; Aceña, L.; Boqué, R.; Guasch, J.; Mestres, M.; Busto, O. Application of an electronic tongue based on FT-MIR to emulate the gustative mouthfeel “tannin amount” in red wines. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 3043–3049.

(24) Jensen, J. S.; Egebo, M.; Meyer, A. Identification of spectral regions for the quantification of red wine tannins with Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3493–3499.

(25) Janik, L. J.; Cozzolino, D.; Damberg, R. G.; Cynkar, W. U.; Gishen, M. The prediction of total anthocyanin concentration in red-grape homogenates using visible-near-infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *594*, 107–118.

(26) Cozzolino, D.; Cynkar, W. U.; Damberg, R. G.; Mercurio, M. D.; Smith, P. A. Measurement of condensed tannins and dry matter in red grape homogenates using near infrared spectroscopy and partial least squares. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7631–7636.

(27) Frago, S.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J. Estudio y optimización de un método analítico para la estimación de los parámetros de madurez fenólica de uvas tintas. *Enólogos* **2009**, *58*, 38–43.

(28) Moreira, J. L.; Santos, L. Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 263–268.

(29) Martens, H.; Naes, T. *Multivariate Calibration*; Wiley: Chichester, U.K., 1999.

(30) CAMO. *The Unscrambler User's Guide*, version 9.0; Oslo, Norway, 2003.

(31) Wu, D.; He, Y.; Shi, J.; Feng, S. Exploring near and mid-infrared spectroscopy to predict trace iron and zinc contents in powdered milk. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1697–1704.

(32) Sinelli, N.; Spinardi, A.; Di Egidio, V.; Mignani, I.; Casiraghi, E. Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. *Postharvest Biol. Technol.* **2008**, *50*, 31–36.

(33) Faber, K.; Kowalski, B. R. Improved prediction error estimates for multivariate calibration by correcting for the measurement error in the reference values. *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 660–665.

(34) Boulet, J.; Doco, T.; Roger, J. M. Improvement of calibration models using two successive orthogonal projection methods. Application to quantification of wine mannoproteins. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2007**, *87*, 295–302.

(35) Boulet, J. C.; Williams, P.; Doco, T. A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *69*, 79–85.

(36) Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; Rondeau, P. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared analysis of the fermentation process of pineapple. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *545*, 99–106.

(37) Bevin, C. J.; Fergusson, A. J.; Perry, W. B.; Janik, L. J.; Cozzolino, D. Development of a rapid “fingerprinting” system for wine authenticity by mid-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9713–9718.

(38) Edelmann, A.; Diewok, J.; Schuster, K. C.; Lendl, B. Rapid method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1139–1145.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

ANEXO 5

**QUANTIFICATION OF PHENOLIC COMPOUNDS ALONG RED
WINEMAKING USING FT-MIR SPECTROSCOPY AND PLS-REGRESSION**

Journal of Agricultural and Food Chemistry (pendiente de publicación)

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

Quantification of Phenolic Compounds during Red Winemaking Using FT-MIR Spectroscopy and PLS-Regression

Sandra Frago, Laura Aceña, Josep Guasch, Montserrat Mestres,* and Olga Busto

Group of Analytical Chemistry of Wine and Food, Department of Analytical Chemistry and Organic Chemistry Campus Sescelades, Faculty of Oenology, Universitat Rovira i Virgili, 43007 Tarragona, Spain

ABSTRACT: We present a rapid method to quantify phenolic compounds all during the red winemaking process using Fourier transform mid-infrared (FT-MIR) spectroscopy and chemometrics. To get the reference values, we used the usual UV–vis spectroscopy methods, and the compounds studied were evaluated as total phenolic compounds (TPC), total anthocyanins (TA), and condensed tannins (CT). Sampling from five different grape varieties (Merlot, Tempranillo, Syrah, Cariñena, and Cabernet sauvignon), harvested at different ripening states, and monitored over 10 days of vinification produced a total of 600 spectra. These were used to build and validate four different predictive models by partial least-squares (PLS) regression. The spectral regions selected for each model were between 979 and 2989 cm^{-1} , and when selecting the most suitable one in each case, good values of performance parameters were obtained ($R^2_{\text{val}} > 0.95$ and $\text{RPD} > 4.0$ for TPC; $R^2_{\text{val}} > 0.90$ and $\text{RPD} > 3.0$ for TA; $R^2_{\text{val}} < 0.8$ and $\text{RPD} < 3.0$ for CT). Furthermore, also more specific PLS regression models for each phenolic parameter and each grape variety were developed using different regions with results similar to those obtained when dealing with all of the grape varieties. It is concluded that FT-MIR spectroscopy together with multivariate calibration could be a rapid and valuable tool for wineries to carry out the monitoring of phenolic compound extraction during winemaking.

KEYWORDS: FT-MIR spectroscopy, PLS regression, phenolic compounds, anthocyanins, condensed tannins, vinification, maceration

INTRODUCTION

Phenolic compounds play an important role in the organoleptic properties of red wines and also in the aptitude of the wine to age. Among the different phenolic compounds in red wines, the two most important parameters from the oenological point of view are the total anthocyanins and the condensed tannins. Thus, whereas the anthocyanins are responsible for the wine color and are located in grape skins, the condensed tannins are present in skins and seeds and are related to astringency,¹ although it has to be taken into account that tannins are also involved in the development and stabilization of wine color during its aging.²

The concentration of the phenolic compounds in grapes is affected by many factors including grape variety,³ state of grape ripening,⁴ climatic and soil conditions (terroir),^{5,6} and viticulture techniques.⁷ The transference of phenolic compounds from grapes to wines not only depends on the raw material (variety and ripening state) but also on the winemaking strategies, depending on many factors, such as fermentation temperature, skin to juice ratio, maceration time, and enzyme additions.^{8,9}

During red winemaking, the phenolic extraction from the skins starts quickly and soon becomes stable, while extraction from the seeds starts later and increases gradually, when the ethanol present in the medium dissolves the waxy layer that coats the seeds and promotes the polyphenol solubilization. Indeed, the phenolic content of grapes is mainly extracted throughout the first 10 days of maceration,¹⁰ and when skin-contact maceration is extended over this period of time, the wine color does not increase significantly, but it becomes more stable.¹¹ Thus, when producing a young wine, short macerations are preferred to avoid too astringent wines,¹² but for aged wines, long macerations are required to have enough phenolic compound amounts to ensure

color stabilization during aging.¹³ Therefore, monitoring the polyphenol content in grapes is essential to determine the wine aging ability.

The most usual analytical methods for quantifying phenolic compounds in musts/wines are based on colorimetric measurements of the diluted samples, at 520 nm for anthocyanins and at 280 nm for total phenolic compounds and condensed tannins.^{1,14,15} These methods are generally used in wineries because they are simple and precise enough, but they are time-consuming and expensive when many samples must be analyzed, e.g., for process control.

To solve these problems, we propose a rapid method that combines the Fourier transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy and partial least squares (PLS) regression. FT-MIR spectroscopy is a powerful analytical tool that allows fast and simultaneous analysis of several parameters in a large number of samples. Moreover, it implies a minimal sample preparation,¹⁶ being possible to know, at real time, the phenolic content all during winemaking.

However, because of the great amount of information that each FT-MIR spectrum provides, it is necessary to use chemometric tools to extract quality information, both for qualitative and for quantitative analyses. PLS regression is a multivariate calibration method, which is particularly useful when we need to predict a set of dependent variables (i.e., concentrations) from a large set of independent variables (i.e., spectra). FT-MIR

Received: May 18, 2011

Accepted: September 12, 2011

Revised: September 8, 2011

spectroscopy is an attractive technology for the food and beverage industry because of its simple, rapid, and nondestructive measurements.¹⁶ It has been applied for routine qualitative analysis and process control in wineries, enabling immediate analysis of raw materials,¹⁷ fermentation monitoring,^{18,19} or determination of some of the main compounds in wine such as ethanol, organic acids, or sugars.^{20–22} It has also been applied to the quantification of phenolic compounds in white²³ and red wines.^{24–27} Related to the monitoring of the extraction of phenolic compounds during winemaking, although there are few studies carried out by using NIR spectroscopy,^{28,29} up to now, there is only a previous study where FT-MIR has been used for this purpose, but its authors only considered one grape variety, and the sampling was not suitably performed to ensure representativeness.²⁹

The objective of the present article was the application of FT-MIR, combined with PLS regression, for quantifying the concentration of phenolic compounds (evaluated as total phenolic compounds, total anthocyanins, and condensed tannins) in the skin-contact macerations during winemaking.

It was necessary to take into account that the grape variety and ripening stage determine the phenolic content solubilization in the macerated grapes. Thus, to develop robust multivariate models, we chose the samples of the calibration set considering this natural variability by taking five red grape varieties at different stages of ripening. Moreover, the progressive change of sample matrix during maceration due to winemaking further increased the robustness of the models.

The data set reference values were obtained by common UV–vis spectroscopic methods used in cellars: absorbance at 520 nm for total anthocyanins and 280 nm for total phenolic compounds and condensed tannins (after precipitation by methylcellulose).

MATERIALS AND METHODS

Samples. Grapes from five red cultivars (Tempranillo, Merlot, Syrah, Cariñena, and Cabernet sauvignon) were obtained from the experimental vineyard, Mas dels Frares, belonging to the Faculty of Enology (Rovira i Virgili University) in Constantí (Tarragona, Spain) during the 2009 vintage. Every sampling consisted of several clusters, carefully collected as follows: Vines that combine sun and shadow were randomly selected and marked. For each grape variety, one cluster from each marked vine was collected and transported to the laboratory in a 20 kg box for winemaking. The sampling also considered the complete biological cycle of each variety, so it was done weekly for each variety, from the beginning of ripeness until vintage. Thus, the number of samplings was 20: 5 Merlot, 4 Syrah, 4 Tempranillo, 4 Cabernet sauvignon, and 3 Cariñena.

Microvinifications. We proceeded with three individual microvinifications for each variety and ripening stage (i.e., 60 microvinifications).

Thus, the grapes of each sampling were manually destemmed and crushed with a manual crusher fitted with stainless steel rollers. Then, 4 kg of crushed grapes were introduced into plastic containers of 6 L, and 0.48 g of $K_2S_2O_5$ (0.12 g/kg) was added. The alcoholic fermentation was carried out by selected yeasts (AWRI 596), which were inoculated (0.20 g per kg of crushed grape) on the same day of harvest. Fermentation activators were first added 24 h after yeast inoculation (Actiferm 1) and also when the density reached values of 1040–1050 $g L^{-1}$ (Actiferm 2). Must/wine density and temperature were daily measured. Must temperature during fermentation was controlled by keeping the plastic containers in a thermo-controlled room in order to prevent the temperature from exceeding 30 °C.

The alcoholic fermentation finished between the fifth and the seventh day, but the skin-contact maceration was extended until the 10th day.

During both periods (fermentation and maceration), the cap of each microvinification was punched down once a day, and after this action, an aliquot of 20 mL was taken to be analyzed.

Reagents and Standards. The standards of malvidin-3-glucoside (purity $\geq 90\%$) and (+)-catechin (purity $\geq 96\%$) were purchased from Fluka (Madrid, Spain). Methyl cellulose (M-0387) was supplied by Sigma Aldrich (Madrid, Spain). Gallic acid monohydrate (99.5%) and the rest of chemicals used for the study were of analytical-reagent grade and provided by Scharlab (Barcelona, Spain).

Selected yeasts (AWRI 596) were purchased from Agrovín (Ciudad Real, Spain). The fermentation activators (Actiferm 1 and 2) and the potassium bisulphite (purity $\geq 95\%$) were supplied by Martin Vialatte Oenologie (Epernay, France).

Instrumentation. Centrifugation of must and wine samples was carried out with a Hettich Universal 32 R centrifuge (Tuttlingen, Germany). The absorbance was measured using a Thermo Spectronic UV–vis spectrophotometer Model Helios γ (Thermo Electron Corporation, Cambridge, UK). All spectra of the musts/wines were collected using a FT-MIR 470 Nexus (Thermo Nicolet, USA), equipped with a Global IR source, a KBr beam splitter, a ZnSe liquid transmission flow cell of 0.025 mm of path length (0.004 mL of liquid sample volume), and a Deuterate Triglycine Sulfate detector (DTGS). The instrument was connected to a TDI Bacchus (Gavà, Barcelona, Spain) autosampler with an online and automatic system of sample filtration (stainless steel filter of food-grade with a porous size of 50 μm , Teflon coated), which pumped a volume of 10 mL of each individual sample to the cell for spectra acquisition. The software package OMNIC, version 6.2, from Thermo Nicolet was used for spectra acquisition. The software used for data analysis and calibration was the Unscrambler package (version 9.0, CAMO ASA, Norway).

Midinfrared Scanning. Prior to MIR scanning, musts and wines were centrifuged at 8000 rpm for 10 min. All spectra were averaged from 32 scans (each spectrum acquisition takes only 30 s per sample) and collected in absorbance mode, at 4 cm^{-1} resolution, in the wavenumber range of 979–2989 cm^{-1} . To remove the environmental interferences (water vapor together with CO_2) and the possible instrumental drift over time, every 10 h the instrument collected a background spectrum that was automatically subtracted from each sample spectrum, yielding the spectrum of the compounds being analyzed. Furthermore, since water bands dominate the spectrum of liquid samples, prior to the analysis of the musts and wines, a blank of distilled water was acquired and the spectrum obtained also subtracted.

FT-MIR instruments allow one to achieve high levels of signal stability and reproducibility over time, and it is not necessary to preprocess spectral data, so we decided to work with raw spectral data.

Reference Analytical Measurements. Total phenolic compounds (mg L^{-1} gallic acid), total anthocyanins (mg L^{-1} malvidin-3-glucoside), and condensed tannins (mg L^{-1} catechin) were the oenological parameters used to monitor the phenolic extraction during winemaking. These parameters were determined by UV–vis spectroscopy as follows.

Total Phenolic Compound Analysis. The total phenolic compound (TPC) content was determined on musts/wines by measuring the absorbance at 280 nm after dilution 1:50 with distilled water¹ in a 1 cm quartz cuvette. The quantification was carried out by the external standard method using a calibration line built with gallic acid as the standard at 6 different concentrations in the range of 2.2–18.0 mg L^{-1} .

Total Anthocyanin Analysis. Total anthocyanin (TA) content was determined on musts/wines by measuring the absorbance at 520 nm after dilution 1:25 with 0.1 M HCl to get pH ~ 1.0 in a 1 cm plastic cuvette.¹⁴ The quantification was carried out by the external standard method using a calibration line built with malvidin-3-glucoside as the standard at 6 different concentrations in the range of 2.4–20.0 mg L^{-1} .

Table 1. Descriptive Statistics for Total Phenolic Compounds, Total Anthocyanins, and Condensed Tannins of Training and Test Sets^a

phenolic parameter	training set (samples = 400)				test set (samples = 200)			
	min	max	mean	SD	min	max	mean	SD
TPC	250	1189	778	233	250	1172	746	252
TA	98	577	349	126	99	569	333	131
CT	80	742	389	152	91	761	388	150

^a TPC, total phenolic compounds (mg gallic acid L⁻¹); TA, total anthocyanins (mg malvidin-3-glucoside L⁻¹); CT, condensed tannins (mg catechin L⁻¹); min, the minimum value; max, the maximum value; SD, standard deviation.

Table 2. Descriptive Statistics for the Total Phenolic Compounds (TPC), Total Anthocyanins (TA), and Condensed Tannins (CT) for Each Varietal Must/Wine^a

cultivar	samples	phenolic parameter	phenolic			
			min	max	mean	SD
Syrah	120	TPC	391	1122	921	183
		TA	238	566	461	74
		CT	80	521	297	96
Merlot	150	TPC	378	1189	896	216
		TA	192	577	444	93
		CT	84	502	294	95
Tempranillo	120	TPC	278	1010	801	192
		TA	119	384	300	57
		CT	139	761	513	128
Cariñena	90	TPC	250	582	476	89
		TA	98	208	163	27
		CT	100	664	440	143
Cabernet sauvignon	120	TPC	252	904	638	165
		TA	99	377	282	70
		CT	91	690	437	150

^a TPC, total phenolic compounds (mg gallic acid L⁻¹); TA, total anthocyanins (mg malvidin-3-glucoside L⁻¹); CT, condensed tannins (mg catechin L⁻¹); min, the minimum value; max, the maximum value; SD, standard deviation.

204 *Condensed Tannin Analysis.* The condensed tannin (CT) content
 205 was determined on musts/wines by the indirect method of precipitation
 206 with methyl-cellulose precipitable (MCP),¹⁵ measuring the absorbance
 207 at 280 nm in a 1 cm quartz cuvette. The quantification was carried out by
 208 the external standard method using a calibration line built with (+)-
 209 catechin as the standard at 6 different concentrations in the range of 19.2
 210 to 76.9 mg L⁻¹.

211 **Development and Validation of FT-MIR Models.** The data
 212 set was composed of a total of 600 samples, corresponding to musts/
 213 wines from 60 vinifications (15 Merlot, 12 Syrah, 12 Tempranillo, 12
 214 Cabernet sauvignon, and 9 Cariñena) analyzed daily during 10 days of
 215 skin-contact maceration.

216 First, a descriptive analysis of the data was performed by principal
 217 components analysis (PCA). Then, quantitative analysis was per-
 218 formed with partial least-squares (PLS) regression by relating the
 219 sample spectra and the reference values.³⁰ Before proceeding with the
 220 PLS, the FT-MIR spectra data were automatically processed by mean
 221 centering.

222 The whole data set was split using the Kennard–Stone algorithm,³¹
 223 into a training set ($N_C = 400$ samples), to build and validate the model,
 224 and a test set ($N_T = 200$ samples), to evaluate the prediction ability of
 225 the model.

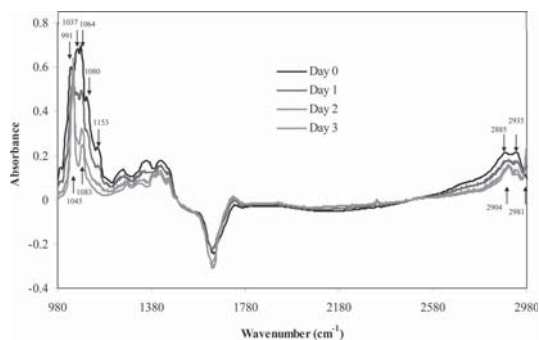


Figure 1. FT-MIR spectra belonging to the fermentation of a must sample daily monitored during the first 3 days. Main glucose peaks (↓): 991, 1037, 1064, 1080, 1103, 1153, 2885, and 2935 cm⁻¹. Main ethanol peaks (↑): 1045, 1083, 2904, and 2981 cm⁻¹.

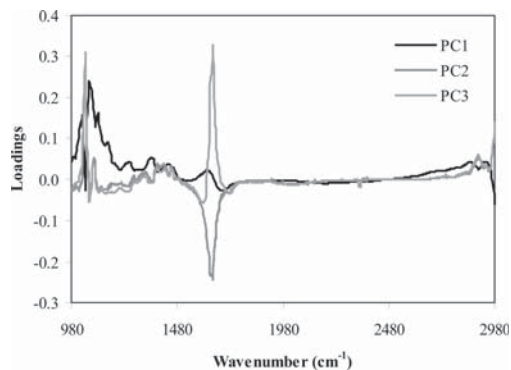


Figure 2. Loadings for the first three PC's of the full-range (979–2989 cm⁻¹) spectral data.

The Kennard-Stone algorithm proposed a sequential method that should cover the experimental region uniformly. The procedure consists of selecting the first two samples with the largest Euclidean distance for the training set, considering the values of the spectral variables. Then, from the rest of all possible samples, the one that is most distant from those already selected was chosen, and it was included in the training set. This selection process continued until the desired number of samples for the training set was reached. The remaining samples in the data set are used to create the validation set. The Kennard-Stone algorithm ensures

226
227
228
229
230
231
232
233
234

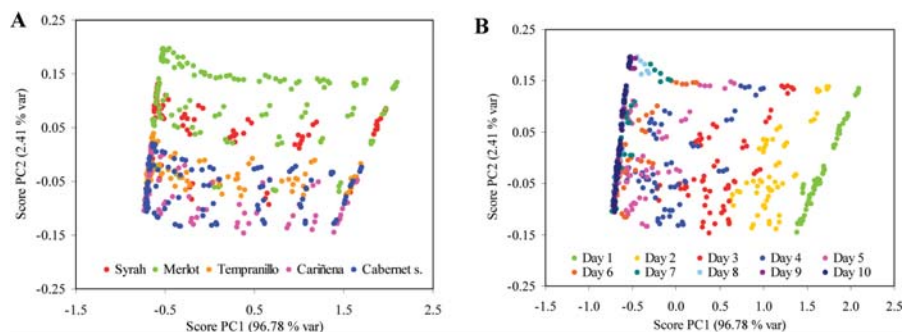


Figure 3. Score plots (PC1–PC2) obtained by applying PCA to the FT-MIR spectra in the region 979–1477 cm^{-1} (A) when considering the cultivars and (B) when considering the vinification stage.

Table 3. Analytical Performance Parameters of the Multivariate Calibration Models Built by PLS Regression Using Different Spectral Regions of Musts/Wines^a

dependent variable	model	region (cm^{-1})	PLS factors	RMSEC	RMSEC (%)	R^2_{cal}	RMSEP	RMSEP (%)	R^2_{val}	RMSEPCor (%)	RPD
TPC	full-range	979–2989	9	48.6	6.2	0.956	52.0	7.0	0.958	6.9	4.9
	fingerprint	979–1477	10	39.2	5.0	0.972	42.4	5.7	0.972	5.6	6.0
	main phenolic region	1133–1457	9	39.4	5.1	0.971	43.0	5.8	0.971	5.7	5.9
	selected region	1168–1457	9	40.4	5.2	0.970	45.7	6.1	0.967	6.1	5.5
TA	full-range	979–2989	10	31.9	9.1	0.936	39.2	11.8	0.912	11.8	3.3
	fingerprint	979–1477	12	20.6	5.9	0.973	25.1	7.5	0.963	7.5	5.2
	main phenolic region	1133–1457	9	25.1	7.2	0.960	28.6	8.6	0.952	8.6	4.6
	selected region	1168–1457	9	25.0	7.2	0.960	29.4	8.8	0.950	8.8	4.5
CT	full-range	979–2989	15	57.7	14.8	0.858	70.6	18.2	0.777	<i>b</i>	2.1
	fingerprint	979–1477	13	64.0	16.4	0.822	66.9	17.4	0.799	<i>b</i>	2.2
	main phenolic region	1133–1457	15	62.5	15.9	0.830	71.2	18.4	0.772	<i>b</i>	2.1
	selected region	1168–1457	13	63.8	16.3	0.824	77.8	20.1	0.728	<i>b</i>	1.9

^a RMSEC, root mean square error of calibration; R^2_{cal} coefficient of determination of calibration; RMSEP, root mean square error of prediction; R^2_{val} coefficient of determination of validation; RMSEPCor, bias-corrected RMSEP; RPD, residual predictive deviation. TPC, total phenolic compounds ($\text{mg gallic acid L}^{-1}$); TA, total anthocyanins ($\text{mg malvidin-3-glucoside L}^{-1}$); CT, condensed tannins ($\text{mg catechin L}^{-1}$).⁶ It was impossible to calculate this value as the correction of the RMSEP % due to the negative values inside the square roots.

235 that the validation samples are in the experimental space of the training
 236 set, minimizing the extrapolation when the validation samples are predicted.

237 A critical step in model building is the selection of the optimum
 238 number of factors to ensure the prediction ability but also to avoid
 239 overfitting. In this study, the number of factors was determined by means
 240 of leave-one-out cross-validation³² considering the lowest root-mean-
 241 square error of cross validation (RMSECV).³³

242 Related to the calibration step, we evaluated the model fit to the data
 243 with the root-mean-square error of calibration (RMSEC) expressed as a
 244 percentage (RMSEC %),³³ which can be defined as the mean error of
 245 the model.

246 To test the predictive accuracy of the calibration models built, the
 247 external test set was used to determine the root-mean-square error of
 248 prediction (RMSEP) expressed as a percentage (RMSEP %).³³

249 Additionally, to standardize the predictive accuracy, the residual
 250 predictive deviation (RPD) was calculated for each model as the ratio
 251 between the standard deviation (SD) of the TPC, TA, and CT values of
 252 the validation samples (test set) and the RMSEP results.³⁴ An RPD value
 253 greater than 3.0 indicates a suitable calibration model for prediction
 254 purposes.^{17,35}

255 **Estimation of the True Prediction Error.** The reference values
 256 used in the development of the models lead to an intrinsic associated
 257 uncertainty, so they are obtained with a standard error. Therefore, the

validation of multivariate calibration models using these reference values
 provides a systematic overestimation of the true prediction error, which
 is the so-called apparent prediction error. To yield a more realistic
 estimation of the true prediction error of the models, we used the simple
 correction procedure proposed by Faber et al.³⁶ (eq 1)

$$\text{MSEPCor} = \text{MSEP}_{\text{app}} - \sigma^2 \quad (1)$$

where MSEPCor is the bias-corrected MSEP, MSEP_{app} is the apparent
 MSEP (i.e., the value obtained with the test set), and σ^2 is the variance of
 the measurement error in the reference values.

RESULTS AND DISCUSSION

Reference Values. Table 1 summarizes the reference values of
 the contents of the total phenolic compounds (TPC), total
 anthocyanins (TA), and condensed tannins (CT) for both data
 sets determined by using the reference analytical measurements.
 As shown, a wide range of composition was covered due to the
 changes that occurred during winemaking.

Table 2 summarizes the concentration of the phenolic com-
 pounds evaluated considering each variety separately. It can be
 seen, for example, that Cariñena, which is characterized for its

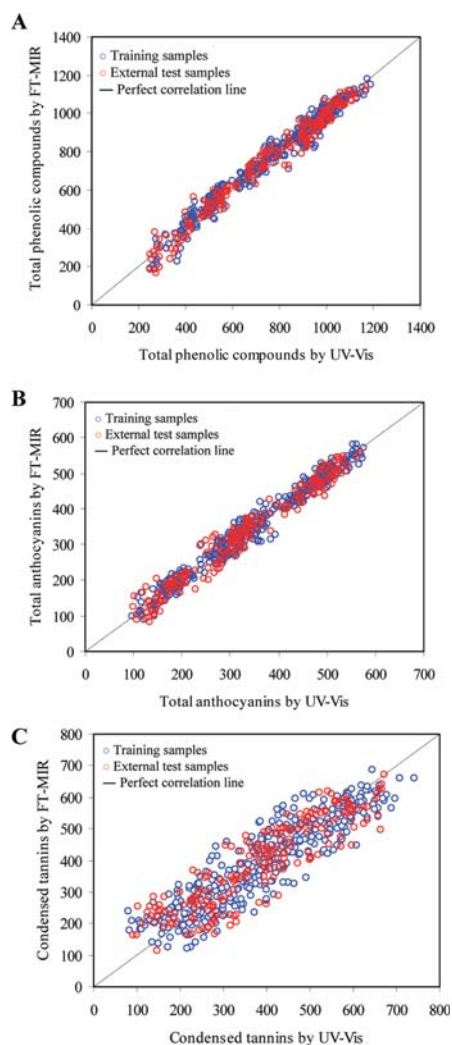


Figure 4. Correlation plot for the prediction of (A) total phenolic compounds (expressed as mg L^{-1} of gallic acid), (B) total anthocyanins (expressed as mg L^{-1} of malvidin-3-glucoside), and (C) condensed tannins (expressed as mg L^{-1} of catechin) using the model for the selected region ($979\text{--}1477\text{ cm}^{-1}$).

low anthocyanic content, presented the lowest TA value, while Merlot and Syrah varieties, which are known for their intense red color, presented the highest TA values. The uncommon low TA value found for a high colored variety such as Cabernet sauvignon was due to the fact that the field zone where this variety grows is very wet, and this high humidity makes a proper ripening process difficult. However, as shown, Merlot and Syrah showed the highest standard deviation (SD) values. This is because these grape varieties are characterized for showing a progressive accumulation of TPC and TA during long ripening periods.

Spectra of Musts and Wines. As expected, the dominating absorption bands belonged to the major components of grape,

i.e., to organic acids, sugars, and also to ethanol generated during the fermentation of sugars. All these bands masked the characteristic IR vibrations of phenolic compounds.

Moreover, it has to be pointed out that, since during the fermentation the contents of these compounds changed, the spectra obtained were different depending on the fermentation stage (Figure 1). These differences could be observed mainly in the $979\text{--}1477\text{ cm}^{-1}$ region where the bands were mainly generated by the contribution of the C–O stretch belonging to the primary alcohol of ethanol and also of the C–O valence vibrations and C–O–C stretching vibrations belonging to carbohydrates, including fructose and glucose. However, although in less extent, the differences can also be detected in the $2800\text{--}2960\text{ cm}^{-1}$ region where the bands were due to the C–H stretch of CH_3 and CH_2 from ethanol. However, since the first region contained much more information about the organic compounds, it was called the fingerprint region.

The negative absorption band at $1500\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$, assigned to water, was due to the automatic subtraction of the aqueous blank absorbance that the instrument carried out prior to the sample analysis. The peak at 2341 cm^{-1} corresponds to the CO_2 released during fermentation. The water and CO_2 absorption regions do not contain useful information, so they are isolated from the spectral data for calibrating purposes.

Because of the great number of absorption bands obtained, it was not easy to find the spectral regions associated with the phenolic compound absorptions. However, there are some studies related to the identification of the spectral regions for the wine tannins, and we also carried out some studies with the spectra from grape extracts enriched with different phenolics of different chemical structure in a previous study. These studies revealed that, when dealing with phenolic compounds, the best spectral regions for calibration purposes ranged from 1168 to 1457 cm^{-1} or from 1133 to 1457 cm^{-1} .

Principal Components Analysis (PCA). We applied a PCA to the full range ($979\text{--}2989\text{ cm}^{-1}$) spectral data set. The results showed that three principal components (PC's) explained the 99.68% of the spectral variation of the samples (first PC 96.78%; second PC 2.41%; and third PC 0.50%).

Figure 2 shows the loadings for the first three PCs, that is, the influence of each wavelength on the variance along this region. The main regions with the highest influence on the spectral variance coincided with the regions where the signal is higher: $979\text{--}1477\text{ cm}^{-1}$ and $1500\text{--}1740\text{ cm}^{-1}$. However, since the latest bands were due to water absorption, we could conclude that the region $979\text{--}1477\text{ cm}^{-1}$ contained almost all the information that characterizes the samples. Indeed, a PCA analysis using this region showed that the first PC explained the 98.76% of variance and that the first three PCs explained the 99.98%.

Moreover, when examining the score plots in the area defined by the first two principal components, it was observed that the samples did not form clusters or groups, but they were distributed all along the space (Figure 3A,B), so global models with total calibration samples could be built. Therefore, we could check that the fingerprint region was very useful for calibration purposes.

Quantitative Analysis: PLS Models. The PLS regression method was used to build four different multivariate calibration models between the FT-MIR spectra (using different wavenumber ranges selections) and the reference values of the TPC, TA, and CT phenolic concentrations, respectively. The four different wavenumber range selections corresponded to the full spectrum

Table 4. Results of PLS Models for Phenolic Compounds in Varietal Musts/Wines Using the Best Calibration Regions^a

cultivar	dependent variable	samples	region (cm ⁻¹)	PLS factors	RMSEC	RMSEC (%)	R ² _{cal}	RMSECV (%)	R ² _{val}	RPD
Merlot	TPC	150	1133–1457	3	27.8	3.1	0.983	3.2	0.982	7.6
	TA	150	1060–1457	6	19.5	4.4	0.956	4.8	0.946	4.3
	CT	143	1060–1457	12	42.3	14.5	0.799	17.3	0.715	1.9
Tempranillo	TPC	120	1168–1457	6	26.8	3.3	0.980	3.7	0.975	6.4
	TA	120	1133–1457	8	11.8	3.9	0.957	4.4	0.946	4.3
	CT	120	979–1477	9	41.6	8.1	0.893	9.6	0.850	2.6
Syrah	TPC	120	979–1477	5	24.3	2.6	0.982	2.8	0.980	7.0
	TA	120	1060–1457	7	16.0	3.5	0.953	3.9	0.941	4.1
	CT	114	1133–1457	11	40.2	13.4	0.815	16.3	0.730	1.9
Cariñena	TPC	90	1168–1457	4	15.5	3.2	0.970	3.7	0.961	5.1
	TA	90	1168–1457	9	6.0	3.7	0.951	4.5	0.927	3.7
	CT	90	979–1477	9	44.0	10.0	0.905	12.5	0.852	2.6
Cabernet sauvignon	TPC	118	1133–1457	2	22.4	3.5	0.981	3.6	0.980	7.1
	TA	117	1133–1457	6	11.2	4.0	0.973	4.4	0.966	5.4
	CT	120	1133–1457	6	45.4	10.4	0.908	11.4	0.889	3.0

^a RMSEC, root mean square error of calibration; R²_{cal}, coefficient of determination of calibration; RMSECV, root mean square error of cross-validation; R²_{val}, coefficient of determination of validation; RPD, residual predictive deviation. TPC, total phenolic compounds (mg gallic acid L⁻¹); TA, total anthocyanins (mg malvidin-3-glucoside L⁻¹); CT, condensed tannins (mg catechin L⁻¹).

(979–2989 cm⁻¹), the fingerprint region (979–1477 cm⁻¹), and the two regions revealed by the previous enrichment experiment:³³ 1133–1457 cm⁻¹ (called the main phenolic region) and 1168–1457 cm⁻¹ (called the selected region). The results of each model are reported in Table 3, and an example of the prediction correlation plots obtained when using the fingerprint region is shown in Figure 4.

TPC Quantification. Among the different models, the ones developed when using the fingerprint and the main phenolic regions presented the best TPC prediction results with highest values of R²_{val} (0.972 and 0.971) and RPD (6.0 and 5.9) and also with lowest RMSEP % values (5.7% and 5.8%), respectively. However, the number of factors to describe the spectral variance when working with the main phenolic region was slightly lower. All these results indicated that when some bands inside MIR spectra were selected more satisfactory prediction results were obtained than when the full spectrum region was used. Moreover, all the models obtained in this study presented lower prediction error values than the ones provided by other researchers on the quantification of total phenolic compounds in red wine fermentations by MIR spectroscopy.²⁹

To verify the absence of bias between the reference values and the predicted values calculated by each model, we proceed with the joint confidence region test. We concluded that the results of the four FT-MIR models were unbiased because the slope and intercept of the four regression lines were not significantly different (with a significance level of 0.05) from 1 and 0, respectively.

TA Quantification. After applying the joint confidence region test to the data of this parameter, we detected a significant bias when using the full range of spectrum. Indeed the models obtained working in this region presented the lowest R²_{val} (0.912) and RPD (3.3) values and the highest RMSEP % (11.8%). On the contrary, the model developed using the fingerprint region showed the highest R²_{val} (0.963) and RPD (5.2) and the lowest RMSEP (7.5%). The models built with the other two regions considered also provided satisfactory prediction results, with R²_{val} = 0.952 and 0.950, RPD = 4.6 and 4.5, and RMSEP % = 8.6% and 8.8%, respectively.

In comparison with those obtained for the TPC results, the RMSEP values obtained for TA predictions were higher. This different behavior could be due to the chemical similarity of anthocyanins with other phenolic compounds, which makes it difficult to find their total relevant spectral region. However, whatever the region selected, whereas for TA the RMSEP_{cor} values obtained were equal to the RMSEP, these values are slightly different for TPC. This different trend is due to the fact that the reference method to quantify TA is more precise and presents a lower standard deviation. In any case, because all the models obtained for both parameters provided RMSEP_{cor} lower than 10%, we considered that the uncertainty values are suitable for predictive purposes.

CT Quantification. The calibration models obtained for CT were the least robust of all. In fact, already in the joint confidence test, we checked that the four models were significantly biased, so they did not provide comparable results with the reference values. Moreover, the models obtained showed higher values of RMSEP % than those for TPC and TA parameters whatever the spectral region selected, so the predictive was not good enough even when we considered the best model, which was obtained with the fingerprint region. This was mainly attributed to the high relative standard deviation (>20%) of the chosen reference analytical method. This lack of accuracy of the reference method can be explained because it is an indirect quantification method and also because wine tannins are structurally very complex and diverse, which implies a poorly repetitive interaction with the methyl cellulose. Therefore, in future studies the reference method should be replaced.

Models for Individual Cultivars. Separate calibrations for each cultivar and spectral region were performed and the models cross-validated to evaluate the predictive ability of the calibration equations. Table 4 shows the models built with the spectral regions that provided the best results for each phenolic parameter and, as can be seen, every variety follows a specific trend.

In comparison with those of the global calibrations, these models showed better RMSEC % values, mainly for TPC and TA (lower than 5.0%). Moreover, less PLS factors were required,

426 which is what is in accordance with the results obtained by other
427 researchers.²⁹

428 From all the results presented, we conclude that the FT-MIR
429 spectrometry combined with multivariate calibration enables an
430 easy and reliable measurement of the content of phenolic com-
431 pounds at the same time, regardless of the stage of skin-contact
432 maceration. Indeed, although the sample matrixes were constantly
433 change during winemaking, the phenolic compounds studied can
434 be well predicted avoiding sample preparation or spectral pre-
435 treatment. This implies a very short analytical time, so the
436 methodology proposed becomes an invaluable tool when a large
437 number of samples have to be analyzed.

438 This allows one to determine the suitability of a grape to get a
439 specific style of wine because the quick establishment of the
440 extraction ending moment can prevent negative sensory attri-
441 butes in red wines.

442 Moreover, the FT-MIR instruments could be applied to predict
443 phenolic compounds on specific cultivars. This would allow one
444 to design specific models to fulfill each winery's requirements.

445 ■ AUTHOR INFORMATION

446 Corresponding Author

447 *Tel: +34977558494. Fax: +34977558446. E-mail: montserrat.
448 mestres@urv.cat.

449 Funding Sources

450 We acknowledge the Spanish Ministry of Science and Technol-
451 ogy (projects AGL2007-61550 and AGL2010-19688) for the
452 financial support.

453 ■ ACKNOWLEDGMENT

454 We are grateful to Joe Luis Villa Medina for his valuable help.

455 ■ REFERENCES

- 456 (1) Ribéreau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D.
457 *Handbook of Enology, Vol 2. The 395 Chemistry of Wine, Stabilization and*
458 *Treatments*; John Wiley & Sons: Chichester, West Sussex, 1999.
- 459 (2) Cheynier, V.; Duenas-Paton, M.; Salas, E.; Maury, C.; Souquet,
460 J.; Sarni-Manchado, P.; Fulcrand, H. Structure and properties of wine
461 pigments and tannins. *Am. J. Enol. Vitic.* **2006**, *57*, 298–305.
- 462 (3) Romero-Cascales, I.; Ortega-Regules, A.; Lopez-Roca, J. M.;
463 Fernandez-Fernandez, J. L.; Gomez-Plaza, E. Differences in anthocyanin
464 extractability from grapes to wines according to variety. *Am. J. Enol. Vitic.*
465 **2005**, *56*, 212–219.
- 466 (4) Pérez-Magariño, S.; González-San José, M. L. Polyphenols and
467 colour variability of red wines made from grapes harvested at different
468 ripeness grade. *Food Chem.* **2006**, *96*, 197–208.
- 469 (5) Rodríguez-Montealegre, R.; Romero Peces, R.; Chacón Vozmediano,
470 J. L.; Martínez Gascuña, J.; García Romero, E. Phenolic compounds in skins
471 and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *J. Food*
472 *Compos. Anal.* **2006**, *19*, 687–693.
- 473 (6) De Andres-De Prado, R.; Yuste-Rojas, M.; Sort, X.; Andres-
474 Lacueva, C.; Torres, M.; Lamuela-Raventos, R. Effect of soil type on
475 wines produced from *Vitis vinifera* L. Cv. Grenache in commercial
476 vineyards. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 779–786.
- 477 (7) Perez-Lamela, C.; Garcia-Falcon, M.; Simal-Gandara, J.; Orriols-
478 Fernandez, I. Influence of grape variety, vine system and enological
479 treatments on the colour stability of young red wines. *Food Chem.* **2007**,
480 *101*, 601–606.
- 481 (8) Gomez-Miguez, M.; Heredia, F. Effect of the maceration tech-
482 nique on the relationships between anthocyanin composition and
483 objective color of Syrah wines. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 5117–5123.

(9) Sacchi, K. L.; Bisson, L. F.; Adams, D. O. A review of the effect of
winemaking techniques on phenolic extraction in red wines. *Am. J. Enol.*
Vitic. **2005**, *56*, 197–206.

(10) González-Manzano, S.; Rivas-Gonzalo, J. C.; Santos-Buelga, C.
Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using
simulated maceration. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 283–289.

(11) Haslam, E. Taste, Bitterness and Astringency. In *Practical*
Polyphenolics. From Structure to Molecular Recognition and Physiological
Action; Haslam, E., Ed.; Cambridge University Press: Cambridge, U.K.,
1998.

(12) Samappito, S.; Butkhop, L. Effect of skin contact treatments on the
aroma profile and chemical components of mulberry (*Morus alba*
Linn.) wines. *Afr. J. Food Sci.* **2010**, *4*, 52–61.

(13) Llaudy, M.D.C.; Canals, R.; Canals, J. M.; Zamora, F. Influence
of ripening stage and maceration length on the contribution of grape
skins, seeds and stems to phenolic composition and astringency in wine-
simulated macerations. *Eur. Food Res. Technol.* **2008**, *226*, 337–344.

(14) Blouin, J. *Techniques d'analyses des moûts et des vins*; Dujardin-
Salleron: Paris, 1992.

(15) Mercurio, M. D.; Damberg, R. G.; Herderich, M. J.; Smith,
P. A. High throughput analysis of red wine and grape phenolics-
Adaptation and validation of methyl cellulose precipitable tannin assay
and modified Somers color assay to a rapid 96 well plate format. *J. Agric.*
Food Chem. **2007**, *55*, 4651–4657.

(16) Sun, D. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and*
Control; Academic Press: Amsterdam, The Netherlands, 2009.

(17) Versari, A.; Parpinello, G. P.; Mattioli, A. U.; Galassi, S.
Determination of grape quality at harvest using Fourier-Transform
Mid-Infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Am. J. Enol. Vitic.*
2008, *59*, 317–322.

(18) Urtubia, A.; Pérez-Correa, J. R.; Meurens, M.; Agosin, E.
Monitoring large scale wine fermentations with infrared spectroscopy.
Talanta **2004**, *64*, 778–784.

(19) Mazarevica, G.; Diewok, J.; Baena, J. R.; Rosenberg, E.; Lendl,
B. On-line fermentation monitoring by Mid-infrared spectroscopy. *Appl.*
Spectrosc. **2004**, *58*, 804–810.

(20) Vonach, R.; Lendl, B.; Kellner, R. High-performance liquid
chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for
the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines.
J. Chromatogr., A **1998**, *824*, 159–167.

(21) Moreira, J. L.; Santos, L. Analysis of organic acids in wines by
Fourier-transform infrared spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *382*,
421–425.

(22) Patz, C. D.; Blicke, A.; Ristow, R.; Dietrich, H. Application of
FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 81–89.

(23) Gorinstein, S.; Weisz, M.; Zenser, M.; Tilis, K.; Stiller, A.; Flam,
I.; Gat, Y. Spectroscopic analysis of polyphenols in white wines.
J. Ferment. Bioeng. **1993**, *75*, 115–120.

(24) Soriano, A.; Pérez-Juan, P. M.; Vicario, A.; González, J. M.;
Pérez-Coello, M. S. Determination of anthocyanins in red wine using a
newly developed method based on Fourier transform infrared spectroscopy.
Food Chem. **2007**, *104*, 1295–1303.

(25) Versari, A.; Boulton, R.; Thorngate, J. The prediction of the
color components of red wines using FTIR, wine analyses, and the
method of Partial Least Squares. *ACS Symp. Ser.* **2004**, *886*, 53–67.

(26) Fernandez, K.; Agosin, E. Quantitative analysis of red wine
tannins using Fourier-transform mid-infrared spectrometry. *J. Agric.*
Food Chem. **2007**, *55*, 7294–7300.

(27) Jensen, J. S.; Egebo, M.; Meyer, A. Identification of spectral
regions for the quantification of red wine tannins with Fourier transform
mid-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 3493–3499.

(28) Cozzolino, D.; Kwiatkowski, M. J.; Parker, M.; Cynkar, W. U.;
Damberg, R. G.; Gishen, M.; Herderich, M. J. Prediction of phenolic
compounds in red wine fermentations by visible and near infrared
spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 73–80.

(29) Di Egidio, V.; Sinelli, N.; Giovannelli, G.; Moles, A.; Casiraghi, E.
NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine
fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* **2010**, *230*, 947–955.

- 552 (30) Wold, S.; Sjöström, M.; Eriksson, L. PLS-regression: a basic
553 tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **2001**, *58*, 109–130.
- 554 (31) Kennard, R. W.; Stone, L. A. Computer aided design of
555 experiments. *Technometrics* **1969**, *11*, 137–148.
- 556 (32) Martens, H.; Naes, T. *Multivariate Calibration*; Wiley: New York,
557 1989.
- 558 (33) Frago, S.; Aceña, L.; Guasch, J.; Busto, O.; Mestres, M.
559 Application of FT-MIR spectroscopy for fast control of red grape
560 phenolic ripening. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (6), 2175–2183.
- 561 (34) Wu, D.; He, Y.; Shi, J.; Feng, S. Exploring near and midinfrared
562 spectroscopy to predict trace iron and zinc contents in powdered milk.
563 *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 1697–1704.
- 564 (35) Williams, P. C. *Implementation of Near-Infrared Technology*;
565 Williams, P. C., Norris, K. H., Eds.; American Association of Cereal
566 Chemists: St. Paul, MN, 2001, pp 145–169.
- 567 (36) Faber, K.; Kowalski, B. Improved prediction error estimates for
568 multivariate calibration by correcting for the measurement error in the
569 reference values. *Appl. Spectrosc.* **1997**, *51*, 660–665.
- 570 (37) Moreira, J. L.; Santos, L. Spectroscopic interferences in fourier
571 transform infrared wine analysis. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *513*, 263–268.
- 572 (38) Boulet, J. C.; Williams, P.; Doco, T. A Fourier transform
573 infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydr. Polym.*
574 **2007**, *69*, 79–85.
- 575 (39) Armenta, S.; Garrigues, S.; de la Guardia, M.; Rondeau, P.
576 Attenuated total reflection-Fourier transform infrared analysis of the
577 fermentation process of pineapple. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *545*, 99–106.
- 578 (40) Bevin, C. J.; Fergusson, A. J.; Perry, W. B.; Janik, L. J.;
579 Cozzolino, D. Development of a rapid “fingerprinting” system for wine
580 authenticity by mid-infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2006**,
581 *54*, 9713–9718.
- 582 (41) Edelmann, A.; Diewok, J.; Schuster, K. C.; Lendl, B. Rapid
583 method for the discrimination of red wine cultivars based on mid-
584 infrared spectroscopy of phenolic wine extracts. *J. Agric. Food Chem.*
585 **2001**, *49*, 1139–1145.
- 586 (42) Schindler, R.; Vonach, R.; Lendl, B.; Kellner, R. A rapid
587 automated method for wine analysis based upon sequential injection
588 (SI)-FTIR spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1998**, *362*, 130–136.

ANEXO 6

Contribuciones a congresos

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011

IX Congreso Nacional de Investigación Enológica. Badajoz, 29 de mayo a 1 de junio de 2007.

Fragoso, S.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J.

- *Estudio y optimización de un método analítico para la estimación de los parámetros de madurez fenólica de la uva tinta* (Póster).
- *Obtención de muestras estables en el tiempo para el seguimiento de la madurez fenólica. Estudio del efecto de la congelación de las uvas tintas sobre el color* (Póster).

Comunicaciones en “Avances en Ciencias y Técnicas Enológicas. Transferencia de Tecnología de la Red GIENOL al Sector Vitivinícola”. Badajoz: Junta de Extremadura. Consejería de Economía y Trabajo; 2007, p 364-366 y 420-422. ISBN: 978-84-690-6060-5.

XIV Congreso Nacional de Enólogos. San Lorenzo de El Escorial, 12 a 14 de junio de 2008.

Fragoso, S.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J.

- *Predicción de los compuestos fenólicos en extractos de uva tinta mediante espectroscopia de infrarrojo medio (FT-MIR)* (Póster y comunicación oral).

XXIV International Conference on Polyphenols; Salamanca, 8 a 11 de julio de 2008.

Fragoso, S.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J.

- *Comparative study of three methods to evaluate phenolic red grape ripening* (Póster).

Comunicación en “Polyphenols Communications 2008” (Vol. 2) Escribano-Bailón, M.T.; González-Manzano, S.; González-Paramás, A.M.; Dueñas, M.; Santos-Buelga, C. (Eds.), p 503-504. ISBN 978-84-691-4334-6.

X Congreso Nacional de Investigación Enológica; Ourense, 3 a 5 de junio de 2009.

Fragoso, S.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J.

- *Método simple de seguimiento del estado de madurez y de caracterización de variedades tintas* (Póster).
- *Determinación de los compuestos fenólicos en extractos de uva tinta mediante espectroscopia FT-IR* (Póster).

Comunicaciones en “Nuevos Horizontes de la Viticultura y Enología”. Vigo: Servizo de Publicacións Campus das Lagoas-Marcosende; 2009. p 599-602. ISBN: 978-84-8158-438-7

VII Colloquium Chemiometricum Mediterraneum; Granada, 21 a 24 de junio de 2010.

Fragoso, S.; Mestres, M.; Boqué, R.; Guasch, J.; Busto, O.

- *Monitoring the phenolic extraction on red winemaking using FT-MIR spectroscopy and multivariate análisis* (Póster).

Comunicación en “E-Proceedings Book of VII Colloquium Chemiometricum Mediterraneum”. Jaén: Ayuda a la Enseñanza S.L.; 2010. Nº P02-21; p 1-5. ISBN: 978-84-937483-4-0.

XI Congreso Nacional de Investigación Enológica; Jerez de la Frontera, 31 de mayo a 3 de junio de 2011.

Fragoso, S.; Mestres, M.; Busto, O.; Guasch, J.

- *Predicción de la calidad del vino tinto a partir de la composición fenólica y el color de las uvas* (Póster).

Comunicación en “Actualizaciones en Investigación Vitícola”. Cádiz: Martínez Encuadernaciones S.L., 2011, p 375-378. ISBN: En trámite.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI
CONTROL DE CALIDAD DE LA MADURACIÓN FENÓLICA DE LA UVA TINTA MEDIANTE
ESPECTROSCOPIA FT-MIR
Sandra Frago García
DL:T-1532-2011