

**Estudio analítico y de la funcionalidad
de la fracción fenólica de *Vitis vinifera*
L. cv. Graciano y su importancia en el
color y la composición del vino**

**Analytical study and functionality of the
phenolic fraction of *Vitis vinifera* L. cv.
Graciano and its importance on the colour
and composition of the wine**



**VNiVERSiDAD
DSALAMANCA**

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

(Grupo de Investigación en Polifenoles)

2011

Raúl Ferrer Gallego



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

DPTO. QUIMICA
ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y
BROMATOLOGÍA
FACULTAD DE FARMACIA

Campus Miguel de Unamuno-37007
Salamanca
Teléf.: 923 294537 – Fax: 923 294515
e-mail: nutr@usal.es

Julián C. Rivas Gonzalo, Catedrático de Nutrición y Bromatología y M^a Teresa Escribano Bailón, Profesora Titular de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Salamanca, directores del trabajo “*Estudio analítico y de la funcionalidad de la fracción fenólica de Vitis vinifera L. cv. Graciano y su importancia en el color y la composición del vino*”, realizado por **Raúl Ferrer Gallego** para optar al título de Doctor, AUTORIZAN la presentación del mismo al considerar que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos.

Salamanca, 20 de octubre de 2011

Julián C. Rivas Gonzalo

M^a Teresa Escribano Bailón

Para la realización de este trabajo se ha contado con las siguientes ayudas institucionales:

- Beca de postgrado para la formación del personal investigador (FPI). (BES-2006-12729) Ministerio de Ciencia y Educación.
- Proyecto de investigación “Influencia de la variedad de uva en la formación y estabilidad de los pigmentos derivados de antocianos en el vino tinto” (AGL-2005-07245-C03-01) Ministerio de Ciencia y Educación.
- Proyecto de investigación “Composición detallada de flavanoles y su relación con la madurez fenólica en la uva tinta para vinificación” (AGL2008-05569-C02-01) Ministerio de Ciencia e Innovación.
- Proyecto de investigación “Funcionalidad Biológica y Tecnológica de los flavonoides de los alimentos” (EDU/894/2009) Junta de Castilla y León.

Agradecimientos

En primer lugar y como no podía ser de otra forma, me gustaría mostrar mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo; Julián Carlos Rivas Gonzalo y María Teresa Escribano Bailón. Ellos fueron quienes depositaron su confianza en mí y me abrieron las puertas de este mundo de la investigación. Su talento y profesionalidad han hecho que todo este tiempo, tan enriquecedor, haya sido un continuo aprendizaje y una experiencia maravillosa.

En segundo lugar quiero agradecer a mis padres, Isidro y Pilar, su esfuerzo y sacrificio por mantener una familia unida, humilde y sencilla. Ellos me enseñaron todos esos valores que una persona nunca debe olvidar y me muestran su apoyo en cada momento.

Quiero dejar reflejado que sin el trabajo diario de mi hermano Miguel Ángel no hubiera sido posible escribir estas palabras. Él ha sido el “motor” de la familia y gracias a él me he podido permitir muchas cosas en la vida.

A mi mejor amigo, mi hermano Pablo, con quien he compartido más de media vida. Siempre ha sido mi ejemplo a seguir y una fuente de motivación e ilustración.

Finalmente doy las gracias a todos los compañeros (algunos ya amigos) del departamento. Una mención especial merece José Miguel, sin su conocimiento y apoyo no hubiera sido posible llevar a cabo muchas de las investigaciones aquí reflejadas.

También quiero agradecer la disponibilidad de Concha y la ayuda, en todo momento, de María José.

En este fantástico departamento he sentido el apoyo y respaldo de todos. Creo que de cada uno de ellos he aprendido algo.

.....del sacrificio de Felipe, de la voluntad de María, de la perseverancia de José Luis, de la pasión de Cristina, de la creatividad de Nacho, de las peculiaridades de Joaquín, de la simpatía de Susana, de la eficacia de María José, de la personalidad de Mati, de la constancia de Montse, de la retirada de Quique, de las obligaciones de Rebeca, de la rebeldía de Hugo, de la timidez de Laura, de la sinceridad de Natalia, del silencio de Juanjo, de la alegría de Jorge, de la estancia de Enrique, de la amabilidad de Concha, de las palabras de Pilar, del humor de Mariaje, de la entereza de Ana, de la sabiduría de Tino, del comportamiento de Rafael, del carácter de César, de la educación de Milagros y de Alfonso....como tal.

También quiero agradecerle a Dr. Freitas haber aceptado mi estancia en su grupo de investigación. A bodegas Roda por su alta implicación en el trabajo y al grupo de Color de Sevilla, con ambos he compartido reuniones muy positivas y enriquecedoras.

A todos...GRACIAS.

A Rebeca

siempre a mi lado

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS GENERALES	- 3 -
SUMMARY	- 7 -

BLOQUE I

I. INTRODUCCIÓN	- 13 -
I.1 Taxonomía y distribución de la vid europea.....	- 13 -
I.2 Aproximación a los orígenes de la viticultura	- 14 -
I.3 La filoxera y la introducción de las vides americanas	- 16 -
I.4 Composición química de la uva	- 18 -
I.5 Clasificación de los compuestos fenólicos	- 20 -
I.6 Biosíntesis de los compuestos fenólicos.....	- 35 -
I.7 Fundamentos de la copigmentación	- 38 -
I.8 Introducción al estudio del color	- 39 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 45 -

CAPÍTULO 1

INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES CLIMÁTICAS EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE UVAS DE *Vitis vinifera* L. cv. GRACIANO

1.1) OBJETIVOS	- 53 -
1.2) JUSTIFICACIÓN.....	- 53 -
1.3) MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 55 -
1.3.1 Localización geográfica	- 55 -
1.3.2 Toma de muestras.....	- 56 -
1.3.3 Extracción compuestos fenólicos de las semillas	- 57 -
1.3.4 Extracción compuestos fenólicos de los hollejos	- 57 -
1.3.5 Análisis HPLC-DAD semillas.....	- 58 -
1.3.6 Análisis HPLC-DAD hollejos	- 58 -
1.3.7 Análisis de espectrometría de masas	- 59 -
1.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 59 -
1.4.1 Condiciones climatológicas.....	- 59 -
1.4.2 Composición fenólica de la semilla durante la maduración	- 61 -
1.4.3 Composición fenólica del hollejo durante la maduración	- 68 -
1.4.4 Estudio de correlación de los compuestos fenólicos de los hollejos	- 80 -
1.4.5 Estudio de correlación de compuestos fenólicos de las semillas.....	- 81 -
1.4.6 Análisis de componentes principales de la composición fenólica del hollejo y de la semilla.....	- 83 -
1.5) CONCLUSIONES	- 86 -

CAPÍTULO 2

INFLUENCIA DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE UVAS DE GRACIANO EN EL COLOR Y COMPOSICIÓN DEL VINO

2.1) OBJETIVOS	- 87 -
2.2) JUSTIFICACIÓN.....	- 87 -
2.3) MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 88 -
2.3.1 Muestras	- 88 -
2.3.2 Análisis colorimétrico	- 88 -
2.3.3 Medida de la copigmentación.....	- 89 -
2.3.4 Elaboración de los vinos.....	- 89 -
2.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 90 -
2.4.1 Parámetros enológicos.....	- 90 -
2.4.2 Influencia de la composición fenólica de las uvas en el vino	- 90 -
2.4.3 Estudio de correlación entre la composición fenólica de las uvas y de los vinos	- 99 -
2.4.4 Estudio colorimétrico del vino	- 101 -
2.4.5 Análisis sensorial de los vinos.....	- 109 -
2.5) CONCLUSIONES	- 110 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 111 -

BLOQUE II

II. INTRODUCCIÓN	- 121 -
II.1 Aspectos generales	- 121 -
II.2 Astringencia y compuestos fenólicos	- 122 -
II.3 Estimación de la astringencia	- 124 -

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS HOLLEJOS DE GRACIANO, DURANTE LA MADURACIÓN Y SU RELACIÓN CON LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

3.1) OBJETIVOS	- 125 -
3.2) JUSTIFICACIÓN	- 125 -
3.3) MATERIAL Y MÉTODOS	- 126 -
3.3.1 Análisis sensorial.....	- 126 -
3.3.2 Análisis quimiométrico	- 127 -
3.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 128 -
3.5) CONCLUSIONES	- 133 -

CAPÍTULO 4

CORRELACIONES ESTADÍSTICAS ENTRE LA COMPOSICIÓN FLAVANÓLICA DE LAS SEMILLAS DE GRACIANO, EL COLOR Y LOS PARÁMETROS SENSORIALES

4.1) OBJETIVOS	- 135 -
4.2) JUSTIFICACIÓN.....	- 135 -
4.3) MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 136 -
4.3.1 Análisis sensorial.....	- 136 -
4.3.2 Análisis colorimétrico	- 137 -
4.3.3 Análisis estadístico	- 137 -
4.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 137 -
4.4.1 Análisis sensorial.....	- 137 -
4.4.2 Análisis HPLC-DAD-MS.....	- 139 -
4.4.3 Análisis colorimétrico	- 142 -
4.4.4 Análisis estadístico.....	- 143 -
4.5) CONCLUSIONES	- 147 -

CAPÍTULO 5

INTERACCIÓN DE LAS PROCIANIDINAS DE SEMILLAS DE UVA CON SEROALBÚMINA BOVINA Y α -AMILASA Y SU RELACIÓN CON LA PERCEPCIÓN DE ASTRINGENCIA

5.1) OBJETIVOS	- 149 -
5.2) JUSTIFICACIÓN	- 149 -
5.3) MATERIAL Y MÉTODOS	- 151 -
5.3.1 Muestreo, extracción y análisis de las semillas	- 151 -
5.3.3 Fundamentos del quenching de fluorescencia	- 151 -
5.3.4 Quenching de fluorescencia y actividad específica del tanino	- 154 -
5.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 156 -
5.4.1 Análisis sensorial.....	- 156 -
5.4.2 Quenching de fluorescencia	- 157 -
5.4.3 Actividad específica del tanino	- 161 -
5.4.4 Análisis HPLC-DAD-MS y espectrofotométrico	- 163 -
5.4.5 Análisis quimiométrico	- 166 -
5.5) CONCLUSIONES	- 168 -
BIBLIOGRAFÍA	- 169 -

BLOQUE III

III.1 OBJETIVOS GENERALES.....	- 179 -
III.2 INTRODUCCIÓN.....	- 179 -
III.3 ESPECTROSCOPÍA NIR.....	- 181 -
III.3.1 Fundamentos	- 181 -
III.3.2 Espectroscopía de reflectancia	- 182 -
III.3.3 Interpretación de espectros en la región NIR	- 185 -
III.3.4 Instrumentación	- 191 -
III.3.5 Estandarización del equipo NIRS.....	- 193 -
III.3.6 Ventajas e inconvenientes de la espectroscopía NIR.....	- 194 -
III.4 QUIMIOMETRÍA.....	- 197 -
III.4.1 Pretratamientos espectrales utilizados	- 203 -
III.4.2 Análisis cualitativo	- 203 -
III.4.3 Análisis cuantitativo	- 208 -

CAPÍTULO 6

DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE HOLLEJOS DE UVA TINTA MEDIANTE NIRS A LO LARGO DE LA MADURACIÓN

6.1) OBJETIVOS	- 215 -
6.2) JUSTIFICACIÓN.....	- 215 -
6.3) MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 216 -
6.3.1 Análisis de referencia	- 216 -
6.3.2 Análisis NIRS hollejos y uvas	- 217 -
6.3.3 Análisis quimiométrico	- 219 -
6.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 220 -
6.4.1 Análisis de referencia	- 220 -
6.4.2 Análisis NIRS hollejos y uvas	- 220 -
6.5) CONCLUSIONES	- 229 -

CAPÍTULO 7

DETERMINACIÓN DE PROCIANIDINAS DE SEMILLAS DE UVA MEDIANTE NIRS A LO LARGO DE LA MADURCIÓN

7.1) OBJETIVOS	- 231 -
7.2) JUSTIFICACIÓN.....	- 231 -
7.3) MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 232 -
7.3.1 Análisis de referencia	- 232 -
7.3.2 Análisis NIRS semillas.....	- 232 -
7.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 234 -
7.4.1 Análisis de referencia	- 234 -
7.4.2 Análisis cuantitativo	- 234 -
7.5) CONCLUSIONES	- 243 -

CAPÍTULO 8

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA TECNOLOGÍA NIRS PARA LOCALIZAR EL VIÑEDO DE ORIGEN UTILIZANDO UVAS ENTERAS, SEMILLAS Y HOLLEJOS

8.1) OBJETIVOS	- 245 -
8.2) JUSTIFICACIÓN.....	- 245 -
8.3) MATERIAL Y MÉTODOS.....	- 246 -
8.3.1 Análisis NIRS.....	- 246 -
8.3.2 Análisis quimiométrico	- 246 -
8.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN	- 246 -
8.4.1 Análisis cualitativo	- 246 -
8.5) CONCLUSIONES	- 253 -
BIBLIOGRAFÍA.....	- 255 -
COMENTARIOS GENERALES Y CONCLUSIONES	- 261 -
GENERAL COMMENTS AND CONCLUSIONS	- 269 -
ANEXOS	- 275 -

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

SUMMARY

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS GENERALES

El patrimonio vitícola español ha sido objeto de muchas modificaciones hasta llegar a ser lo que conocemos hoy. En la gran mayoría de las zonas vitícolas se ha producido una importante reducción del número de cultivares utilizados para vinificación. A lo largo de los años, las exigencias y tendencias del mercado han impuesto una serie de directrices. De esta manera se han creado mercados uniformes donde los cultivares locales apenas tienen cabida. Este hecho acarrea consecuencias negativas en los vinos, subordinados a las directrices de la estandarización.

La pérdida de tipicidad, originalidad, peculiaridad, en definitiva de identidad, es cada día más evidente. Al consumidor cada vez se le ofrecen menos características diferenciadas y/o calidades específicas. Esta conducta es todavía más nefasta desde un punto de vista agronómico, ya que lleva consigo una importante pérdida de biodiversidad agrícola, conocida como "biodiversidad vitícola".

La mayoría de los cultivares han sido sometidos a importantes selecciones clonales, su gran diversidad y por tanto su riqueza han ido disminuyendo hasta el punto de que solamente prevalecen unas decenas de ellos. De un tiempo a esta parte, la recuperación de cultivares autóctonos, que habían perdido terreno en favor de los foráneos o nacionales de cultivo común, empieza a considerarse. Se están llevando a cabo proyectos de recuperación de cultivares autóctonos que se encuentran en peligro de extinción con la finalidad de conservar el patrimonio vitícola de ciertas regiones.

Este trabajo se fundamenta en las uvas y los vinos monovarietales de *Vitis vinifera* L. cv. Graciano. Se trata de un cultivar considerado autóctono de Rioja y Navarra aunque su genealogía no está del todo aclarada. Era el cultivar que reinaba a finales del s. XVIII y ha sido cultivado tradicionalmente en esta zona, especialmente en la Rioja Alta y la zona occidental de la Rioja Alavesa. Actualmente, según datos del consejo regulador, existen 1045 hectáreas lo que representa aproximadamente un 1.7 % del total, siendo la variedad tinta autorizada que menor superficie ocupa. No se cultiva de forma significativa en otras zonas del país. Una de las causas principales por la cual empezó a disminuir su cultivo fue su baja productividad, vulnerabilidad y cierto desconocimiento de sus aptitudes enológicas.

Indudablemente, como se podrá comprobar a medida que se avanza en la lectura de este estudio, nuestro objetivo principal no está relacionado de manera directa con estos aspectos. Sin embargo, desde nuestro punto de vista, este trabajo puede ayudar a revalorizar y dar a conocer el potencial enológico de Graciano.

En una breve descripción de sus capacidades agronómicas podemos apuntar que su cultivo requiere de una importante mano de obra debido a su alto vigor y la gran cantidad de esperguras que produce. Es resistente a algunas plagas y enfermedades criptogámicas como polilla (*Lobesia botrana* Den y Schiff.), oidio (*Uncinula necator* Burr.), mildiu (*Plasmopara viticola* Berl. y de Toni) y podredumbre gris (*Botrytis cinerea* Pers.). Su rusticidad lo hace resistente a suelos muy arcillosos y áridos aunque prefiere los ligeros de composición calcárea. Su foliación a menudo comienza a finales de abril o principios de mayo y el envero en la segunda quincena de agosto o primeros de septiembre. En general, su ciclo es largo y su maduración es tardía. En el clima de Rioja Alta, su mosto es normalmente muy ácido y en ocasiones la planta no consigue llegar a un óptimo de madurez en los años menos calurosos o soleados.

A menudo, en esta zona, la elaboración de vinos monovarietales de Graciano de alta calidad resulta una tarea complicada. En este sentido existe una preocupación por entender mejor el comportamiento de este cultivar en diferentes zonas y conocer cuales son las aptitudes de sus vinos para envejecer. No cabe duda que el contenido y composición fenólica del vino, determinante en dichas aptitudes, es un reflejo de la composición de las uvas en el momento de vendimia.

Los enólogos, dentro de las capacidades de la bodega y bajo su criterio, deben decidir el momento óptimo de cosecha eligiendo los parámetros adecuados a controlar según el producto deseado. Tanto en uvas como en vinos existe un gran número de análisis destinados a conocer mejor la composición fenólica, algunos utilizados desde hace mucho tiempo. A pesar de la amplia información con la que pueden contar, frecuentemente se generan resultados erráticos que en ocasiones incluso les desorientan.

La determinación del momento óptimo de vendimia es uno de los puntos críticos dentro de la elaboración de un vino puesto que son muchos los factores que deben tenerse en cuenta. Gracias a las diferentes formas analíticas (químicas, físicas y sensoriales) se puede manejar cierta información de utilidad para la toma de decisiones.

Sin embargo y a pesar de la gran cantidad de datos que se pueden llegar a recopilar, todavía hoy, la determinación de la fecha de vendimia es motivo de preocupación sobre todo en cuanto a "madurez fenólica" se refiere. El seguimiento de la madurez tecnológica, determinada mediante el contenido en azúcares y acidez del mosto, peso medio de la baya, etc., permite el seguimiento de la evolución de la maduración pero, al no atender a su estado fenólico, no permite determinar el momento óptimo de la vendimia en lo que a color, astringencia y amargor se refiere. Es bien sabido que el control de estos parámetros es muy importante cuando se trata de vinos destinados al envejecimiento.

En la actualidad el tema aún está científicamente abierto y es necesario seguir profundizando en el mismo con el objetivo de llegar a establecer los procedimientos físicos, químicos y sensoriales que permitan un conocimiento lo más profundo posible del estado fenólico de la uva en el momento de cosecha.

Se trata de una tarea compleja, debido a que las uvas contienen una amplia gama de compuestos fenólicos que además se comportan de forma diferente a lo largo de la maduración según parámetros ambientales, genéticos y culturales.

Dentro de este marco, se plantea el siguiente trabajo para el cual ha sido necesario aunar un amplio abanico de técnicas analíticas. Se han utilizado desde técnicas más novedosas y complejas a técnicas más consolidadas y sencillas.

La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS), la cromatografía líquida de alta resolución, la espectrometría de masas, la fluorimetría, la espectrofotometría, la colorimetría triestímulo, el análisis sensorial y ciertas herramientas quimiométricas y estadísticas han sido necesarias para desarrollar este trabajo.

La finalidad buscada es un mayor acercamiento al conocimiento de la "madurez fenólica" y a las formas posibles de determinarla. Los objetivos concretos están descritos detalladamente en cada uno de los capítulos que comprenden esta memoria, la cual ha sido estructurada en tres bloques.

En el primer bloque se lleva a cabo un estudio pormenorizado de la composición fenólica de uvas y de vinos de Graciano. Las técnicas analíticas usadas son

principalmente HPLC-DAD-MS y espectrofotometría junto con el análisis colorimétrico. Se divide en dos capítulos:

- **Capítulo 1.** Influencia de las condiciones climáticas en la composición fenólica de uvas de *Vitis vinifera* L. cv. Graciano.
- **Capítulo 2.** Influencia de la composición fenólica de uvas de Graciano en el color y composición del vino.

La segunda parte estudia la relación entre los parámetros organolépticos de las uvas y su composición fenólica. Así como la capacidad de los flavanoles de las semillas para precipitar proteínas. En este apartado se emplea principalmente el análisis sensorial, el fluorimetría para poder desarrollar los siguientes capítulos:

- **Capítulo 3.** Análisis sensorial de hollejos de Graciano durante la maduración y su relación con la composición fenólica.
- **Capítulo 4.** Correlaciones estadísticas entre la composición flavanólica, el color y los parámetros sensoriales de las semillas de Graciano.
- **Capítulo 5.** Interacción de las procianidinas de semillas de uva con seroalbúmina bovina y α -amilasa y su relación con la percepción de astringencia.

Finalmente, el tercer bloque está dedicado a la utilización de la tecnología NIRS, con la finalidad de obtener métodos rápidos para determinar la composición fenólica de uvas y hollejos. También se pone de manifiesto la viabilidad de dicha técnica con fines cualitativos.

- **Capítulo 6.** Determinación de la composición fenólica de hollejos de uva tinta mediante NIRS a lo largo de la maduración.
- **Capítulo 7.** Determinación de procianidinas de semillas de uva mediante NIRS a lo largo de la maduración.
- **Capítulo 8.** Estudio comparativo de la tecnología NIRS para localizar el viñedo de origen utilizando uvas enteras, semillas y hollejos.

SUMMARY

The general aim of this PhD Thesis has been to gain further insight into the concept of "phenolic maturity" and to evaluate its influence on the organoleptic properties of skins and seeds from grapes and on the wines thus obtained. Moreover, a new way for determining the phenolic compounds of grapes has been developed.

For better understanding, this work has been separated into three sections.

Section I (chapters 1 and 2) is devoted to the study of the influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes and wines. The analytical techniques mainly used in this section were HPLC-DAD-MS, spectrophotometry, and colorimetric analysis in the CIELAB color system.

Chapter 1

Influence of climatic conditions on the phenolic composition of Vitis vinifera L. cv. Graciano.

The aim of this first chapter was to evaluate the influence of different climatic conditions on the phenolic composition of grape skins and seeds of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano -an autochthonous cultivar from the Rioja and Navarra regions (Spain) - during ripening in a separate way. In a second line of enquiry, the results obtained from the analysis of the phenolic composition, oenological parameters at harvest, and climate conditions during the vegetative stage were evaluated in order to detect relationships among them.

Chapter 2

Influence of the phenolic composition of Graciano grapes in wine composition and colour.

The purpose of this chapter was to determine the influence of the phenolic composition of Graciano grapes in the composition and color of wines obtained from them. The study was conducted for two consecutive vintages. Five wines were produced from grapes with different phenolic maturities, using the same winemaking techniques. The evolution of the colour and the phenolic composition of these wines were evaluated from the end of the alcoholic fermentation to bottling.

In **Section II** (chapters 3, 4 and 5), the relationship between the organoleptic attributes of grapes and their phenolic composition was evaluated. Moreover, the capacity of grape seed flavanols to bind proteins was studied. For this, sensory analysis, fluorescence quenching, HPLC-DAD-MS and chemometric tools were used.

Chapter 3

Multivariate analysis of sensory data of Vitis vinifera L. cv. Graciano during ripening. Correlation with the phenolic composition of the grape skins.

The aim of this part of the study was to evaluate the sensory changes in Graciano grape skins occurring during ripening and to investigate possible correlations between the sensory parameters and the phenolic composition of these grape skins. For this, sensory analyses of the grape skins were performed using a trained panel, and the results were correlated with the phenolic composition of grape skins, which were analysed by HPLC-DAD-MS.

Chapter 4

Statistical correlation between flavanolic composition, colour, and sensory parameters in grape seeds during ripening.

The aim of this work was to determine the correlations between sensory analysis, the colour and the content of the main flavanols present in seeds and to determine which flavanolic compounds or family of flavanolic compounds best explain the variations occurring in these parameters. With this objective, the flavanolic composition of grape seeds with different degrees of maturity was analysed and the results obtained were correlated with CIELAB colour parameters, perceived colour, seed hardness, tannic intensity, and astringency. Multiple linear regression analysis was also performed.

Chapter 5

Interaction of grape seed phenolic compounds with Bovine Serum Albumin (BSA) and α -amylase and their relationship with the perception of astringency.

The aim of this part was to evaluate the capacity of grape seed procyanidins to bind to proteins and how the different degrees of seed ripeness affect this interaction. For this, BSA and α -amylase were used and fluorescence quenching and nephelometry

techniques were applied. Moreover, a sensory analysis was performed in order to evaluate the levels of astringency and tannic intensity in grape seeds at two different developmental stages.

Finally, **Section III** (chapters 6, 7 and 8) focuses on the use of NIRS technology. The aim was to obtain rapid methods to determine the phenolic composition of grape seeds and skins. The feasibility of this technology for qualitative purposes was confirmed.

Chapter 6

Determination of phenolic compounds in grape skins using Near Infrared Spectroscopy.

The aim of this part of study was to evaluate the potential of NIRS technology to determine the concentrations of the main phenolic families and the total of phenolic compounds in grape skins. The study was carried out in skins separated from the flesh and in intact grapes. Moreover, a comparison between fibre-optic probe attachment and classic attachments was performed.

Chapter 7

Feasibility Study of the use of Near Infrared Spectroscopy to determine flavanols in grape seeds.

The purpose of this chapter was to evaluate the potential of NIRS technology to determine the main flavanols present in seeds. Moreover, the potential of this technique to obtain qualitative information related to the samples was studied. Regarding this, the feasibility to discriminate between possible vineyards of origin was evaluated.

Chapter 8

A comparative study to distinguish the vineyard of origin by NIRS using whole grapes, skins and seeds.

The aim of this study was to evaluate the potential of near infrared technology using different parts of grapes (i.e. grape skins and seeds) to specify their vineyard of origin and to determine which one, among the three presentations, provided the best results. Furthermore, in order to obtain information about the chemical basis of the

Summary

discrimination attention was paid to the relationship between the spectral variability and the phenolic compounds present in grape skins and seeds.

BLOQUE I



Vitis vinifera L.

(Swedish Museum of Natural History, S-Linn 99.17)

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Taxonomía y distribución de la vid europea

La familia *Vitaceae* está intergrada por 12 géneros y alrededor de 700 especies (1), distribuidas mayoritariamente por las zonas de clima tropical, subtropical y mediterráneo.

El género *Vitis* L. comprende un número variable de especies, que según autores varía entre 30 y 65 (1-4). Los táxones atribuidos a *Vitis* están agrupados en 2 secciones (5) o subgéneros (6). La sect. *Muscadinia* Planch. está compuesta por tres táxones norteamericanos (*V. rotundifolia* Michx., *V. munsoniana* J.H. Simpson ex Munson, y *V. popenoei* J.L. Fennell), y la sect. *Vitis* propiamente dicha, también reconocida como *Euvitis* Planch., abarca al resto de especies del género. Algunos autores (5) aportan datos sobre la elevada independencia entre estos dos grupos, hasta el punto de ser tratados (7) como géneros diferentes.

La única especie autóctona europea es *V. vinifera* L., si bien Webb (8) reconoce la presencia de hasta 7 especies alóctonas naturalizadas y otras 2 asilvestradas de manera muy puntual. Tales especies, conforme a la nomenclatura utilizada por el citado autor, son: *V. aestivalis* Michx., *V. berlandieri* Planch., *V. coignetiae* Pulliat ex Planch., *V. cordifolia* Lam., *V. labrusca* L., *V. rotundifolia* Michx. y *V. rupestris* Scheele, y por otro lado: *V. thunbergii* Siebold & Zucc. junto a *V. riparia* Michx. L., también conocida bajo el sinónimo de *V. vulpina*.

De estas 7 especies, 5 son de origen americano y 2 de origen asiático (*V. coignetiae* y *V. thunbergii*). Otras referencias a *Vitis* asilvestradas en Europa corresponden a *V. inconstans* Miq., especie más comúnmente conocida bajo el nombre de *Parthenocissus tricuspidata* (Siebold & Zucc.) Planch., planta ampliamente utilizada como ornamental.

En la siguiente figura se puede observar la morfología y el perfil foliar de hojas-modelo según Galet (9). Las hojas de *V. riparia* generalmente tienen tamaños superiores, entre 25-30 cm. Las hojas de *V. vinifera* son pentalobuladas y también de hoja grande dependiendo de los cultivares.

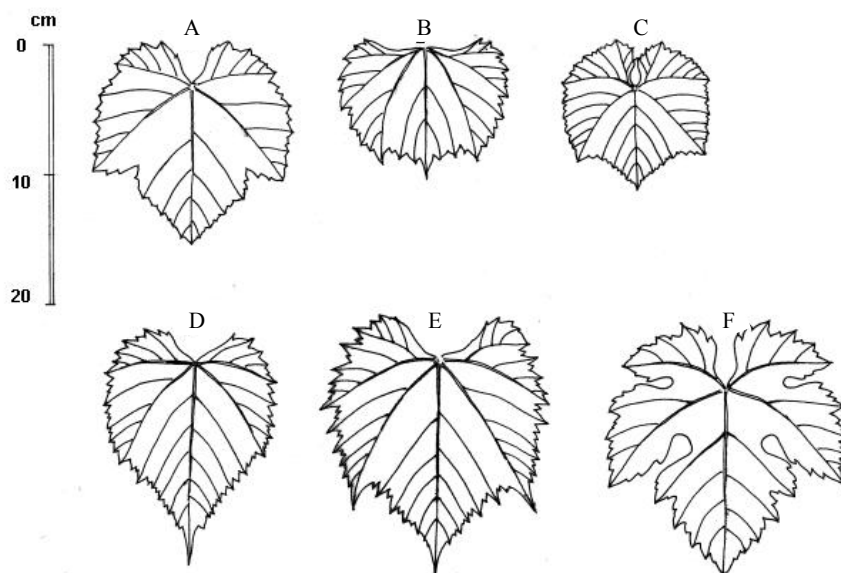


Figura I.1. Tipos foliares de hojas-modelo de las principales especies de *Vitis*. **A:** *V. labrusca*; **B:** *V. rupestris*; **C:** *V. berlandieri*; **D:** *V. cordifolia*; **E:** *V. riparia* (tamaño reducido 1/3); **F:** *V. vinifera* subsp. *vinifera*; adaptado de Galet (1956 y 1988).

I.2 Aproximación a los orígenes de la viticultura

La distribución de la vid silvestre euroasiática ocupa diversas áreas disjuntas desde la Península Ibérica hasta el macizo del Hindu Kush. Algunas de sus poblaciones también aparecen en ciertas zonas del Magreb.

Sus poblaciones naturales son fundamentalmente dioicas, si bien pueden encontrarse en ellas algunos individuos hermafroditas. Parte de estos últimos fueron seleccionados y domesticados por el hombre para dar origen a los actuales cultivares. Por tal motivo, la vid silvestre constituye un parental dioico de las variedades empleadas para la vinificación, para consumo en fresco o para pasificación, que se incluyen en *Vitis vinifera* L. subsp. *sativa* (DC.) Hegi.

La domesticación ha constituido un proceso evolutivo artificial, guiado por los intereses humanos. Efectivamente, la presión selectiva realizada por el hombre en la

elección de las plantas permitió ir favoreciendo en las castas de cultivo aquellos caracteres útiles en la productividad, como son tamaño de la baya, riqueza de azúcar, adaptación a la zona geográfica, etc., (10).

Parece ser que las pruebas carpológicas y arqueológicas apuntan hacia que los primeros signos de domesticación tuvieron lugar precozmente en la región sirioanatólico-noroeste-mesopotámica y, a continuación, en la Transcaucásica; área a la que algunos autores denominaron el *Triángulo de la uva fértil* (**Figura I.2**) (11, 12). Ese origen monocéntrico de la vid europea en la región Transcaucásica y de Oriente Medio ha sido defendida por otros autores, como Zohary y Hopf (1975) y Olmo (1976) (13, 14), en una época en la que no se contaba con el auxilio de las técnicas de análisis genético. Por su parte, McGovern *et al.* (15, 16) también sustentan que hay suficientes evidencias arqueológicas para asegurar que la primera región donde aparecieron los conatos de domesticación en la vid es la zona Transcaucásica y la Península de Anatolia.

Es lo que se ha denominado *Hipótesis de Noé*, basada en la leyenda bíblica del patriarca Noé, que después del Diluvio Universal plantó una vid en el Monte Ararat, localizado en la península de Anatolia, en la zona central del citado *Triángulo de la uva fértil* de Vavilov, donde todavía se conservan formas intermedias entre vid silvestre y cultivada, en la franja boscosa comprendida entre el Caúcaso y Kachetia (10).

En el Génesis (IX, 20-21) puede leerse:

Noé, que era labrador, comenzó a labrar la tierra y plantó una viña. Y bebiendo de su vino quedó embriagado...

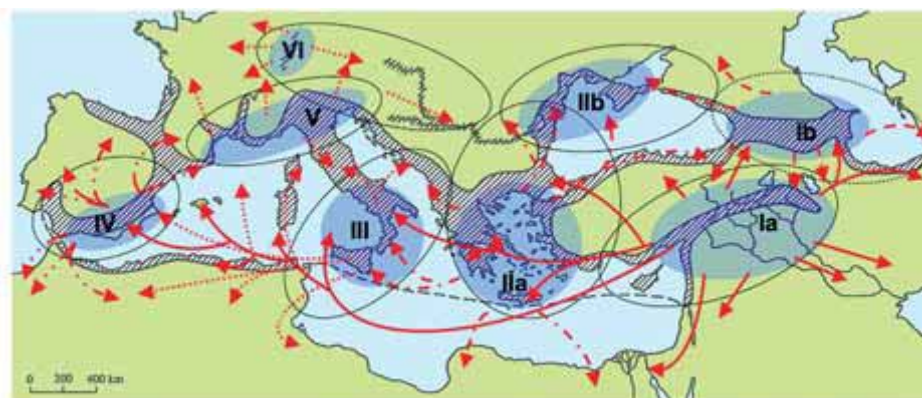


Figura I.2. Cuadro cronológico del inicio de la vid cultivada (**Ia**: Región Anatólica circummesopotámica, 6^o-5^o milenio a.C.; **Ib**: Transcaucásica, 6-4^o milenio a.C.; **IIa**: Sur de los Balcanes y región del Egeo, 5^o-4^o milenio a.C.; **IIb**: Circumpóntica, 4^o-3^o milenio a.C.; **III**: Italia meridional, 3^o-2^o milenio a.C.; **IV**: Sudeste de la Península Ibérica, 2^o-1^{er} milenio a.C.; **V**: Italia septentrional, 1^{er} milenio a.C.; **VI**: Europa central, época del Imperio Romano) adaptado de Forni 2006.

A medida que avanza la aplicación de los análisis basados en microsatélites de ADN nucleares y cloroplásticos, cobra cada vez más cuerpo la teoría policéntrica de la domesticación de la vid. Ésta, que no es excluyente de la anterior, sugiere que el proceso de domesticación se repetiría en otras zonas geográficas; así, Zeven & Zhukosky (1975), atendiendo a consideraciones fitogeográficas propusieron tres centros primarios de domesticación: Oriente Medio, Asia Central y región mediterránea (17).

I.3 La filoxera y la introducción de las vides americanas

La filoxera arrasó los viñedos ibéricos a finales del siglo XIX, convirtiendo a *V. vinifera* en una especie en verdadero peligro de extinción (4, 18). Detectada inicialmente en Francia hacia 1862, su entrada en la Península Ibérica se data hacia 1869, si bien su expansión masiva se desarrolló a partir de 1899, no cesando hasta las postrimerías de la Guerra Civil española (19-21).

El homóptero causante de los daños (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch = *Phylloxera vitifoliae* Fitch = *Ph. vastatrix* Planch. = *Viteus vitifolii* Fitch), procedente del continente americano, habría participado en un amplio proceso de selección natural sobre las especies de *Vitis* del Nuevo Mundo, hasta el punto de que la mayoría resultan ser resistentes a su ataque (3, 4, 9), ello propició el progresivo empleo de tales especies importadas como portainjertos para la vid europea a partir del último tercio del siglo XIX (9, 18, 22, 23).

La entrada de especies americanas se vio además favorecida por la capacidad de algunas de ellas para la producción de vino, ayudando temporalmente a suplir la escasez de este producto en Europa, en tanto las razas tradicionales de vid europea eran salvadas gracias al injerto; entre estas especies destacó por su mayor extensión el cultivo de *Vitis labrusca* L., de la que aún se conservan reducidas extensiones hacia el SE de Francia y N de Italia (3, 9, 22).

El último cuarto del siglo XIX y la primera mitad del XX conocieron una ferviente actividad investigadora en el cultivo de la vid, hasta el punto de consolidar la existencia de la Ampelografía, rama de la agronomía dedicada al estudio y descripción de las Vitáceas, tanto silvestres como cultivadas o producidas por el hombre mediante hibridación o selección; esta disciplina, que contó con numerosos expertos, fundamentalmente franceses, alemanes e italianos, invirtió buena parte de su tiempo en la descripción varietal de las vides, sus híbridos y portainjertos, siguiendo el ejemplo que había iniciado a principios del siglo XIX el botánico valenciano Simón de Rojas Clemente y Rubio (24).

A pesar de la amplia variedad de especies de *Vitis*, sólo un reducido número de ellas han sido objeto de introducción y de asentamiento exitoso para cultivo en Europa occidental. Galet (9) destaca sólo 10 especies americanas preferentemente utilizadas en la producción de portainjertos en Europa occidental, indicando además que algunas de ellas han caído en un justificado desuso por su mala adaptabilidad.

I.4 Composición química de la uva

Las uvas y mostos contienen varios constituyentes: agua, glúcidos, prótidos, lípidos, elementos minerales y compuestos fenólicos. Algunas de estas sustancias tienen una fuerte incidencia organoléptica, como los polifenoles, los aromas y (en menor medida) los compuestos nitrogenados, los cuales participan significativamente en la caracterización de cada cultivar. Los ácidos orgánicos, las sustancias minerales, las vitaminas, los lípidos, aunque en débiles concentraciones, intervienen de una manera determinante en los equilibrios gustativos, aromáticos y nutritivos de la uva y del vino. Estos compuestos tienen una fuerte influencia sobre las reacciones químicas, fisicoquímicas y bioquímicas que se presentan en la maduración de la uva y en la elaboración y evolución del vino. En la siguiente tabla se presenta la composición de las diferentes partes de la uva según Cabanis y colaboradores (25).

El desarrollo de la baya y el crecimiento de la planta están estrechamente relacionados con la disponibilidad de agua. Es el constituyente más abundante y es absorbida por las raíces desde el suelo en un 99%. Un déficit hídrico provoca una disminución del tamaño de las bayas inhibiendo tanto la división como la expansión celular (26).

Los azúcares son los segundos compuestos más abundantes del mosto (100-350 g/L), los mayoritarios son glucosa y fructosa. Durante el invierno existen concentraciones de glucosa que doblan las de fructosa pero durante la maduración sus concentraciones se igualan, finalizando con concentraciones levemente mayores de fructosa. El contenido en sacarosa es aproximadamente de 1 a 3 g/L, se sintetiza en las hojas y migra hacia las bayas donde se hidroliza en una molécula de glucosa y otra de fructosa. También se pueden encontrar azúcares, no fermentables, como arabinosa, xilosa, ramnosa, maltosa y rafinosa entre otros (27). En los racimos verdes pueden existir pequeñas concentraciones de almidón.

Los ácidos orgánicos más importantes de la uva son el málico y el tartárico que pueden llegar a representar casi el 94% del total de los ácidos orgánicos de la planta. Existen otros en cantidades mucho menores como el succínico, láctico, acético, y cítrico. La cantidad de ácidos orgánicos, la relación málico/tartárico y la cantidad de

potasio presente, determinan los valores de pH, parámetro fundamental en los procesos de vinificación.

Tabla I.1. Composición del racimo de uva en % sobre peso fresco.

		<u>%</u>	
Raspón 3-6%		Agua	78-80
		Compuestos glucídicos	0.5-1.5
		Ácidos orgánicos	0.5-1.6
		Taninos	2-7
		Minerales	2-2.5
		Compuestos nitrogenados	1-1.5
Baya 94-97%	Hollejo 7-12%	Agua	78-80
		Ácidos orgánicos	0.8-1.6
		Taninos	0.4-3
		Antocianos	0-0.5
		Compuestos nitrogenados	1.5-2
		Minerales	1.5-2
		Ceras	1-2
		-	-
	Semilla 0-6%	Agua	25-45
		Compuestos glucídicos	34-36
		Taninos	4-10
		Compuestos nitrogenados	4-6.5
		Minerales	2-4
		Lípidos	13-20
	Pulpa (mosto) 83-91%		
		Agua	700-850
		Compuestos glucídicos	100-350
		Poliscáridos	3-5
		Ácidos orgánicos	9-27
		Compuestos fenólicos	0.5
		Compuestos nitrogenados	4-7
		Minerales	0.8-2.8
	Vitaminas	0.25-0.8	

Dentro de los elementos minerales, el potasio es muy importante no sólo por su efecto en el pH, sino también porque es esencial en el desarrollo y crecimiento de las bayas. Controla la entrada de cationes, aniones y azúcares en la membrana plasmática, regula el potencial osmótico manteniendo la turgencia de la baya y participa en la activación enzimática. Su concentración puede estar cerca de los 900 mg/L (28).

Otro elemento esencial para la vid es el nitrógeno, que se puede encontrar en forma mineral (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^-) u orgánica (aminoácidos libres, proteínas y otros compuestos nitrogenados como urea, etilcarbamato y ácidos nucleicos). La cantidad varía entre 100 y 1200 mg/L, y usualmente el vino tinto contiene cantidades mayores que el vino blanco (26). El nitrógeno mineral en forma de NH_4^+ puede representar el 80% del nitrógeno total antes del envero pero después de la maduración disminuye al 5-10% y aún más después de la fermentación alcohólica. La concentración de NO_3^- y NO_2^- son casi despreciables, aproximadamente entre 0.5-2 mg/L y 5-40 $\mu\text{g/L}$, respectivamente (28). El mosto tiene cerca de 30 aminoácidos que representan cerca del 20-50% del nitrógeno total. Son siete los más representativos: arginina, prolina, glutamina, alanina, glutamato, serina y treonina (26). Los aminoácidos, además de jugar un papel en el desarrollo de levaduras y bacterias, interfieren en la sensación de acidez debido a su capacidad tamponante. Se ha observado que el consumo de amonio por parte de las levaduras produce una mayor acidificación del medio que el consumo de aminoácidos (29). Las proteínas se encuentran en el vino en concentraciones entre 15 y 230 mg/L y su presencia depende de la fertilización nitrogenada sobre la planta, de la temperatura de fermentación y del contacto con bacterias y levaduras. Pueden contribuir a problemas sensoriales en vinos blancos, como la quiebra proteica, ocasionada por la insolubilización de las proteínas por efecto de la temperatura.

Asimismo, en el vino encontramos sustancias odorantes que se originan a partir del metabolismo de la baya, de fenómenos bioquímicos de oxidación e hidrólisis, del metabolismo fermentativo y de reacciones químicas o enzimáticas durante la crianza en barrica o botella. Las concentraciones pueden oscilar desde algunos mg/L a unos pocos ng/L (30).

Mención especial merecen los compuestos fenólicos, ya que son el objeto principal de este estudio.

I.5 Clasificación de los compuestos fenólicos


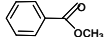
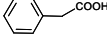
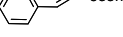



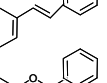
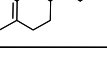
Las plantas sintetizan un gran número de compuestos orgánicos que tradicionalmente se han clasificado como metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios son compuestos que desempeñan papeles esenciales asociados

fundamentalmente a la fotosíntesis, la respiración y el desarrollo de la planta. Los metabolitos secundarios, que en algunas especies se encuentran en altas concentraciones, han sido ignorados durante mucho tiempo pero su función en la planta (protección frente a herbívoros, atrayentes de polinizadores, dispersión animal de las semillas, agentes alelopáticos, protectores frente a la luz UV, etc.) ha hecho que se muestre atención hacia ellos (31).

Dentro de los metabolitos secundarios, los compuestos fenólicos representan uno de los grupos más importantes. El interés por su estudio es creciente ya que su elevada reactividad está ligada a potenciales efectos beneficiosos sobre la salud como propiedades anticancerígenas, cardioprotectoras, antiinflamatorias, antienvjecimiento y antimicrobianas (32).

Estos compuestos se caracterizan por tener al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos unidos. Están ampliamente representados en el reino vegetal, existiendo más de 8000 estructuras fenólicas diferentes, desde simples hasta muy complejas (33). Pueden clasificarse basándose en el número y disposición de sus átomos de carbono (**Tabla I.2**).

Tabla I.2. Estructura básica de los compuestos fenólicos.

Nº de carbonos	Esqueleto	Clasificación	Estructura básica	Ejemplo
7	C6-C1	Ácidos hidroxibenzoicos		Gálico
8	C6-C2	Acetofenonas		Galacetofenona
8	C6-C2	Ácidos fenilacéticos		<i>p</i> -Hidroxifenil-acético
9	C6-C3	Ácidos hidroxicinámicos		<i>p</i> -Cumárico
9	C6-C3	Cumarinas		Esculetina
10	C6-C4	Naftoquinonas		Juglona
13	C6-C1-C6	Xantonas		Mangiferina
14	C6-C2-C6	Estilbenos		Resveratrol
15	C6-C3-C6	Flavonoides		Naringenina

De estos compuestos, los flavonoides representan el grupo más numeroso. Como se señala en la **Tabla I.2**, su esqueleto básico posee 15 átomos de carbono (estructura C6-C3-C6). En su nivel más simple consta de dos anillos fenilo (anillos A y B) unidos por un esqueleto de tres átomos de carbono que, generalmente, se encuentra formando un anillo heterocíclico (anillo C). Las principales subclases de los flavonoides son: flavonas, flavan-3-oles, flavonoles, flavanonas, isoflavonas, calconas y antocianidinas (**Figura I.3**). Dentro de cada una de estas clases los distintos compuestos se diferencian entre sí por los patrones de sustitución sobre el esqueleto elemental. También existen otros compuestos flavonoides minoritarios como dihidroflavonoles, auronas, dihidrocalconas y flavan-3,4-dioles. Algunos flavonoides se encuentran glicosilados, los azúcares y los grupos hidroxilos aumentan su solubilidad en el agua mientras que otros sustituyentes como grupos metilo o isopentilo los hacen más lipófilos.

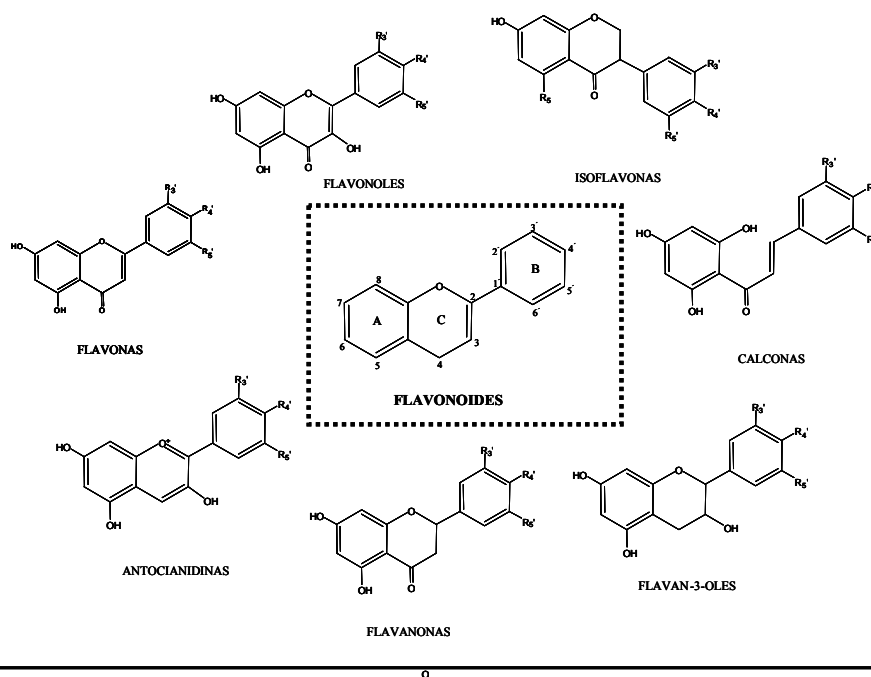


Figura I.3. Estructuras básicas de los principales grupos de flavonoides.

FLAVONOLES

Los flavonoles son posiblemente los compuestos flavonoides más abundantes en el reino vegetal, exceptuando hongos y algas. Se caracterizan por la presencia de una insaturación entre los carbonos C₂ y C₃ del anillo C y presentan un grupo hidroxilo en posición 3 de dicho anillo, que los diferencia de las flavonas (**Figura I.3**). Muchos de los flavonoles pueden encontrarse en forma glicosilada y/o acilada. La posición más frecuentemente implicada en la glicosilación es la 3, aunque también pueden darse en 5 y 7. El azúcar más abundante es la glucosa, aunque también aparecen xilosa, ribosa, fructosa y ramnosa o diglucósidos como rutinosa. Los ácidos implicados en las acilaciones son *p*-cumárico, ferúlico, caféico, *p*-hidroxibenzoico, gálico, acético y malónico.

Los flavonoles de la uva se encuentran principalmente en el hollejo (34) aunque también se han detectado en pulpa (35) y hojas, pero no en semillas (36). En uvas se

encuentran principalmente como heterósidos de quercetina y miricetina y en menor medida de kaempferol e isorhamnetina (37). Los mayoritarios de las uvas son el 3-glucósido de quercetina y el 3-glucurónido de quercetina. (34, 38-41). Durante la vinificación, se hidroliza parcialmente y pueden encontrarse en el vino como aglicones libres. La acumulación de estos compuestos en las uvas depende en gran medida de su exposición a la luz (42-44).

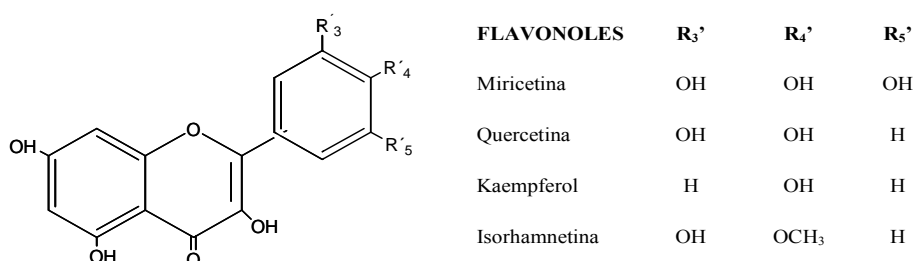


Figura I.4. Estructura básica de los flavonoles mayoritarios.

El contenido de flavonoles de la uva depende de su estado de desarrollo y de factores genéticos y ambientales. El perfil de flavonoles y dihidroflavonoles se ha señalado que podría ser usado en la caracterización taxonómica del cultivar (45, 46). En este sentido se pensaba que los cultivares blancos no poseían ningún flavonol metilado pero se han detectado pequeños contenidos de isorhamnetina glucósido en hollejos (36). Los derivados de laricitrina, miricetina y siringetina parecen ser específicos de cultivares tintos (46), aunque se ha detectado miricetina en algunas Muscadinias (*Vitis rotundifolia* Michx.) (47). El contenido en flavonoles, es generalmente superior en cultivares blancos que en tintos (36, 46).

Se ha puesto de manifiesto que el contenido de flavonoles está muy influido por la exposición a la luz solar (39, 43, 44), de acuerdo con su papel como protectores frente a la radiación ultravioleta (42-44).

Desde un punto de vista organoléptico, estos compuestos tienen cierta influencia en el amargor de los vinos (48) pero también pueden influir en la sensación de astringencia

(49). Además contribuyen al color del vino tinto y a su estabilización debido a que se comportan como buenos copigmentos (50, 51).

FLAVAN-3-OLES

Los flavan-3-oles son compuestos fenólicos hidrosolubles con grados de polimerización variable y que, en general, tienen capacidad para precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas. Son el grupo más común de taninos que existe en nuestra dieta. Se consideran ingredientes funcionales, con efectos beneficiosos para la salud y se encuentran en frutas, vegetales y productos derivados (52).

La estructura de estos compuestos se representa en la **Figura I.5**. Poseen dos carbonos quirales, en las posiciones 2 y 3 que dan lugar a la existencia de derivados 2R, 3S (*trans*) y sus correspondientes isómeros 2R, 3R (*cis*), en cuyo caso se antepone al nombre el prefijo *epi-* (epicatequina, epigalocatequina, etc). En raras ocasiones la configuración del carbono 2 es S y en este caso se antepone el prefijo *entio-* (*ent-*). La ausencia de prefijo indica la existencia de la configuración 2R, 3S. Los flavan-3-oles se pueden encontrar en la naturaleza como tales o como derivados metilados, glicosilados o como ésteres, por ejemplo con el ácido gálico.

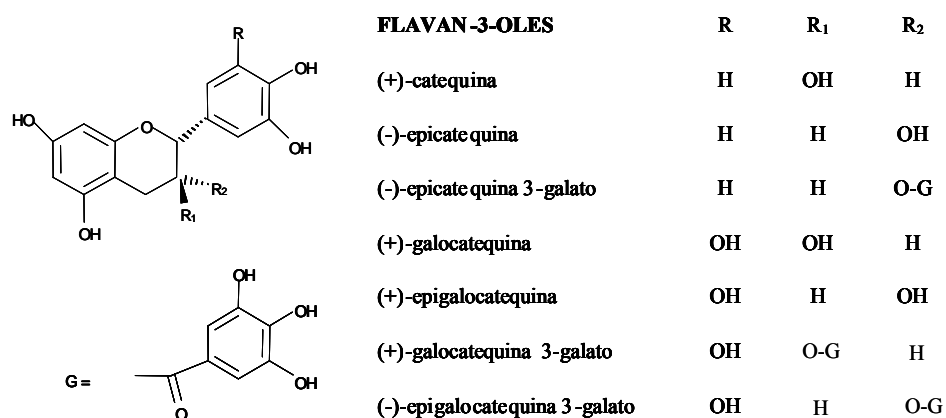


Figura I.5. Estructura del ácido gálico y de los monómeros de flavanoles encontrados en uvas.

Los flavanoles pueden polimerizar entre sí, originando taninos condensados que tienen la capacidad de dar lugar a antocianidinas por calentamiento en medio ácido mineral, por lo que también se les denomina proantocianidinas.

Según den lugar en su hidrólisis a cianidina, delphinidina o pelargonidina se distinguen entre procianidinas, prodelfinidinas y propelargonidinas respectivamente.

Se clasifican de acuerdo al número de unidades básicas elementales que entran a formar parte de su estructura, en oligómeros (dímeros, trímeros, tetrameros y pentámeros) y polímeros, a partir de cinco. En la uva, los oligómeros pueden ser de proantocianidinas homogéneas, es decir, compuestos formados únicamente por catequinas o por galocatequinas, o bien no homogéneas, constituidas por unidades de catequina y galocatequina conjuntamente.

Los enlaces interflavánicos, entre las unidades monómeras que constituyen las proantocianidinas, pueden producirse entre el carbono 4 del anillo C de la subunidad superior y el 8 de la inferior o, menos frecuentemente, el 6 de la unidad inferior. En el caso de los compuestos dímeros, las proantocianidinas que presentan este tipo de enlaces se denominan proantocianidinas de tipo B. Existen también dímeros llamados de tipo A, que presentan una doble unión interflavánica, además del enlace carbono-carbono, poseen otro enlace de tipo éter entre C2-C7 ó C5.

En la nomenclatura, el enlace interflavánico se indica entre paréntesis con los números de los átomos que intervienen en el enlace y su dirección, por ejemplo: epicatequina-(4→8)-catequina.

Los flavanoles se encuentran en varios tejidos de la planta de vid, incluyendo las partes leñosas (53), las hojas, los tallos (54, 55) y el fruto. En las uvas son particularmente abundantes en semillas y hollejos encontrando principalmente derivados de catequina, (-)-epicatequina 3-O-galato y galocatequina (56). Es bien conocido que las proantocianidinas de los hollejos están constituidas por catequinas y galocatequinas (57), mientras que las semillas presentan sólo derivados de catequinas (58, 59). Otra característica de la composición de los flavanoles de las semillas de uva es la presencia de derivados galoilados, que siempre tienen lugar en la unidad de epicatequina. Aunque se ha detectado catequina 3-O-galato (60) y galocatequina 3-O-galato en algunas variedades no viníferas (61).

Estos compuestos están implicados en importantes sensaciones organolépticas como el color y la astringencia y también pueden contribuir en el amargor (49). Aspectos que están desarrollados en el capítulo 4.

ANTOCIANOS

Son pigmentos pertenecientes al grupo de los flavonoides. En la naturaleza se encuentran en tejidos vegetales, donde son responsables de una amplia variedad de colores: naranja, malva, rojo, rosa, violeta y azul. Se encuentran en las vacuolas celulares de flores y frutos, fundamentalmente, aunque también se pueden encontrar en distintas partes como hojas, tallos y órganos de almacenamiento. Dentro de las vacuolas se encuentran en unos orgánulos delimitados por una membrana, conocidos como antocianoplastos que se forman durante la síntesis de estos pigmentos. En el caso de las uvas, estos orgánulos se localizan en las células del hollejo, en las 3 ó 4 primeras capas del hipodermo.

Estructuralmente los antocianos se encuentran presentes en forma de heterósidos, cuyo aglicón, derivado del ion flavilio o fenil-2-benzopirilio, está hidroxilado y metoxilado en diferentes posiciones. El aglicón está unido a una o varias moléculas de azúcar, las cuales pueden estar aciladas con diferentes ácidos orgánicos. La presencia de los grupos hidroxilos y de las moléculas de azúcar, hace que estos compuestos sean bastante solubles en agua, metanol y etanol. Los glicósidos de las antocianidinas se denominan antocianinas o antocianos.

El ion flavilio, es un ion oxonio en el que el oxígeno está cargado positivamente. Los iones oxonio suelen ser poco estables, pero en el caso del ion pirilio, el carácter aromático les confiere estabilidad. La estructura del ion flavilio es en realidad la de un híbrido de resonancia, en el cual la carga positiva se encuentra deslocalizada, resultando en distintas estructuras del tipo oxonio-carbonio (**Figura I.6**). La deficiencia electrónica del catión flavilio le confiere una elevada reactividad.

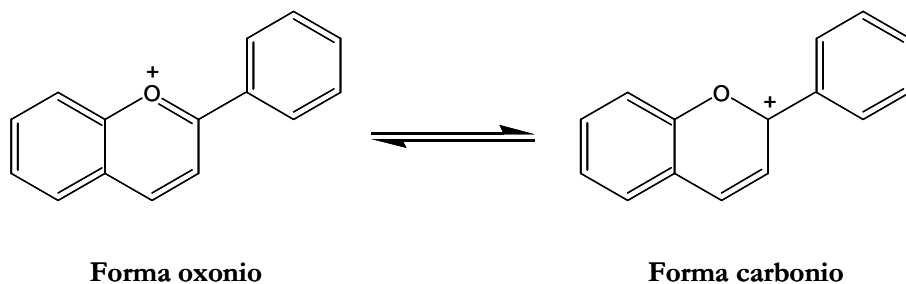


Figura I.6. Estructuras en equilibrio del ion flavilio o fenil-2-benzopirilio.

Aunque se han descrito 25 antocianidinas monoméricas (62) el 90% de los antocianos presentes en la naturaleza contienen alguna de las seis antocianidinas más comunes (pelargonidina, delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina y malvidina) y el resto, están formados por antocianidinas de estructuras ligeramente diferentes (3-desoxiantocianidinas, antocianidinas metiladas y antocianidinas hidroxiladas en posición 6). En la **Figura I.7** se muestra la estructura de las antocianidinas más comunes y se puede apreciar que éstas se diferencian por la sustitución del anillo aromático B.

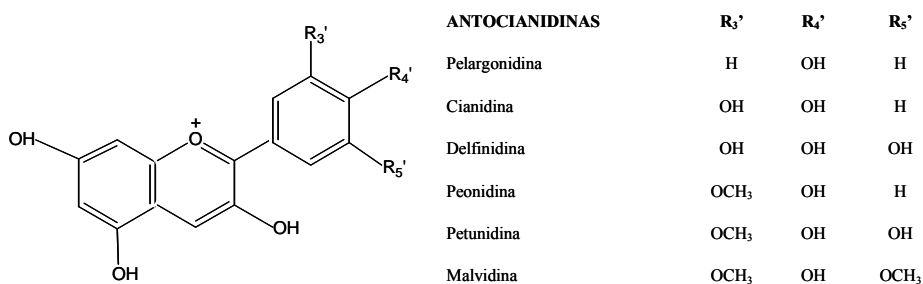


Figura I.7. Estructura de las seis antocianidinas más frecuentes en la naturaleza.

Aunque los azúcares que pueden encontrarse unidos a las antocianidinas son diversos, en las uvas la glucosa es el azúcar mayoritario, habiéndose descrito también la presencia de galactósidos en vinos (63, 64) aunque siempre en concentraciones mucho

menores que sus glucósidos correspondientes. En los antocianos de las uvas, las posiciones frecuentes de unión del azúcar a la antocianidina son la 3 y la 5. Los antocianos mayoritarios en especies viníferas son los 3-monoglucósidos estando ausentes los 3,5-diglucósidos mientras que en algunas especies no viníferas los mayoritarios son los 3,5-diglucósidos. El contenido en diglucósidos se ha utilizado para diferenciar entre uvas viníferas e híbridos y para detectar adulteraciones en vino.

Como se dijo anteriormente, los azúcares de los antocianos pueden estar acilados, es decir unidos mediante enlaces tipo éster a ácidos orgánicos. Entre los agentes acilantes que pueden estar ligados a la molécula, se encuentran los ácidos hidroxicinámicos (cafeico, *p*-cumárico, ferúlico y sinápico), que pueden a su vez presentar restos de azúcar adicionales, ácidos hidroxibenzoicos (*p*-hidroxibenzoico, gálico, vainílico, siríngico y protocatéquico), ácido acético y algunos ácidos dicarboxílicos, como malónico, málico, oxálico y succínico (65, 66). Incluso se han descrito antocianos que llevan unidos una molécula de azúcar a la cual se le une un grupo acilado, que a su vez lleva otra molécula de azúcar unida (67) y también antocianos que llevan cadenas de tipo azúcar-grupo acilo-azúcar grupo acilo (68).

En uvas y vinos, los ácidos acético y *p*-cumárico son los más frecuentes, encontrándose también antocianos acilados con ácido cafeico, aunque en cantidades bastante menores que los anteriores.

La estructura juega un papel fundamental en la estabilidad de los antocianos así como en el color que expresan. Debido a su núcleo flavilio, deficiente en electrones, pueden sufrir con cierta facilidad alteraciones de su estructura por la acción de diferentes agentes. La estabilidad de los antocianos aumenta con el número de metoxilos en el anillo B y disminuye con el número de hidroxilos. Así, entre las antocianidinas más frecuentes en la naturaleza, la malvidina es la más estable, seguida de peonidina, petunidina, cianidina y delfinidina. En general, son más estables en condiciones ácidas. La glicosilación y la acilación de los azúcares también incrementan la estabilidad y por eso, los diglucósidos son más estables que sus correspondientes monoglucósidos (69-71).

La estabilidad de los antocianos, también se encuentra influida por factores relacionados con el medio como la temperatura, el pH, la luz y la presencia de bisulfito, ácido ascórbico, metales y enzimas.

La actividad β -glucosidasa es responsable de la ruptura de los enlaces glucosídicos de los antocianos-3-glucósidos liberando antocianidinas, más inestables y rápidamente degradadas y produciendo pérdidas de color en el vino (72).

En la degradación térmica de los antocianos, la inestabilidad de la forma abierta de la calcona conduce a una ruptura de la molécula (73, 74). De esta forma, se obtienen como productos principales 2, 4, 6-trihidroxibenzaldehído y un ácido fenólico correspondiente al ciclo B de la antocianidina, ácido siríngico, si se trata de la malvidina.

La tasa de degradación de los antocianos aumenta con el incremento de la temperatura. El proceso de degradación térmica se ve también influenciado por el pH del medio, siendo más acusado a valores de pH más altos.

Algunos autores han encontrado que la radiación luminosa acelera la degradación de los antocianos, probablemente debido a la existencia de reacciones de tipo autooxidativo (75). El efecto degradativo de la luz parece ser independiente de los efectos del pH y de la temperatura (76, 77) y es despreciable cuando los valores de ésta son elevados (78). Los diglucósidos acilados presentan mayor estabilidad que los monoglucósidos ante la luz.

Los iones bisulfito (HSO_3^-) se unen sobre las posiciones 2 ó 4 del catión flavilio, originando un aducto incoloro. Esta reacción ocasiona una decoloración de los antocianos, pero también les aporta estabilidad, ya que el complejo es menos sensible a procesos de hidratación y polimerización, al tener ocupadas las posiciones reactivas. Esta reacción es reversible en grado variable y depende de la naturaleza del antociano y del pH. Cuando el medio se acidifica (pH 1), el aducto se disocia a la sal de flavilio original y SO_2 libre. Los compuestos que tienen la posición 4 ocupada no pueden unirse al SO_2 , sobre todo cuando existen sustituyentes voluminosos.

La presencia de ácido ascórbico en disoluciones de antocianos produce un efecto deletéreo. En presencia de oxígeno, ambos tipos de compuestos se degradan

mutuamente. El mecanismo exacto por el que el ácido ascórbico induce la degradación antociánica no está bien establecido, aunque parece estar ligado a su autooxidación, ya que la reacción se inhibe en atmósfera inerte y en presencia de otros antioxidantes.

Los antocianos que poseen un grupo ortodihidroxi en el anillo B pueden formar complejos con diversos metales di- o trivalentes, como el estaño, cobre, aluminio y hierro, dando lugar un desplazamiento batocrómico en el espectro de absorción, que da lugar a una coloración azulada.

En disolución acuosa, los antocianos existen en forma de cuatro estructuras básicas, en equilibrio, en función de su pH:

- catión flavilio (AH^+)
- anhidrobase quinoidal (A)
- pseudobase carbinol (B)
- pseudobase calcona (C)

La cantidad relativa de cada una de las formas estructurales, que coexisten en equilibrio, está en función del pH del medio. Las distintas formas estructurales de los antocianos y los mecanismos de transformación en función del pH han sido establecidos mediante estudios cinéticos, termodinámicos y técnicas espectroscópicas (79).

- A pH ácido la forma que predomina es la forma protonada (catión flavilio AH^+) que es de color rojo.
- A pH ácido pero cercano a la neutralidad y en medio no acuoso, la forma predominante es la anhidrobase quinoidal (A), que posee un color azulado-violáceo.
- A pH comprendido entre 3 y 6, en medios acuosos, se forman las pseudobases carbinol o formas hemiacetálicas, que son incoloras y provienen de la reacción de hidratación de la molécula a través de la cual se fijan grupos $-OH$ en posición 2 ó 4.
- En equilibrio con las formas hemiacetálicas están las formas abiertas o pseudobases calcona, incoloras o ligeramente amarillentas.

La interconversión entre estas cuatro formas tiene lugar según se muestra en la figura siguiente.

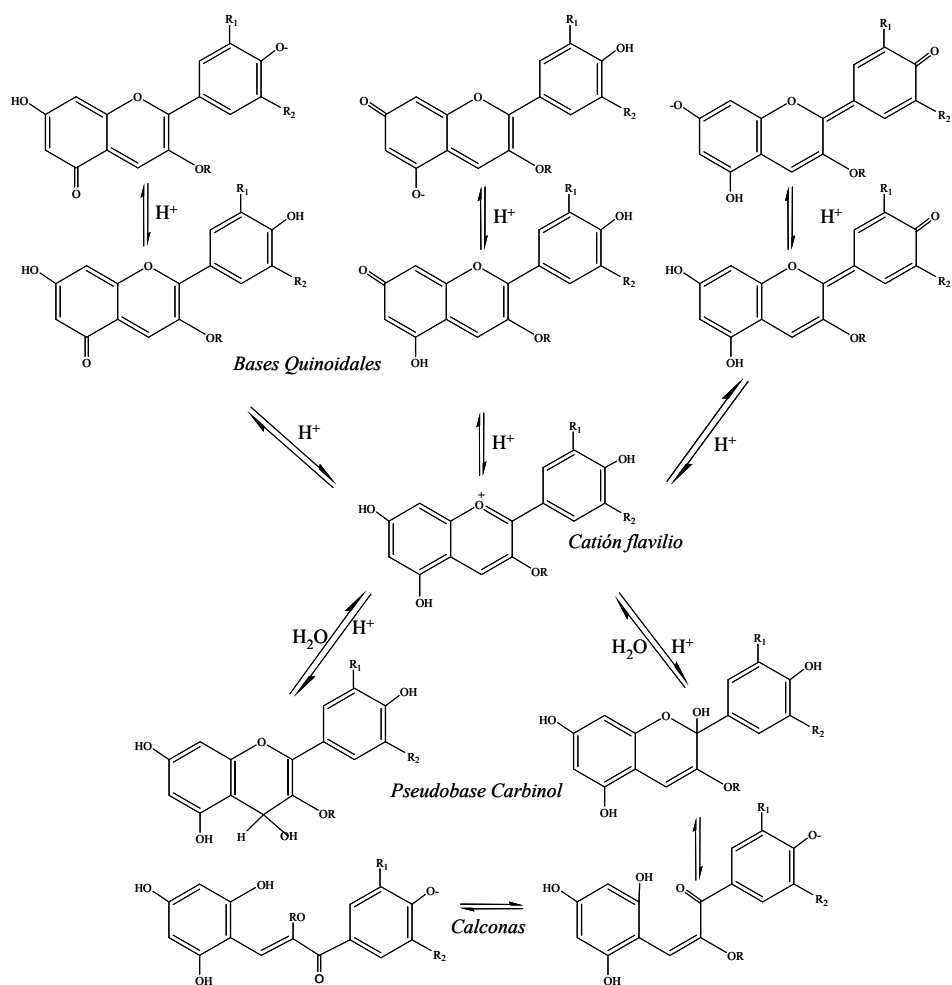
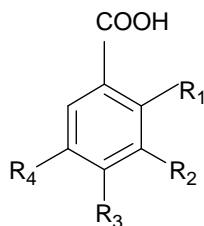


Figura I.8. Transformaciones estructurales de los antocianos.

ÁCIDOS FENÓLICOS

Los ácidos fenólicos junto con los estilbenos (resveratrol), los fenoles volátiles y algunos compuestos heterogéneos (lignanós y cumarinas) son los compuestos fenólicos no flavonoides que se encuentran en uvas y vinos. Los ácidos fenólicos pueden ser de

tipo benzoico (C6-C1) y de tipo cinámico (C6-C3) diferenciándose por el patrón de sustitución en el anillo benzénico, fundamentalmente se encuentran en el vino y en las uvas como ácidos hidroxicinámicos e hidroxibenzoicos.



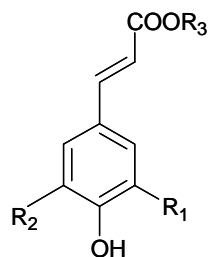
ÁCIDOS HIDROXIBENZOICOS	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Gálico	H	OH	OH	OH
Gentísico	OH	H	H	OH
<i>p</i> -Hidroxibenzoico	H	H	OH	H
Protocatéquico	H	OH	OH	H
Salicílico	OH	H	H	H
Siríngico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Vanílicico	H	OCH ₃	OH	H

Figura I.9. Estructura de los ácidos hidroxibenzoicos del vino.

En la uva la mayor parte de los ácidos benzoicos se encuentran combinados con azúcares o, en el caso del ácido gálico, formando ésteres con los flavanoles. El ácido salicílico y el gentísico se encuentran en cantidades traza, sin embargo el gálico puede alcanzar concentraciones superiores a 100 mg/L en vino tinto (25). El ácido gálico junto con su dímero, el ácido elágico y otros ácidos benzoicos como el siríngico y el vanílicico pueden encontrarse en la madera de roble y ser cedidos al vino durante el período de envejecimiento (80).

En la uva, los ácidos cinámicos se encuentran en las vacuolas de las células del hollejo y, en menor medida, en las de la pulpa, generalmente en forma de ésteres tartáricos, denominados como ácidos cutárico, caftárico y fertárico en función del ácido que provengan (*p*-cumárico, cafeico y ferúlico, respectivamente). En el vino estos ésteres pueden hidrolizarse de tal manera que podemos encontrar formas libres y combinadas. También podrían liberarse por hidrólisis de los anocianos acilados o por el empleo de enzimas (81). El contenido de éstos ácidos en el vino es mayor que el de los ácidos hidroxibenzoicos.

Desde un punto de vista organoléptico, estos compuestos no confieren al vino ningún sabor ni olor. Sin embargo, son precursores de compuestos fenólicos volátiles que sí afectan al sabor y al olor de los vinos.



ÁCIDOS HIDROXICINÁMICOS	R ₁	R ₂	R ₃
Cafeico	OH	H	H
Caftárico	OH	H	Ácido tartárico
<i>p</i> -Cumárico	H	H	H
<i>p</i> -Cutárico	H	H	Ácido tartárico
Ferúlico	OCH ₃	H	H
Fertárico	OCH ₃	H	Ácido tartárico
Sinápico	OCH ₃	OCH ₃	H

Figura I.10. Estructura de los ácido hidroxicinámicos del vino.

I.6 Biosíntesis de los compuestos fenólicos

Los distintos tipos de antocianos, flavonoles y proantocianidinas que se encuentran en las plantas vienen determinados por la actividad de diversas enzimas, que llevan a cabo la hidroxilación del anillo B de los flavonoides. Son varios los factores que afectan la biosíntesis, tales como nutrición, vigor, suelo, agua, reguladores de crecimiento, ataque de microorganismos, presencia de heridas, luz, temperatura, altitud y humedad, entre otros. La mayoría de estudios han sido realizados en especies modelo como *Arabidopsis thaliana* Heynh. aunque muchos de estos factores también han sido estudiados en *Vitis vinifera* L. (82, 83).

En uvas, no es habitual encontrar antocianos 4'-hidroxilados, aunque recientemente se han determinado en algunos cultivares (84). Generalmente se acumulan antocianos 3', 4', 5'-hidroxilados (basados en malvidina, delphinidina y petunidina) y en menor concentración 3', 4'-hidroxilados (basados en cianidina y peonidina). Por el contrario, los flavonoles encontrados en uvas son predominantemente 3', 4'-hidroxilados (glucósidos de quercetina) y en menor cantidad 4'-hidroxilados (Kaempferol) y 3', 4', 5'-hidroxilados (miricetina). Las semillas y los hollejos tienen diferente composición de proantocianidinas y generalmente no contienen proantocianidinas 4'-hidroxiladas (afzelequinas). Todas las subunidades de proantocianidinas de las semillas son unidades 3', 4'-hidroxiladas (catequina y epicatequina) mientras que las proantocianidinas de los hollejos también contienen 3', 4', 5'-hidroxilados (epigalocatequina). En la **Tabla I.3** se muestra la acumulación de los distintos tipos de flavonoides y su grado de hidroxilación en las distintas partes de la uva de acuerdo con diferentes autores (84-87).

Tabla I.3. Acumulación de flavonoles, antocianos y proantocianidinas (PAs) 4'-, 3'4'-, y 3',4',5'-hidroxiladas en uvas.

Flavonoides	<i>4'-Hidroxilados</i>	<i>3',4'-Hidroxilados</i>	<i>3',4',5'-Hidroxilados</i>
Antocianos	+	+	+
Flavonoles	-	+	-
PAs hollejo	-	+	+
PAs semilla	-	+	-

En la **Figura I.11** se muestra un esquema de las rutas biosintéticas de los diferentes flavonoides, se puede observar una estrecha relación entre la síntesis de antocianos y proantocianidinas. La dihidroflavonol reductasa convierte los dihidroflavonoles en leucoantocianidinas, que son intermediarios clave para la formación de estos compuestos. La leucocianidina 4-reductasa es responsable de la conversión de leucocianidina en catequina, mientras que la leucocianidina desoxigenasa cataliza la síntesis de cianidina. La epicatequina es producida a partir de la cianidina por la acción de una enzima (antocianidina reductasa: ANR) la cual convierte la cianidina y delphinidina en (-)-epicatequina y epigallocatequina, respectivamente. Por ello, la cianidina y la delphinidina se consideran importantes intermediarios en la biosíntesis de proantocianidinas del hollejo y de las semillas (37). Se ha visto que la proporción de la (-)-epicatequina y (+)-catequina viene establecida por la actividad de la calcona sintetasa (CHS) (88). Por otro lado, la enzima flavonoide 3-*O*-glucosiltransferasa (UFGT) tiene una alta importancia en la acumulación de antocianos, catalizando la glicosilación de las antocianidinas (89). La antocianin *O*-metiltransferasa (OMT) puede mediar la metilación de los grupos hidroxilos dando lugar a los tres antocianos metilados: peonidina, petunidina y malvidina (90). Finalmente, la acilación es catalizada por la acción de la antocianin-acetiltransferasa (ACT). Todas estas enzimas son codificadas por diferentes genes, los cuales son responsables de la composición en compuestos fenólicos de la uva (54, 91-93).

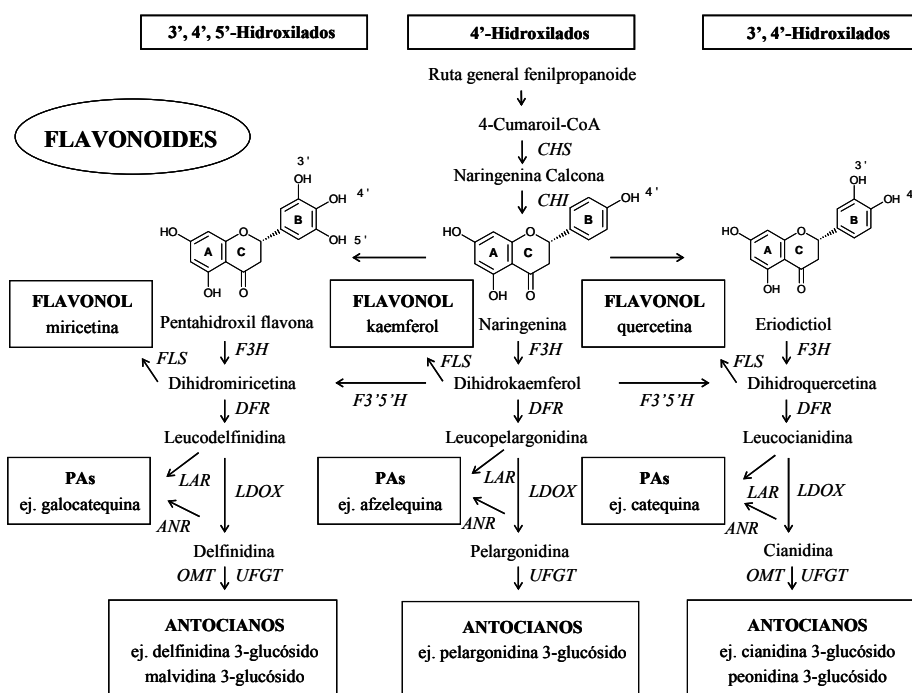


Figura I.11. Representación esquemática de la ruta biosintética de los flavonoides. Ejemplos de diferentes hidroxilaciones en el anillo B de los flavonoides. Abreviaturas de las enzimas implicadas: CHS: calcona sintetasa; CHI: calcona isomerasa; F3H: flavanona 3-hidroxilasa; F3'5'H: flavonoide 3'-5'-hidroxilasa; FLS: flavonol sintetasa; DFR: dihidroflavonol reductasa; ANS: antocianidina sintetasa; LAR: leucoantocianidina reductasa; ANR: antocianidina reductasa; UFGT: flavonoide 3-O-glucosiltransferasa. (adaptado de Bogs et al., 2006).

El desarrollo de la uva tiene lugar en dos fases sucesivas de crecimiento (94, 95). Durante la primera fase, desde floración hasta envero, se inicia el engrosamiento de la uva y la formación de la semilla. Durante esta fase, las proantocianidinas se acumulan en el hollejo y en las semillas que todavía están desarrollándose y se sintetizan los flavonoles. En el hollejo, la síntesis de proantocianidinas se completa antes del envero, mientras que en las semillas empieza después de la floración y continúa una o dos semanas pasado el envero (54).

La segunda fase de crecimiento comienza en el envero y se caracteriza principalmente por la acumulación de azúcares, la disminución de ácidos, el ablandamiento de la baya y la acumulación de antocianos (**Figura I.12**) (54).

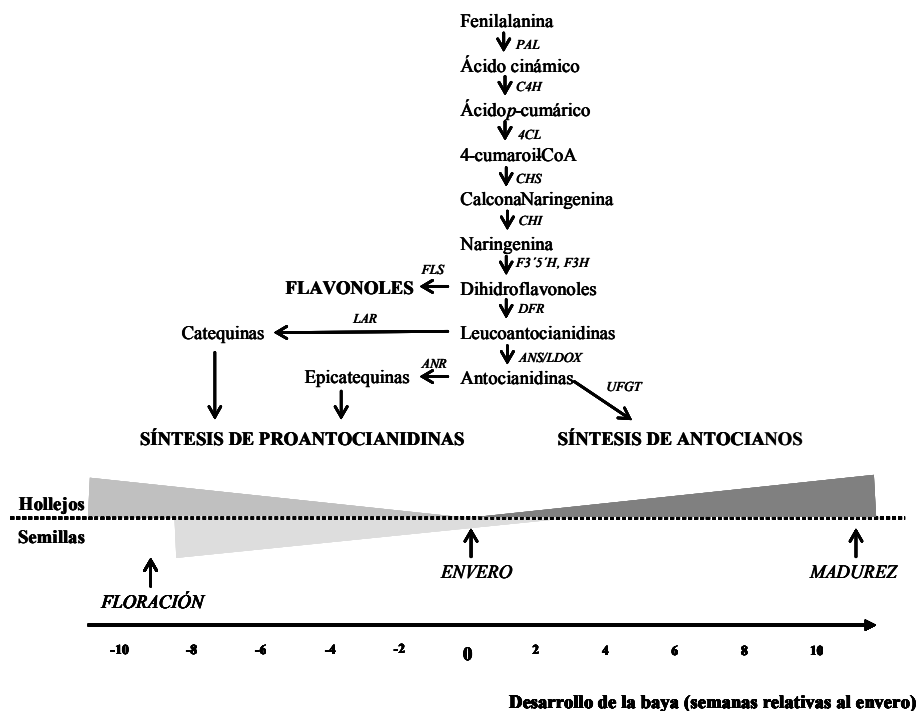


Figura I.12. Ruta biosintética de los flavonoides durante el desarrollo de la uva. PAL: fenilalanina amonio liasa; CAH: cinamato-4 hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato CoA ligasa; el resto de abreviaturas están en la figura anterior. (adaptado de Deluc et al., 2008)

I.7 Fundamentos de la copigmentación

La copigmentación es el resultado de la estabilización de las formas estructurales coloreadas de los antocianos en disolución, lo que justifica el realce de su color. Desempeña un papel importante en la expresión de una amplia gama de colores en plantas, frutos, bayas, derivados de vegetales y productos alimenticios (96-98).

La extensión de la copigmentación está claramente influenciada por el pH, la temperatura, la concentración de sales, el disolvente, la naturaleza del antociano y la del copigmento, la relación molar entre ambos así como la concentración de pigmento (51, 99-108).

Son considerados como buenos copigmentos aquellos compuestos que contienen núcleos aromáticos y poseen cierta planaridad (109). Los ácidos orgánicos, los aminoácidos, los flavonoides y los polisacáridos son algunos de los posibles copigmentos (51, 110, 111). Algunos flavonoides resultan ser mejores copigmentos que otros, la catequina y las proantocianidinas parecen ser peores que los flavonoles o los dímeros de vinilcatequina (51, 104, 112).

Los complejos de copigmentación forman estructuras verticales antociano-copigmento que se estabilizan por puentes de hidrógeno. A través de este proceso se protege al antociano de la hidratación y por tanto se evita la formación de las formas hemiacetal (incoloras) y calcona (amarillentas).

Los efectos de la copigmentación se han interpretado generalmente por los cambios batocrómicos e hiperocrómicos (51, 99, 113-115) que afectan al espectro de absorción visible en la solución del pigmento (96, 116). Aunque también puede ocurrir un desplazamiento en el equilibrio de las bases estructurales de los antocianos hacia las formas incoloras induciendo una disminución de la absorbancia en el espectro visible (109, 117, 118).

I.8 Introducción al estudio del color

El color del vino es un factor determinante, desde un punto de vista sensorial ya que es el primer atributo valorado en la degustación. Una simple observación permite conocer su estado, adelantando alguna de sus características y contribuyendo a decidir sobre su aceptación o rechazo. A través del mismo se pueden deducir desde características obvias (tipología, limpidez, brillo y presencia de sedimentos) hasta algunas más complejas, como el estado de conservación, evolución e incluso la edad.

Generalmente se define por su intensidad, su vivacidad, su tonalidad y sus matices. También se habla de la cantidad de color o capa, que es suficiente o insuficiente (alta o

baja) comparándolo con los de su tipo y se suele expresar como vino cubierto o poco cubierto. Se emplean una gran cantidad de términos comparativos (rojo cereza, rojo teja, etc.) para intentar describirlo, si bien son meramente subjetivos. El color también puede ser medido y valorado desde un punto de vista objetivo gracias a la aplicación de la colorimetría.

Desde un punto de vista fisiológico, el color es una respuesta mental al estímulo que una radiación luminosa visible produce en la retina, y que el nervio óptico transmite al cerebro. Es un concepto psicofísico al implicar un fenómeno físico (la radiación luminosa visible) y un fenómeno psíquico (interpretación por parte del cerebro de las señales que los receptores de la retina reciben). No es, por tanto, una propiedad intrínseca del objeto que refleja o transmite la radiación luminosa, pues basta con cambiar la fuente para modificar el estímulo producido. Depende, de la distribución espectral de la radiación incidente, de la capacidad del objeto para transformarla y de la fisiología del observador.

Cuando la luz incide en el objeto, algunas de las moléculas que forman parte del mismo son capaces de absorber parte de esa energía y de transmitir otra parte, de tal forma que la luz que llega al observador será una mezcla de las radiaciones no absorbidas por ese objeto. Si el objeto es opaco, la luz no absorbida será la luz reflejada y si el objeto es transparente, la luz no absorbida será transmitida a través del mismo.

Los receptores capaces de ser estimulados por la radiación lumínica transmitida por el objeto se encuentran en la retina y se denominan conos. Sólo existen tres tipos de conos distintos y se diferencian porque se estimulan con radiaciones luminosas de distinta longitud de onda. Uno lo hace con radiaciones correspondientes a la región del verde, otro con las del rojo y otros con las del azul. A partir de las señales de esos tres tipos de conos el cerebro es capaz de interpretar todos los colores.

El estímulo cromático está compuesto por tres sensaciones bien diferenciadas: tono, luminosidad y saturación, que definen cualquier color. El tono o matiz, es un atributo cualitativo y nos permite clasificar los colores en rojizos, azulados, etc. Está relacionado con las diferencias de absorbancia de la energía radiante a diferentes longitudes de onda. La luminosidad o brillo es la característica que permite clasificar un color como claro u oscuro y considerarlo dentro de la escala de grises, entre el negro y el blanco. Es una

medida relativa entre la luz reflejada y absorbida. Finalmente, la pureza o saturación determina para cada matiz su grado de diferencia frente al gris del mismo brillo.

La luz o radiación luminosa es la parte de las radiaciones electromagnéticas que estimulan el sistema visual humano. Estas radiaciones que logran estimular a los receptores de la visión poseen longitudes de onda comprendidas entre 380 y 770 nm. La radiación luminosa que llega a la retina es una mezcla de luces de distintas longitudes de onda y de distinta intensidad y será el resultado de la incidencia de una luz de unas determinadas características sobre un determinado objeto y de la interacción de la misma con las moléculas del objeto susceptibles de absorber algunas longitudes de onda.

Cada fuente de luz tiene un espectro de emisión (representación de la cantidad de luz emitida a cada longitud de onda) característico y ninguna fuente de luz es equienergética, es decir no existe ninguna fuente que emita la misma cantidad de luz en todas y cada una de las longitudes de onda que constituyen el espectro visible. Con el objetivo de estandarizar las coordenadas de color y facilitar el intercambio y comparación de datos entre laboratorios, la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE) recomienda para colorimetría general, utilizar unos estándares en la fuente de iluminación y también en el observador. Como fuente de iluminación propone distribuciones espectrales relativas (iluminantes) para varios tipos de fuentes: A, D65, C, D50, D55, D75.

En la **Figura I.13** se muestra el espectro de emisión característico del iluminante D65, recomendado por la CIE, relacionado con la radiación que emite un cuerpo negro a la temperatura de 6500 K. Su luz emitida es parecida a la luz de un día con el cielo totalmente cubierto.

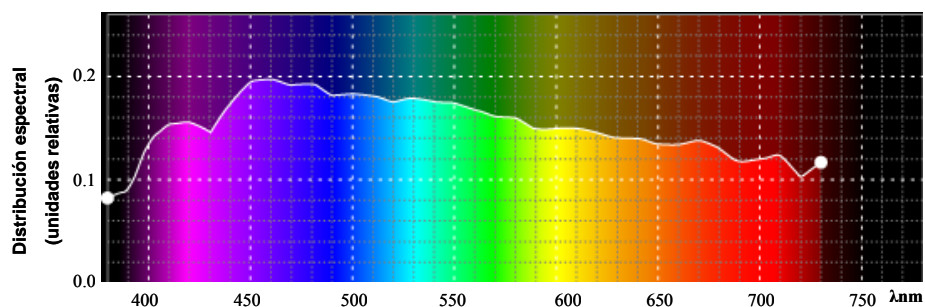


Figura I.13. Distribución espectral de energía radiante del iluminante estándar D65.

Por otra parte hay que definir el observador estándar. En 1931 Guaid (119) obtuvo medidas de la sensibilidad de los conos rojos, verdes y azules, de esta forma se definió el estándar CIE 1931, conocido como observador de 2° cuyas propiedades definen las funciones de igualación de color (series de valores triestímulo espectrales de cada estímulo monocromático en un determinado sistema de estímulos primarios). En 1964 se definió el observador de 10° que tiene un campo visual más grande (**Figura I.14**).

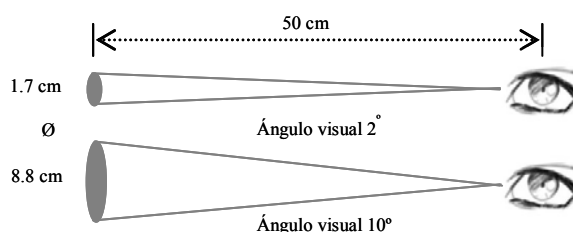


Figura I.14. Observadores estándar CIE 1931 y 1964.

La colorimetría estudia la especificación numérica del color de un estímulo visual definido físicamente de manera que: estímulos con la misma especificación y bajo las mismas condiciones de observación aparecen iguales para un observador con visión normal de los colores, estímulos que aparecen iguales poseen la misma especificación y los números que comprende la especificación son funciones continuas de los parámetros físicos que definen la distribución de energía radiante espectral del estímulo.

Conociendo la cantidad de luz transmitida a cada longitud de onda y sabiendo la sensibilidad de cada uno de los conos, se puede saber la respuesta de cada cono a cada longitud de onda. La señal que estos conos envían al cerebro es la suma de todos los estímulos que recibe, de tal manera que si se suman las respuestas de cada cono a las distintas longitudes de onda se obtiene la señal que envía al cerebro cada cono. Así el color queda definido por tres componentes (uno por cono) denominados valores triestímulo, en cuya determinación se tienen en cuenta los tres factores normalizados que hacen posible el color.

La CIE ha propuesto distintos sistemas de representación del color buscando uno que refleje la sensación visual percibida por el observador. De todos los propuestos, el espacio CIELAB es el más empleado en la actualidad y es recomendado por la CIE.

El espacio CIELAB es un espacio esférico (**Figura I.15**) donde L^* representa la luminosidad, a^* y b^* la cromaticidad, h_{ab} es el tono, y C_{ab}^* el cromatismo o colorido. La luminosidad (L^*) va de 0-100, de más oscuro a más claro, el tono (h_{ab}) es el ángulo de la circunferencia y está comprendido entre 0° y 360° , y el cromatismo (C_{ab}^*) es la distancia entre el eje de la luminosidad y el estímulo en cuestión.

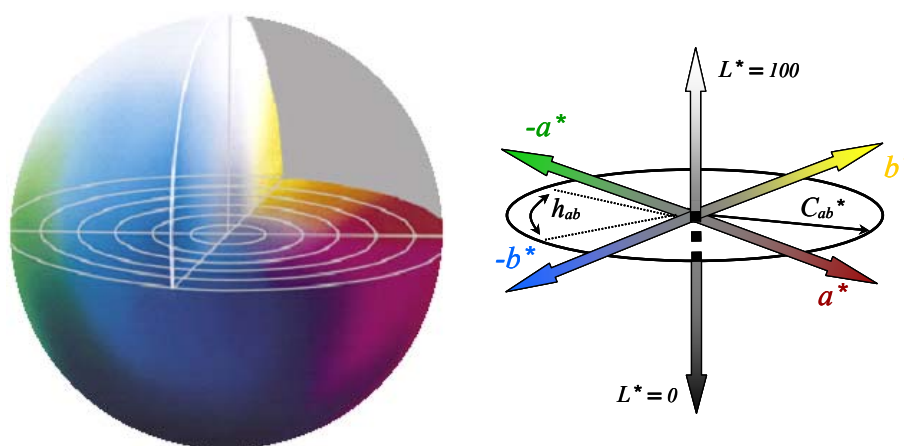


Figura I.15. Representación del espacio CIELAB.

En toda disolución, mediante un espectrofotómetro, se puede conocer, para cada longitud de onda, la relación entre la intensidad de luz saliente (I) y la intensidad de la luz incidente (I_0). Esta relación se llama transmitancia (T). La representación de esta relación frente a la longitud de onda se conoce como espectro de transmisión y es característico de cada sustancia e independiente del espectrofotómetro empleado en la medida. La transmitancia se relaciona con la absorbancia (A) a través de la siguiente relación: $T=10^{-A}$ y la absorbancia se relaciona con la concentración a través de la ley de Lambert-Beer: $A=\epsilon \cdot C \cdot l$, siendo ϵ la absorptividad molar, C la concentración de la disolución y l el paso óptico de la cubeta de medida, expresado en cm.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chant, S.R., Flowering plants of the World. Vitaceae, ed. V.H. Heywood. 1993, Batsford Ltd. Londres. 188-189.
2. Hillier, J. and A. Coombes, The Hillier Manual of trees and shrubs, ed. D. Charles. 2002, Devon.
3. Mullins, M., A. Bouquet, and L. Williams, Biology of the Grapevine, ed. C.U. Press. 1992, Cambridge.
4. Robinson, J., Vines, Grapes, and Wines, ed. M.B. Publish. 1986, Londres.
5. Galet, P., Précis d'Ampélographie pratique, ed. e. Déhan. 1991, Montpellier.
6. Moore, M.O., A study of selected Vitis (Vitaceae) taxa in the southeastern United States. *Rhodora*, **1987**. 89 (857): p. 75-91.
7. Keller, M., Grapevine anatomy and physiology, ed. W.S.U. Editions. 2003, United State.
8. Webb, D.A., Vitis. Flora Europaea, ed. Tutin T.G. Vol. 2. 1968, Cambridge University Press. 246.
9. Galet, P., Cépages et vignobles de France. Précis d'Ampélographie pratique, ed. e. Déhan. Vol. Tome I: Les vignes américaines Tome II: Les cépages de cuve. 1956-1958, Montpellier.
10. Del Zan, F., et al., La vite e l'uomo. Il terzo anello, storia di un viaggio. 2004.
11. Negrul, A.M., Evolution of cultivated forms of grapes. *Comptes Rendus. Académie Sciences USSR*, **1938**. 18(8): p. 585-588.
12. Vavilov, N.I., Studies on the origin of the cultivated plants 1926, Leningrad.
13. Olmo, H.P., Evolution of crop plants. Grapes (Vitis, Muscardinia) (Vitaceae), ed. N.W. Simmonds. 1976, Longmans, London.
14. Zohary, D. and P. Spiegel-Roy, Beginnings of fruit growing in the Old World. *Science*, **1975**. 187: p. 319-327.
15. McGovern, P.E., Wine and Eurasian grape: Archaeological and chemical perspectives on their origins, ed. A.d.I.s.d.a.i.d.h.e.c.d.v.e.d. vinho. 2004., Funchal, Madeira. 291-307.
16. McGovern, P.E., et al., The beginnings of winemaking and viticulture in the ancient Near East and Egypt. *Expeditions*, **1997**. 39: p. 3-21.
17. Zeven, A.C. and P.M. Zhukovsky, Dictionary of cultivated plants and their centres of diversity, ed. C.A.P.a. Documentation. 1975, Wageningen.
18. Marcilla, J., Tratado práctico de viticultura y enología españolas, ed. A.E.d.T.y. Autores. 1954, Madrid.

19. García de Luján, A. and B. Peña, Evaluación de portainjertos de vid en terrenos calizos, ed. INIA. 1991, Madrid.
20. Hidalgo, L., Los portainjertos en viticultura, ed. I. Cuadernos Dpto. Viticultura y Enología nº 4. 1975, Madrid.
21. Noguera, P., Viticultura práctica, ed. Dilagro. 1972, Lérida.
22. Galet, P., Cépages et vignobles de France, ed. e. Déhan. 1988-1990, Montpellier.
23. Larrea, A., Vides Americanas: Portainjertos, ed. M.d. Agricultura. 1973, Madrid.
24. Clemente, S.d.R., Ensayo sobre las variedades de vid común que vegetan en Andalucía. 1807, Madrid.
25. Cabanis, J.C., et al., *Tablas de composición*, in *Fundamentos científicos y tecnológicos*, C. Flanzky, Editor. 2003, AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa: Madrid (España). p. 218-231.
26. Conde, C., et al., Biochemical changes throughout grape berry development and fruit and wine quality. *Food*, **2007**. 1(1): p. 1-22.
27. Hidalgo, J., Tratado de enología. 2003, Madrid, España: Ediciones Mundi-Prensa. 1423.
28. Blouin, J. and J. Crruège, *Analyse et Composition des Vins: Comprendre le vin*. 2 ed. 2003, Paris, France: LaVigne, Dunod. 304.
29. Torija, M.J., et al., Effect of Organic Acids and Nitrogen Source on Alcoholic Fermentation: Study of Their Buffering Capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(4): p. 916-922.
30. Ferreira, V., R. López, and J.F. Cacho, Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2000**. 80(11): p. 1659-1667.
31. Croteau, R., T.M. Kutchan, and L. N.G., Natural products (secondary metabolites). *Biochemistry and Molecular Biology of Plant*, ed. B.B. Buchanan, W. Gruissem, and J. R.L. 2000, Rockville: American Society of Plant Physiologists.
32. Xia, E.-Q., et al., Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *International Journal of Molecular Sciences*, **2010**. 11(2): p. 622-646.
33. Strack, D., Phenolic metabolism Plant Biochemistry, ed. H. J.B. 1997, London: Academic Press. 387-416.
34. Cheynier, V. and J. Rigaud, HPLC Separation and Characterization of Flavonols in the Skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1986**. 37(4): p. 248-252.
35. Pereira, G.E., et al., Microclimate Influence on Mineral and Metabolic Profiles of Grape Berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(18): p. 6765-6775.

36. Rodríguez Montealegre, R., et al., Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2006**. 19(6-7): p. 687-693.
37. Adams, D.O., Phenolics and ripening in grape berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006**. 57(3): p. 249-256.
38. Downey, M.O., J.S. Harvey, and S.P. Robinson, Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2003**. 9(2): p. 110-121.
39. Price, S.F., et al., Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot noir Grapes and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1995**. 46(2): p. 187-194.
40. Ribéreau-Gayon, P., Les composés phénoliques du raisin et du vin II. Les flavonosides et les anthocyanosides. *Annales de physiologie végétale*, **1964**. 6: p. 211-242.
41. Wulf, L.W. and C.W. Nagel, Analysis of phenolic acids and flavonoids by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1976**. 116(2): p. 271-279.
42. Cortell, J.M. and J.A. Kennedy, Effect of Shading on Accumulation of Flavonoid Compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot Noir Fruit and Extraction in a Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(22): p. 8510-8520.
43. Downey, M.O., J.S. Harvey, and S.P. Robinson, The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2004**. 10(1): p. 55-73.
44. Spayd, S.E., et al., Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2002**. 53(3): p. 171-182.
45. Masa, A., M. Vilanova, and F. Pomar, Varietal differences among the flavonoid profiles of white grape cultivars studied by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **2007**. 1164(1-2): p. 291-297.
46. Mattivi, F., et al., Metabolite Profiling of Grape: Flavonols and Anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(20): p. 7692-7702.
47. Talcott, S.T. and J.-H. Lee, Ellagic Acid and Flavonoid Antioxidant Content of Muscadine Wine and Juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50(11): p. 3186-3192.
48. Preys, S., et al., Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*, **2006**. 563(1-2): p. 126-136.
49. Hufnagel, J.C. and T. Hofmann, Quantitative Reconstruction of the Nonvolatile Sensometabolome of a Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**. 56(19): p. 9190-9199.
50. 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(2): p. 67-87.

51. Gómez-Míguez, M., et al., Influence of Different Phenolic Copigments on the Color of Malvidin 3-Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(15): p. 5422-5429.
52. Aron, P.M. and J.A. Kennedy, Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2008**. 52(1): p. 79-104.
53. Boukharta, M., M. Girardin, and M. Metche, Procyanidines galloylées du sarment de vigne (*Vitis vinifera*) : Séparation et identification par chromatographie liquide haute performance et chromatographie en phase gazeuse. *Journal of Chromatography A*, **1988**. 455: p. 406-409.
54. Bogs, J., et al., Proanthocyanidin Synthesis and Expression of Genes Encoding Leucoanthocyanidin Reductase and Anthocyanidin Reductase in Developing Grape Berries and Grapevine Leaves. *Plant Physiology*, **2005**. 139(2): p. 652-663.
55. Tesnière, C., et al., Effects of genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels on the response to stress and the synthesis of secondary metabolites in grapevine leaves. *Journal of Experimental Botany*, **2006**. 57(1): p. 91-99.
56. Su, T.C. and V.L. Singleton, Identification of three flavan-3-ols from grapes. *Phytochemistry*, **1969**. 8(8): p. 1553-1558.
57. Piretti, M.V., M. Ghedini, and G. Serrazanetti, isolation and identification of the polyphenolic and terpenoid constituents of *Vitis vinifera*. v. Trebbiano variety. *Annali di Chimica*, **1976**. 66: p. 429-437.
58. Escribano-Bailón, M.T., et al., Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, **1995**. 200(3): p. 221-224.
59. Santos-Buelga, C., E.M. Francia-Aricha, and M.T. Escribano-Bailón, Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chemistry*, **1995**. 53(2): p. 197-201.
60. Lee, C.Y. and A. Jaworski, Phenolic Compounds in White Grapes Grown in New York. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1987**. 38(4): p. 277-281.
61. Lee, C.Y. and A.W. Jaworski, Identification of Some Phenolics in White Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1990**. 41(1): p. 87-89.
62. Andersen, O.M. and M. Jordheim, *The anthocyanins*, in *Flavanoids: chemistry, biochemistry and applications*, O.M. Andersen and K.R. Markham, Editors. 2006, CRC Press, Taylor and Francis Group: Boca Raton (Estados Unidos). p. 471-551.
63. Alcalde-Eon, C., et al., Pigment Profiles in Monovarietal Wines Produced in Uruguay. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006**. 57(4): p. 449-459.
64. Wang, H., E.J. Race, and A.J. Shrikhande, Anthocyanin Transformation in Cabernet Sauvignon Wine during Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(27): p. 7989-7994.
65. Jackman, R.L. and J.L. Smith, *Anthocyanins and betalains*, in *Natural Food Colorants*, G.A.F. Hendry and H. J.D., Editors. 1996, Blackie Academic & Professional. p. 244-280.

-
66. Strack, D. and V. Wray, *Anthocyanins*, in *Methods in Plant Biochemistry*, J.B. Harborne, Editor. 1989, Academic Press. p. 326-355.
67. Saito, N., et al., Acylated pelargonidin 3,7-glycosides from red flowers of *Delphinium hybridum*. *Phytochemistry*, **1998**. 49(3): p. 881-886.
68. Tatsuzawa, F., et al., Acylated malvidin 3-rutinosides in dusky violet flowers of *Petunia integrifolia* subsp. *inflata*. *Phytochemistry*, **1999**. 52(2): p. 351-355.
69. Rivas-Gonzalo, J.C., *Analysis of anthocyanins*, in *Methods in Polyphenols Analysis*, S.-B. C. and G. Williamson, Editors. 2003, The Royal Society of Chemistry: Cambridge. p. 338.
70. Anderson, D.W., et al., Identification of acetic acid as an acylating agent of anthocyanin pigments in grapes. *Phytochemistry*, **1970**. 9(7): p. 1579-1583.
71. Gueffroy, D.E., R.E. Kepner, and A.D. Webb, Acylated anthocyanin pigments in *Vitis vinifera* grapes: Identification of malvidin-3-(6-p-coumaroyl) glucoside. *Phytochemistry*, **1971**. 10(4): p. 813-819.
72. Monagas, M. and B. Bartolomé, *Anthocyanins and anthocyanin-derived compounds*, in *Wine Chemistry and Biochemistry*, M.V. Moreno-Arribas and M.C. Polo, Editors. 2009, Springer: New York, USA. p. 437-462.
73. Furtado, P., et al., Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, **1993**. 75(2): p. 113-118.
74. Piffaut, B., et al., Comparative degradation pathways of malvidin 3,5-diglucoside after enzymatic and thermal treatments. *Food Chemistry*, **1994**. 50(2): p. 115-120.
75. Shenoy, V.R., Anthocyanins: Prospective food colours. *Current Science*, **1993**. 64(10): p. 575-579.
76. Markakis, P., H. Suparmo, and T. Harp, Comparative stability of two anthocyanins pigments. *Developments in Food Science*, **1986**. 12: p. 705-710.
77. Sapers, G.M. and M.A. Ziolkowski, Comparison of Erythorbic and Ascorbic Acids as Inhibitors of Enzymatic Browning in Apple. *Journal of Food Science*, **1987**. 52(6): p. 1732-1733.
78. Attoe, E.L. and J.H. Von Elbe, Photochemical Degradation of Betanine and Selected Anthocyanins. *Journal of Food Science*, **1981**. 46(6): p. 1934-1937.
79. Brouillard, R., *Chemical structure aof anthocyanins*, in *Anthocyanins as Food Colors*, P. Markakis, Editor. 1982, Academic Press: New York.
80. Puech, J.L., et al., *Crianza de los vinos*, in *Fundamentos científicos y tecnológicos*, C. Flanzky, Editor. 2003, AMV Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa: Madrid (España). p. 608-621.
81. Dugelay, I., et al., Role of cinnamoyl esterase activities from enzyme preparations on the formation of volatile phenols during winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1993**. 41(11): p. 2092-2096.

82. Downey, M.O., N.K. Dokoozlian, and M.P. Krstic, Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006**. 57(3): p. 257-268.
83. He, F., et al., Biosynthesis of Anthocyanins and Their Regulation in Colored Grapes. *Molecules*, **2010**. 15(12): p. 9057-9091.
84. He, F., et al., Mass-spectrometry evidence confirming the presence of pelargonidin-3-O-glucoside in the berry skins of Cabernet Sauvignon and Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2010**. 16(3): p. 464-468.
85. Downey, M.O., J.S. Harvey, and S.P. Robinson, Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2003**. 9(1): p. 15-27.
86. Kennedy, J.A., et al., Composition of Grape Skin Proanthocyanidins at Different Stages of Berry Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**. 49(11): p. 5348-5355.
87. Novak, I., et al., Ultrasound extracted flavonoids from four varieties of Portuguese red grape skins determined by reverse-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Analytica Chimica Acta*, **2008**. 630(2): p. 107-115.
88. Xie, D.-Y., et al., Role of Anthocyanidin Reductase, Encoded by BANYULS in Plant Flavonoid Biosynthesis. *Science*, **2003**. 299(5605): p. 396-399.
89. Sparvoli, F., et al., Cloning and molecular analysis of structural genes involved in flavonoid and stilbene biosynthesis in grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Molecular Biology*, **1994**. 24(5): p. 743-755.
90. Ibrahim, R.K., A. Bruneau, and B. Bantignies, Plant O-methyltransferases: molecular analysis, common signature and classification. *Plant Molecular Biology*, **1998**. 36(1): p. 1-10.
91. Bogs, J., et al., Identification of the Flavonoid Hydroxylases from Grapevine and Their Regulation during Fruit Development. *Plant Physiology*, **2006**. 140(1): p. 279-291.
92. Deluc, L., et al., The Transcription Factor VvMYB5b Contributes to the Regulation of Anthocyanin and Proanthocyanidin Biosynthesis in Developing Grape Berries. *Plant Physiology*, **2008**. 147(4): p. 2041-2053.
93. Jeong, S.T., et al., Expression of multi-copy flavonoid pathway genes coincides with anthocyanin, flavonol and flavan-3-ol accumulation of grapevine. *Vitis*, **2008**. 47(3): p. 135-140.
94. Coombe, B.G. and M.G. McCarthy, Dynamics of grape berry growth and physiology of ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2000**. 6(2): p. 131-135.
95. Robinson, S.P. and C. Davies, Molecular biology of grape berry ripening. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2000**. 6(2): p. 175-188.

-
96. Liao, H., Y. Cai, and E. Haslam, Polyphenol interactions. Anthocyanins: Co-pigmentation and colour changes in red wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1992**. 59(3): p. 299-305.
97. Mazza, G. and E. Miniati, Anthocyanins in fruits, vegetables, and grains, ed. . 1993, Boca Raton, FL.: CRC Press.
98. Mazzaracchio, P., et al., Interactions between anthocyanins and organic food molecules in model systems. *International Journal of Food Science & Technology*, **2004**. 39(1): p. 53-59.
99. Asen, S., R.N. Stewart, and K.H. Norris, Co-pigmentation of anthocyanins in plant tissues and its effect on color. *Phytochemistry*, **1972**. 11(3): p. 1139-1144.
100. Brouillard, R. and O. Dangles, Anthocyanin molecular interactions: the first step in the formation of new pigments during wine aging? *Food Chemistry*, **1994**. 51(4): p. 365-371.
101. Brouillard, R. and B. Delaporte, Chemistry of anthocyanin pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration, and tautomeric reactions of malvidin 3-glucoside. *Journal of the American Chemical Society*, **1977**. 99(26): p. 8461-8468.
102. Brouillard, R., et al., The co-pigmentation reaction of anthocyanins: a microprobe for the structural study of aqueous solutions. *Journal of the American Chemical Society*, **1989**. 111(7): p. 2604-2610.
103. Cai, Y., T. Lilley, and E. Haslam, Polyphenol–anthocyanin copigmentation. *Journal of the Chemical Society - Chemical Communications*, **1990**. 5: p. 380-383.
104. Cruz, L., et al., Vinylcatechin Dimers Are Much Better Copigments for Anthocyanins than Catechin Dimer Procyanidin B3. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**. 58(5): p. 3159-3166.
105. George, F., P. Figueiredo, and R. Brouillard, Malvin Z-chalcone: An unexpected new open cavity for the ferric cation. *Phytochemistry*, **1999**. 50(8): p. 1391-1394.
106. Mazza, G. and R. Brouillard, The mechanism of co-pigmentation of anthocyanins in aqueous solutions. *Phytochemistry*, **1990**. 29(4): p. 1097-1102.
107. Scheffeldt, P. and G. Hrazdina, Co-pigmentation of anthocyanins under physiological conditions. *Journal of Food Science*, **1978**. 43(2): p. 517-520.
108. Williams, M. and G. Hrazdina, Anthocyanins as food colorants: Effects of pH on the formation of anthocyanin-rutin complexes. *Journal of Food Science*, **1979**. 44(1): p. 66-68.
109. Dangles, O., et al., Two very distinct types of anthocyanin complexation: Copigmentation and Inclusion. *Tetrahedron Letters*, **1992**. 33(36): p. 5227-5230.
110. Escot, S., et al., 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(3): p. 153-159.
111. Lewis, C.E., J.R.L. Walker, and J.E. Lancaster, Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. *Food Chemistry*, **1995**. 54(3): p. 315-319.

112. Lambert, S.G., et al., Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chemistry*, **2011**. 125(1): p. 106-115.
113. Berké, B. and V.A.P. de Freitas, Influence of procyanidin structures on their ability to complex with oenin. *Food Chemistry*, **2005**. 90(3): p. 453-460.
114. Dangles, O. and H. El Hajji, Synthesis of 3-Methoxy- and 3-(β -D-Glucopyranosyloxy)flavylium Ions. Influence of the flavylium substitution pattern on the reactivity of anthocyanins in aqueous solution. *Helvetica Chimica Acta*, **1994**. 77(6): p. 1595-1610.
115. El Hajji, H., et al., 3prime-(beta-D-Glycopyranosyloxy)flavylium Ions: Synthesis and investigation of their properties in aqueous solution. Hydrogen bonding as a mean of colour variation. *Helvetica Chimica Acta*, **1997**. 80(2): p. 398-413.
116. Eiro, M.J. and M. Heinonen, Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50(25): p. 7461-7466.
117. Dangles, O., M.C. Wigand, and R. Brouillard, Anthocyanin anti-copigment effect. *Phytochemistry*, **1992**. 31(11): p. 3811-3812.
118. Figueiredo, P., et al., New aspects of anthocyanin complexation. Intramolecular copigmentation as a means for colour loss? *Phytochemistry*, **1996**. 41(1): p. 301-308.
119. Guiad, J., The colorimetric properties of the spectrum. *Philosophical Transactions of the Royal Society A* **1931**. 230: p. 149-187.

Capítulo 1.

Influencia de las condiciones climáticas en la composición fenólica de uvas de *Vitis vinifera* L. cv. Graciano.

1.1) OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo es realizar un análisis pormenorizado de la composición fenólica de hollejos y semillas de Graciano a lo largo del período de maduración. Se pretende conocer el comportamiento desde un punto de vista fenólico de este cultivar bajo condiciones climáticas distintas y en dos zonas de cultivo diferentes dentro de la D.O.Ca. Rioja.

Por otra parte, este capítulo sirve de apoyo al desarrollo del siguiente, donde se discute la influencia que tiene la composición fenólica y el estado de madurez de las uvas en sus vinos monovarietales.

Además, la determinación de los compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD-MS realizada en este capítulo, sirve como análisis de referencia en el **Bloque III** de este trabajo, que se fundamenta en la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS).

1.2) JUSTIFICACIÓN

Vitis vinifera L. cv. Graciano es un cultivar tinto minoritario, originario de la Rioja y de Navarra (1). Ha sido históricamente utilizado como complemento de Tempranillo en la D.O.Ca. Rioja. Su maduración tardía y su ciclo largo hacen que esté bien adaptado a esta zona. En la actualidad, se conocen una amplia gama de sinonimias, aunque sobre algunas de ellas todavía hoy surgen controversias (2, 3). Su importante potencial fenólico (4-7), ha despertado un creciente interés en los últimos años y sus vinos monovarietales están cada día mejor considerados. Así, el cultivo de Graciano ha aumentado ligeramente en los últimos años en las tres comunidades con zonas incluidas en la D.O.Ca Rioja pasando de un total de 993 ha en 2008 a 1046 en 2010.

Es sabido, entre los conocedores de este cultivar, que la maduración de sus uvas sufre grandes diferencias dependiendo de las zonas de cultivo y de las condiciones climatológicas del año.

La existencia de variaciones tanto cualitativas como cuantitativas en los compuestos fenólicos dependiendo de la zona de cultivo ha sido objeto de estudio en diversos cultivares (8-11). Un número considerable de investigadores ha orientado sus trabajos al entendimiento de la naturaleza de estos compuestos en las uvas y a los factores que influyen en su biosíntesis. De este modo, se ha comprobado que la composición fenólica está influida por muchos factores: suelo (12), temperatura (13-17), añada (18-20), intensidad luminosa (21-24), prácticas vitícolas (25-35), estado de desarrollo y vigor de la planta (23, 36-38), entre otros.

Por lo general, se acepta que el nivel de antocianos totales depende más de factores climáticos y culturales que del propio cultivar (8, 11, 39, 40). A pesar de ello, se tiende a considerar que todo cultivar conserva una serie de características en sus patrones fenólicos y que los cambios como respuesta al clima pueden ser específicos de cada uno (39, 41).

Durante la maduración de la uva, la concentración de procianidinas de la semilla tiene normalmente su máximo en el momento de envero y después va decreciendo hasta mantenerse relativamente constante en el momento de vendimia (31, 42-47). No obstante, estas variaciones no son uniformes y dependen de los años, encontrando incluso alguna tendencia al aumento desde mitad de maduración hasta la vendimia (20, 39). Por otro lado y de manera general, los antocianos de los hollejos se van acumulando a lo largo de la maduración hasta llegar a un máximo, para luego disminuir. Algunos autores indican que la proporción de los distintos antocianos permanece prácticamente invariable (12, 48). Sin embargo, otros señalan que no parece ser así, sino que las concentraciones de delphinidina, cianidina y petunidina alcanzan un máximo antes que las de peonidina y malvidina. Estas variaciones están relacionadas con las distintas enzimas implicadas en su síntesis como la metiltransferasa (49) (ver apartado biosíntesis de los compuestos fenólicos). Otras enzimas como la acetil y *p*-cumaroil transferasa están implicadas en el contenido relativo de antocianos acilados y no acilados, criterio que puede servir para diferenciar cultivares (50).

En cuanto a las modificaciones que sufren los flavonoles durante la maduración, no parece existir una tendencia clara. Unos autores observan un aumento de quercetina-3-*O*-glucósido con la maduración mientras que otros no aprecian ninguna variación, en cuanto a quercetina-3-*O*-glucurónido y otros flavonoles también existen controversias (51, 52).

En este contexto, nos parece interesante abordar el estudio de los cambios de composición fenólica que tienen lugar a lo largo de la maduración en el cultivar Graciano.

1.3) MATERIAL Y MÉTODOS

1.3.1 Localización geográfica

Se seleccionaron dos parcelas de *Vitis vinifera* L. cv. Graciano de acuerdo con la experiencia del responsable de viticultura de bodegas Roda S.A perteneciente a la D.O.Ca. Rioja. Estas parcelas presentan una alta homogeneidad individual pero elevada heterogeneidad entre sí en cuanto a características de maduración se refiere. Las diferencias son debidas principalmente a las características agro-climáticas de la zona donde se cultivan. En la **Figura 1.1** se presenta un mapa con las tres subzonas en las que está dividida la D.O.Ca. Rioja y la localización de los dos viñedos de estudio. El viñedo 1 se sitúa en una zona más oriental, muy cerca de la Rioja Baja, dentro de la subzona popularmente conocida como "Rioja Media". Esta zona tiene una influencia climática más mediterránea que la zona donde se encuentra el viñedo 2, de localización más occidental, que tiene una influencia casi atlántica. Además, la zona del viñedo 2, cerca de Haro (aprox. 500 m de altitud), está más elevada que la zona del viñedo 1 (Logroño) y es generalmente una zona más fría donde las uvas de Graciano, en ciertos años, no alcanzan la maduración deseada. Los suelos de los viñedos también presentan características diferentes, el del viñedo 2 es de textura franca y nada pedregoso sin embargo el del viñedo 1 es aluvial, de canto rodado, más ligero y calcáreo.

1.3.2 Toma de muestras

Las muestras de uva fueron recogidas a lo largo del período de maduración, desde envero hasta sobre-maduración. En el año 2008 se recogieron muestras en 7 puntos a lo largo de la maduración para el viñedo 1 y en 8 puntos para el viñedo 2. En el año 2009 fueron 6 los puntos de muestreo para el viñedo 1 y 7 para el viñedo 2. Las diferencias en el número de puntos de muestreo por año y parcela son debidas principalmente a la cinética de maduración. Según el año y la parcela, la maduración es más rápida y acontece antes o por el contrario puede ser más lenta y tardía. El muestreo se realizó de forma aleatoria recogiendo bayas en diferentes filas. Las cepas de los extremos de las filas fueron descartadas por tener un mayor vigor y no ser representativas de la parcela. Se recogieron bayas de las diferentes partes del racimo (hombros, punta, parte interna y parte más soleada).



Figura 1.1. Mapa de las tres subzonas diferenciadas dentro de la D.O.Ca. Rioja y localización de los viñedos de estudio.

1.3.3 Extracción compuestos fenólicos de las semillas

Las semillas fueron separadas de la pulpa y de los hollejos manualmente, después fueron congeladas y liofilizadas. Se trituraron para obtener un polvo homogéneo, a 2 gramos de ese polvo se adicionaron 20 mL de MeOH/ H₂O (75:25). Para favorecer la extracción se utilizó un homogeneizador (Polytron®). Después se ponían 15 minutos en el baño de ultrasonidos, se centrifugaban durante 10 minutos a 10.000 r.p.m y finalmente se recogió el sobrenadante. Este proceso se realizó tres veces para asegurar una extracción completa. El sobrenadante obtenido se concentró en el rotavapor y se llevó a un volumen final de 10 mL con H₂O ultrapura. Finalmente, la muestra se filtró (0.45 µm) y se analizó por HPLC-DAD-MS. Cada una de las muestras se extrajo por triplicado.

1.3.4 Extracción compuestos fenólicos de los hollejos

Los hollejos fueron separados manualmente, esto se hacía cuando las bayas comenzaban a descongelarse para conseguir unos hollejos con la menor cantidad de pulpa posible. Se maceraban 10 g de hollejos en metanol ácido (0.1% de HCl 12 M) a una temperatura de -20°C, se recogían las diferentes fases metanólicas y se filtraban a vacío para posteriormente incorporar un pequeño volumen de agua y evaporarlas en un rotavapor. Para asegurar la máxima extracción, este proceso se repetía entre 5-6 veces hasta que no se extraía color de los hollejos. Finalmente el concentrado se redisolvió en 100 mL de agua ultra pura. El extracto acuoso se diluía 1:2 con HCl 0.1 M, se filtraba a través de un filtro con tamaño de poro de 0.45 µm y se inyectaba en el cromatógrafo. Esta inyección servía para determinar los flavonoles y los antocianos.

En el caso de la determinación de flavonoles y ácidos fenólicos, previamente se realizaba una extracción en fase sólida (SPE). Con este fin se cogía una alícuota del extracto acuoso diluido y se realizaba dicha extracción mediante cartuchos de intercambio catiónico (Oasis® MCX). El cartucho era previamente acondicionado con 2 mL de metanol y 2 mL de agua ultrapura, después se cargaba con 2 mL del extracto diluido. Para eliminar azúcares y otras sustancias polares se pasaban 4 mL de agua ultra pura. Los flavonoles y ácidos fenólicos eran eluidos con metanol. El eluato se concentraba a vacío llevándolo hasta sequedad. Finalmente se redisolvió en 500 µL de

agua Mili-Q. Se filtraba (0.45 μm) y se inyectaba en el cromatógrafo. Las extracciones en fase sólida se realizaron por triplicado.

1.3.5 Análisis HPLC-DAD semillas

Los análisis se llevaron a cabo utilizando un cromatógrafo Hewlett-Packard 1200 provisto de bomba cuaternaria y de un detector de diodos en circuito integrado y acoplado a una estación de tratamiento de datos HP Chem Station (Rev. B.04.01). Se utilizó una columna de fase reversa Spherisorb® S3 ODS-2 C18, (4.6 x 150 mm, 3 μm) (Waters, Ireland) termostaticada a 25°C. La fase móvil utilizada fue (A) 2.5% ácido acético, (B) ácido acético (2.5%)/acetonitrilo (90:10, v:v) y (C) 100 % acetonitrilo. El gradiente de elución establecido fue de 0 a 100% de B en 5 min., de 0 a 15% de C en 25 min., de 15 a 50% de C en 5 min., finalmente isocrático en 50% de C durante 5 min. El flujo de trabajo era de 0.5 mL/min y el volumen inyectado de 100 μL . Las longitudes de onda establecidas como preferentes fueron 280 y 330 nm.

1.3.6 Análisis HPLC-DAD hollejos

El equipo utilizado fue el mismo que en el análisis de semillas (Hewlett-Packard 1200). Las condiciones cromatográficas para la determinación de flavanoles y ácidos fenólicos de los hollejos fueron las mismas que las utilizadas para las semillas.

Para la determinación de flavonoles y antocianos se utilizó una columna de fase reversa Aqua C18 (4.6 x 150 mm, 5 μm) (Phenomenex, Inc.) termostaticada a 35 °C. La fase móvil utilizada es (A) 0.1% de ácido trifluoroacético, (B) 100% acetonitrilo de calidad HPLC. El gradiente de elución fue el siguiente: isocrático 10% de B durante 3 min., de 10 a 15% de B en 12 min., isocrático 15% de B durante 5 min., de 15 a 18% de B en 5 min., de 18 a 30% de B en 20 min. y de 30 a 35 de B en 5 min. El flujo de trabajo fue de 0.5 mL/min y el volumen inyectado de 100 μL . La longitudes de onda establecidas como preferentes fueron 505, 520 y 360 nm.

1.3.7 Análisis de espectrometría de masas

El espectrómetro de masas utilizado fue un Finnigan LCQ (San José, CA) con una fuente de ionización ESI y un detector de masas con trampa iónica, controlados por el software LCQ Xcalibur. El gas auxiliar y el envolvente era nitrógeno con flujos de 6 y 1.2 L/min, respectivamente. El voltaje de la fuente era de 4.5 kV y el voltaje del capilar era de 28 V, la temperatura del capilar era de 270 °C. Los espectros fueron registrados en modo positivo entre 150 y 2000 m/z . El detector de MS fue programado para realizar una serie de 3 registros consecutivos: un registro completo, un MS² del ión más abundante en el primer registro y un MS³ del ión más abundante del MS² usando una energía de colisión normalizada del 45%.

1.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1 Condiciones climatológicas

La composición fenólica de las uvas está claramente influenciada por las condiciones climáticas, para explicar las diferencias de contenido entre las muestras y su evolución durante la maduración, es fundamental conocer la climatología de la zona donde han sido cultivadas. En la **Figura 1.2** se muestra la temperatura media y la pluviometría registradas en 2008 y 2009 en las regiones donde se localizan los dos viñedos estudiados. Los datos han sido proporcionados por Bodegas Roda S.A. (Haro, La Rioja).

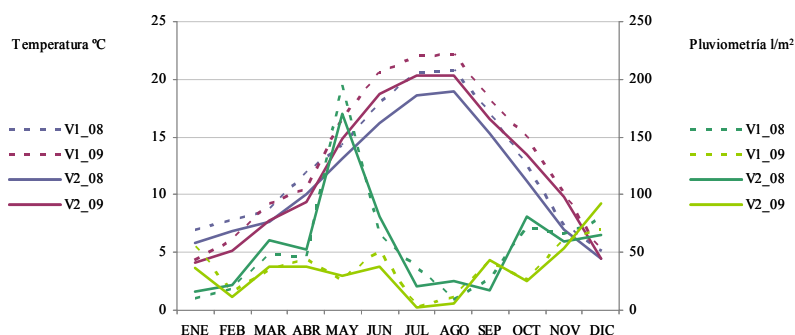


Figura 1.2. Condiciones climatológicas de los dos viñedos para cada año de estudio. (V1_08: viñedo 1 en 2008; V1_09: viñedo 1 en 2009; V2_08: viñedo 2 en 2008 y V2_09: viñedo 2 en 2009).

De forma general y atendiendo a las temperaturas, podemos decir que en el viñedo 1 la temperatura es ligeramente más elevada que en el viñedo 2 a lo largo de todo el año. Observando el período que va desde brotación hasta vendimia (abril-noviembre) se puede apreciar que en el año 2009 la temperatura media fue más alta que en 2008 en ambas parcelas. Pero sin duda, lo que más llama la atención es la pluviometría acaecida desde final de abril hasta final de Junio en 2008. Se superaron incluso los 150 l/m² en el mes de mayo lo que, como era de esperar, produjo un desborre y una brotación más tardía de lo habitual que pudo afectar a la maduración.

El año 2008 se presentó como un año atípico, de condiciones especiales, debido fundamentalmente a las altas lluvias de primavera y al verano poco caluroso. En la zona de Haro (viñedo 2) ni siquiera se alcanzaron los 20°C de temperatura media en verano. Estas diferencias en las condiciones climatológicas de ese año también fueron observadas por Meléndez *et al.*, en estudios realizados sobre la misma zona (53). Sin embargo el año 2009 se puede considerar como un año representativo de las últimas décadas en la región.

Podríamos considerar las condiciones y el viñedo 1 en 2009 como más favorables para alcanzar una madurez fenológica deseada y las condiciones y el viñedo 2 en 2008 como más desfavorables.

La **Figura 1.3** muestra el análisis de componentes principales realizado a partir de los datos climáticos registrados en cada una de las zonas y para cada uno de los años. Los parámetros considerados son humedad relativa media, pluviometría acumulada, radiación solar acumulada, temperatura media y velocidad del viento. La **Figura 1.3** revela que sin duda se trata de dos zonas y dos años de condiciones climáticas diferentes. Además, en el gráfico se puede ver que la influencia de la añada (PC 1) es más importante que la del viñedo (PC 2), ya que la mayor variabilidad viene explicada por el primer componente principal (55% frente al 28%). Asimismo las muestras de 2008 y de 2009 quedan claramente divididas por este PC 1. A su vez, el año 2008 es más heterogéneo que el 2009 ya que las muestras están más alejadas en el PC 1. Siguiendo el mismo razonamiento en el PC 2, se observa que las variaciones dentro del viñedo 2 son más grandes que en el viñedo 1.

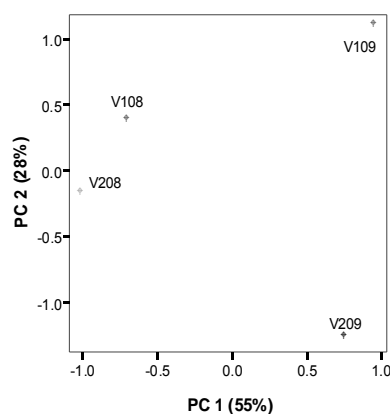


Figura 1.3. Análisis de componentes principales de los datos climáticos. (V108: viñedo 1 en 2008; V109: viñedo 1 en 2009; V208: viñedo 2 en 2008 y V209: viñedo 2 en 2009).

1.4.2 Composición fenólica de la semilla durante la maduración

En la **Figura 1.4** se muestra el perfil fenólico característico de un extracto de semillas de Graciano registrado a 280 nm. Se identifican un total de 38 compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD-MS, de los cuales dos de ellos corresponden a ácidos hidroxibenzoicos y el resto a procianidinas. En **Tabla 1.1** se presentan los datos

cromatográficos y de masas de compuestos identificados. Estos compuestos tienen su máximo a una longitud de onda próxima a 280 nm con excepción del ácido gálico (λ_{max} 272 nm) y del protocatéquico (λ_{max} 260 y 294 nm). La identificación se llevó a cabo atendiendo a estas características y por comparación con patrones disponibles en el laboratorio.

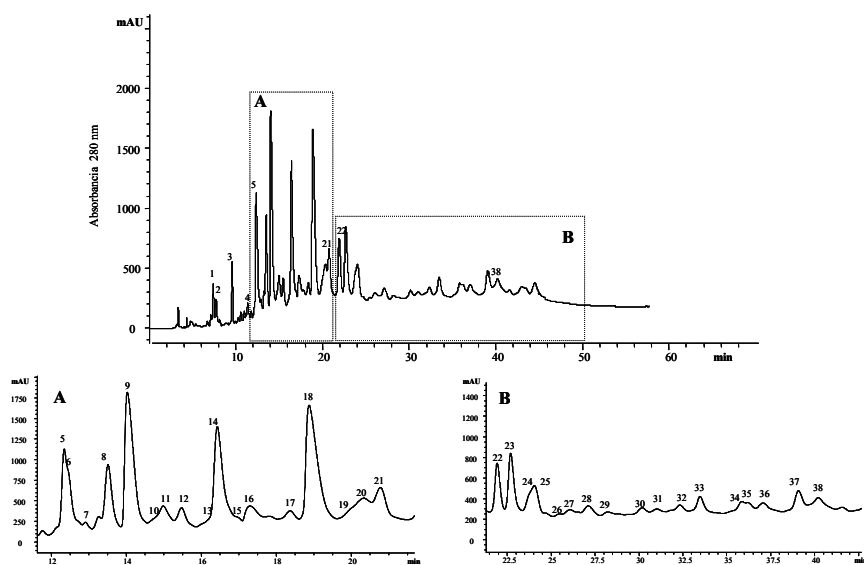


Figura 1.4. Cromatograma correspondiente a un extracto de semillas de Graciano.

Tabla 1.1. Características comatográficas y de masas de los compuestos fenólicos identificados en semillas de Graciano.

Pico	Rt (min)	[M-H] ⁺ (m/z)	Fragmentos MS ²	Compuesto
1	7.41	171		Ácido Gálico
2	7.71	867	715, 697, 579, 291	Trímero (C2)
3	9.59	155		Ác. Protocatéquico
4	11.39	1155		Tetrámero
5	12.35	579	427, 409, 291	Dímero (B1)
6	12.44	579	427, 409, 291	Dímero (B3)
7	12.91	867	715, 697, 579, 291	Trímero
8	13.52	867	715, 697, 579, 291	Trímero
9	14.03	291	165, 139, 123	(+)-Catequina
10	14.79	579	427, 409, 291	Dímero (B4)
11	14.99	579	427, 409, 291	Dímero (B6)
12	15.47	867	715, 697, 579, 291	Trímero
13	16.24	1443	723	Pentámero
14	16.42	579	427, 409, 291	Dímero (B2)
15	16.84	1155		Tetrámero
16	17.3	1731	867	Hexámero
17	18.36	1155		Tetrámero
18	18.87	291	165, 139, 123	(-)-Epicatequina
19	20.16	731	579, 439, 409, 291	B2 3-O-galato
20	20.32	1307		Tetrámero galoilado
21	20.77	867	715, 697, 579, 291	Trímero
22	21.93	867	715, 697, 579, 291	Trímero
23	22.69	731	427, 409, 579	B2 3'-O-galato
24	23.92	1155	867, 579, 291	Tetrámero
25	24.04	1019		Trímero galoilado
26	25.77	1307		Tetrámero galoilado
27	26.08	1883		Hexámero galoilado
28	27.12	1443		Pentámero
29	28.22	1731		Hexámero
30	30.18	1595		Pentámero galoilado
31	31.02	1731		Hexámero
32	32.33	1171		Trímero digaloilado
33	33.47	443	291	Epicatequina 3-O-galato
34	35.84	883	745	Dímero digaloilado
35	36.18	1747		Tetrámero digaloilado
36	37.05	1883		Hexámero galoilado
37	39.07	1019		Trímero galoilado
38	40.2	1307		Tetrámero galoilado

Rt: tiempo de retención; [M-H]⁺ ion molecularr cargado positivamente, fragmentos obtenidos en MS².

En la **Figura 1.5** se representan las modificaciones a lo largo del período de maduración de la (+)-catequina y la (-)-epicatequina. En las semillas Graciano, al igual que ocurre en otros cultivares, son los compuestos fenólicos mayoritarios (44, 47, 54-57). De manera general se considera que el monómero mayoritario en las semillas de uva es la (+)-catequina (58, 59), sin embargo puede darse el caso, como sucede en Graciano, que la (-)-epicatequina se encuentre en mayor concentración que la (+)-catequina (4, 5). Se puede ver que para el viñedo 2 los valores de (-)-epicatequina son durante todo el período de maduración superiores a los de (+)-catequina mientras que en el viñedo 1 no se aprecian casi diferencias.

Por otro lado y atendiendo a la añada se aprecia una clara influencia en el contenido de los monómeros. De modo que en 2008, de condiciones climatológicas relativamente frías (primavera muy lluviosa y verano poco caluroso), se obtienen valores mucho más altos que en 2009. A pesar de sufrir un descenso más acusado en estos compuestos en el año 2008 no se llega a obtener valores tan bajos como en años más soleados.

Parece apuntarse que la relación entre (+)-catequina y (-)-epicatequina podría estar más ligada al viñedo mientras que su contenido total y evolución estaría más unida a las condiciones climatológicas del año.

Los valores encontrados en el momento de vendimia están comprendidos entre 1.2-4.5 mg/g de semilla seca para catequina y entre 2.2-8.0 mg/g para epicatequina, según año y zona de cultivo. Los valores mínimos son cercanos a los encontrados por Monagas y colaboradores para este mismo cultivar (1.3 y 3.2 mg/g de semilla seca respectivamente) en el momento de madurez tecnológica (5).

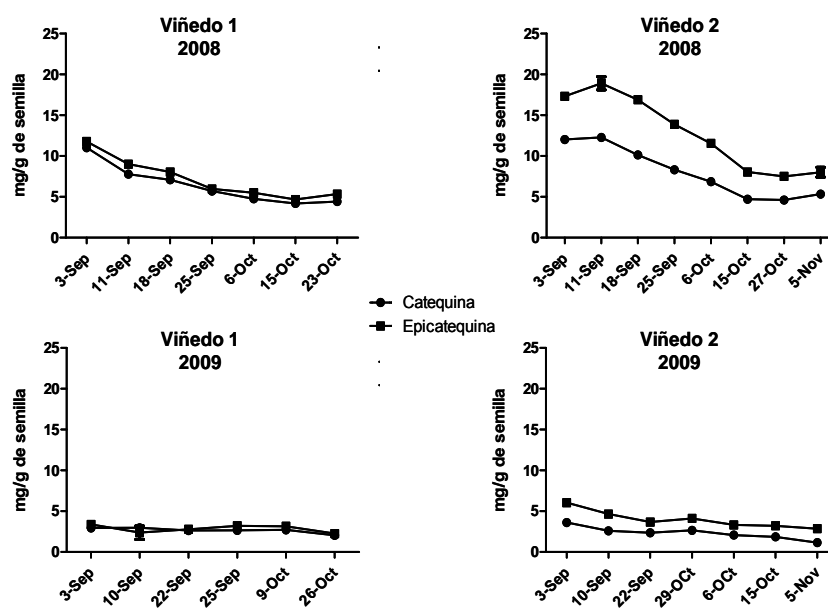


Figura 1.5. Modificación de la concentración de catequina y epicatequina a lo largo de la maduración en semillas de Graciano.

En el año 2009 los oligómeros no galoilados (**Figura 1.6**) se comportan de manera muy similar en ambos viñedos, los valores son parecidos a los obtenidos para el viñedo 1 en 2008. A diferencia de los estudios realizados por otros investigadores en este cultivar (5, 6), se encuentra una mayor concentración de trímeros que de dímeros, salvo en el caso del viñedo 1 en 2008.

La tendencia de estos compuestos a disminuir a lo largo de la maduración, es menor que en el caso de los monómeros y en ocasiones no se encuentran casi diferencias entre el momento de envero y de vendimia. Para el viñedo 2 en 2008 se observan las mayores diferencias entre inicio y final de madurez, como ocurría con los monómeros.

En el año 2008 (climáticamente desfavorable) el viñedo 2 sufre más variación que el viñedo 1 que se muestra más regular.

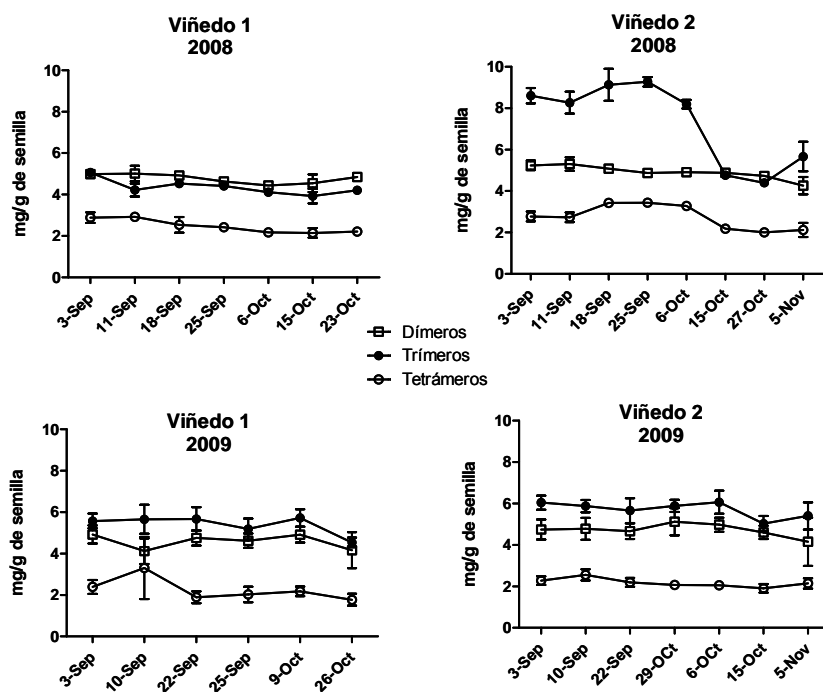


Figura 1.6. Modificación de los oligómeros no galoilados a lo largo de la maduración en semillas de Graciano.

En todos los casos, los tetrámeros tienen menores concentraciones que el resto de oligómeros, entre 6-9% del total de compuestos fenólicos, valores similares a los encontrados por Núñez y colaboradores (6).

En la **Figura 1.7** se muestra las variaciones de los compuestos galoilados a lo largo de la maduración. Se puede ver una tendencia a la disminución, más acusada en el año 2008. Al inicio de maduración, los compuestos galoilados totales en 2008 presentan valores muy superiores a 2009, sin embargo al final de la maduración son muy similares en todos los casos.

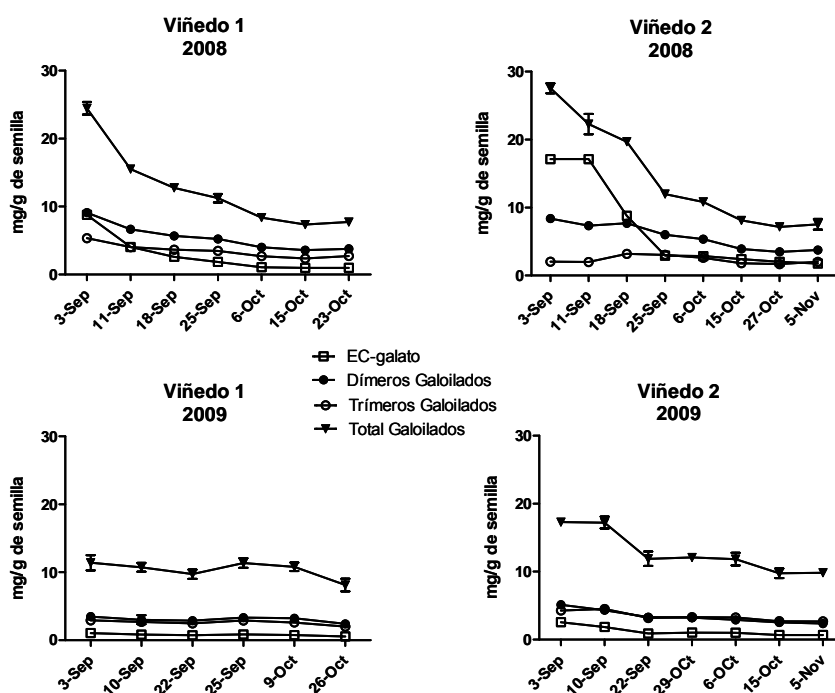


Figura 1.7. Modificación de los compuestos galoilados a lo largo de la maduración.

El porcentaje de compuestos galoilados en el momento de vendimia está entre 31-36% en 2009 y entre 21-26% en 2008, estos últimos datos son similares a los obtenidos recientemente por Chira *et al.* en Cabernet sauvignon y Merlot (60) y próximos a los encontrados por Nuñez *et al.* (15-20%) para este cultivar (6). Cabe destacar el alto contenido de epicatequina galato obtenido en las primeras fechas para el viñedo 2 en 2008.

En años de condiciones climatológicas "normales" la maduración de la semilla no presenta grandes diferencias entre los viñedos de estudio pero cuando el año es más anómalo (ver condiciones climatológicas 2008) aumentan las diferencias entre los viñedos, siendo el viñedo 2 en el que se observa más irregularidad en la composición fenólica de la semilla.

1.4.3 Composición fenólica del hollejo durante la maduración

ANTOCIANOS

En la **Figura 1.8** se puede ver un perfil característico de los antocianos encontrados en hollejos de Graciano. Las uvas de Graciano al igual que las de Garnacha, Mencía y Merlot contienen altas concentraciones de peonidina-3-glucósido, superiores al 12% en el momento de vendimia (61). La relación peonidina-3-glucósido/malvidina-3-glucósido puede servir como marcador para caracterizar el cultivar (7).

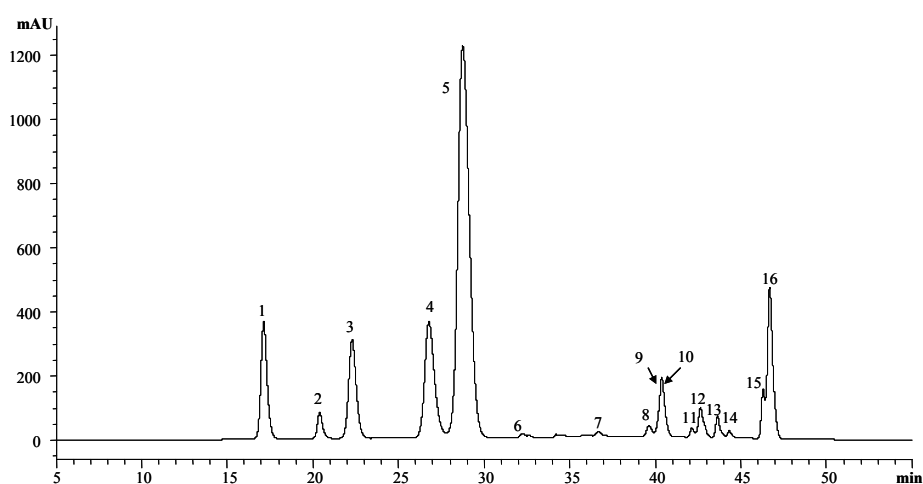


Figura 1.8. Antocianos identificados en hollejos de Graciano.

En la **Figura 1.9** se puede observar la evolución de los antocianos totales, glucosilados y acilados (acetilados y cumaroilados) a lo largo de la maduración. Atendiendo a los antocianos totales, parece claro que hay un efecto de la añada en la concentración de antocianos, como ya observaron otros autores (11, 28, 39, 62) apreciando una mayor concentración en 2009 que en 2008.

En la **Tabla 1.2** se presentan las masas y sus fragmentos y algunas características cromatográficas de los compuestos antocianínicos identificados en los extractos de hollejos.

Tabla 1.2. Características espectrales de los antocianos identificados en hollejos de Graciano.

Pico	<i>Rt</i> (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H] ⁺ (<i>m/z</i>)	Fragmentos MS ²	Compuesto
1	17.2	277, 342, 524	465	303	Delfinidina-3-glucósido
2	20.4	279, 516	449	287	Cianidina-3-glucósido
3	22.3	277, 347, 525	479	317	Petunidina-3-glucósido
4	26.8	280, 517	463	301	Peonidina-3-glucósido
5	28.8	277, 348, 527	493	331	Malvidina-3-glucósido
6	32.7	276, 346, 527	507	303	Acetato de Delfinidina
7	36.7	270, 529	521	317	Acetato de Petunidina
8	39.7	280, 522	505	301	Acetato de Peonidina
9	33.0	278, 350, 530	535	331	Acetato de Malvidina
10	33.2	282, 313, 531	611	303	Cumarato de Delfinidina- <i>trans</i>
11	40.4	282, 328, 534	655	331	Cafeoato de Malvidina- <i>trans</i>
12	42.6	284, 314, 524	595	287	Cumarato de Cianidina- <i>trans</i>
13	47.4	282, 313, 532	625	317	Cumarato de Petunidina- <i>trans</i>
14	44.3	280, 301, 535	639	331	Cumarato de Malvidina- <i>cis</i>
15	46.3	283, 313, 526	609	301	Cumarato de Peonidina- <i>trans</i>
16	46.7	282, 313, 532	639	331	Cumarato de Malvidina- <i>trans</i>

Rt: tiempo de retención, ion molecular [M-H]⁺ y fragmentos obtenidos en MS²

En 2008, en la primera fecha de muestreo, la síntesis de antocianos todavía no había casi comenzado (aprox. 50% de envero) mientras que a esas fechas en 2009 ya existía un 100% envero en ambos viñedos. Parece lógico indicar, por tanto, que años más soleados pueden inducir a una acumulación de antocianos más adelantada. El viñedo y año que inicialmente mostraba mayor concentración de antocianos (viñedo 1 de 2009) también mantiene, a lo largo de la maduración, mayor contenido que el resto. Parece apuntarse que, en Graciano, una temprana síntesis de antocianos favorece un mayor contenido final de los mismos. Este hecho se ve posiblemente incrementado por tratarse de un cultivar de ciclo largo.

En el momento de vendimia, la diferencia en el contenido de antocianos observada entre los viñedos, es mayor en 2008 que en 2009. Por otra parte, el viñedo 1 presenta diferencias entre años de aproximadamente un 30% y el viñedo 2 de hasta un 90%, lo que indica mayor variabilidad en este último. No obstante, señalar que las variaciones en el contenido de antocianos son habituales cuando se estudian años diferentes (8, 39).

El contenido de antocianos, en el momento de cosecha, se encuentra entre 750 mg/kg y 2100 mg/kg de uva. Este último dato es próximo al valor medio encontrado para este cultivar en el momento de cosecha, por González-Manzano (1900 mg/kg) pero inferior a los obtenidos por Nuñez *et al.* (2200-4300 mg/kg) (4, 7). Variación que puede ser debida a la zona de cultivo.

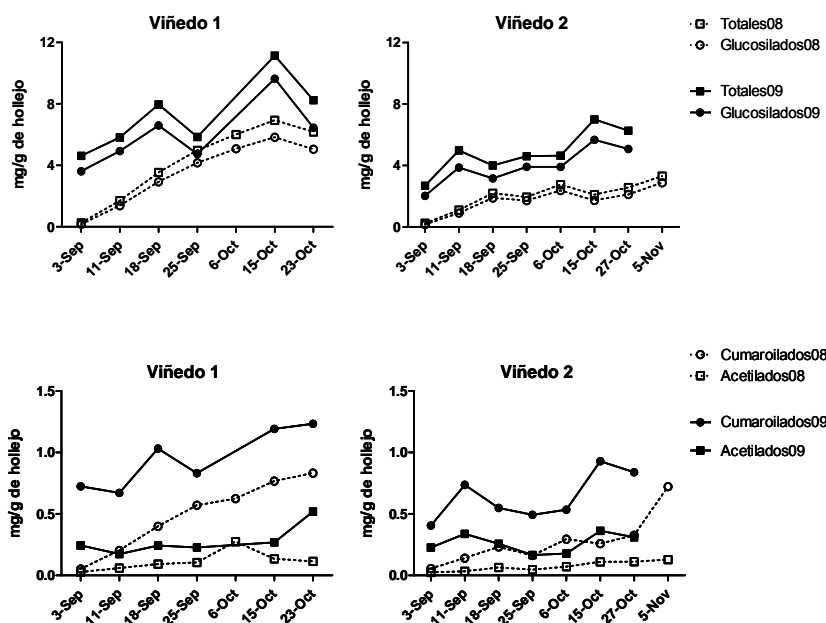


Figura 1.9. Evolución de la composición antocianica de los hollejos a lo largo de la maduración en los años 2008 y 2009.

Generalmente, el contenido total de antocianos alcanza un máximo a lo largo de la maduración para luego disminuir. Esto ocurre en la mayoría de los casos estudiados, salvo en el viñedo 2 en 2008 en el que existe tendencia a aumentar. Las uvas del viñedo 1 presentan concentraciones de antocianos totales en ambos años superiores a las del viñedo 2 y además su tasa de acumulación es mayor. Por otra parte, si se compara el descenso en el contenido en antocianos que se produce en los dos últimos puntos de muestreo en los años 2008 y 2009, parece apuntarse que cuando se alcanza un contenido más alto de antocianos la caída en sobremadurez es más acusada.

En resumen, podemos decir que tanto en condiciones favorables como desfavorables el viñedo 1 tiene una mayor capacidad de sintetizar antocianos que el viñedo 2.

En cuanto a los compuestos acilados, parece que en 2009, de temperaturas más elevadas, se favorece la síntesis de cumaroilados y acetilados, lo que estaría en

consonancia con los resultados obtenidos por Downey y colaboradores (13). Asimismo, Spayd *et al.*, observaron que las temperaturas más frías disminuían la concentración de los mismos (15) y Nuñez *et al.* (7) indicaban que si bien la relación entre los cumarilados y los acetilados puede servir para distinguir entre cultivares, esta relación está claramente influenciada por las condiciones climáticas.

A la vista de estos resultados hay que considerar que el efecto del terruño, combinación de suelo y clima, modifica la tasa de acumulación de los antocianos e implica que su concentración final pueda variar acusadamente en este cultivar.

PROANTOCIANIDINAS

En cuanto al contenido en flavanoles, una diferencia fundamental entre las semillas y los hollejos de uva es la presencia en estos últimos de galocatequinas y prodelfinidinas derivadas, las cuales están ausentes en la semilla. La acumulación de proantocianidinas en los hollejos parece ser independiente a la de las semillas pero en ambos tejidos su síntesis es temprana. Algunos autores señalan que alcanzan su nivel máximo cerca del envero para después disminuir (43). Esta tendencia, como hemos apuntado anteriormente parece clara en semillas pero no es tan evidente en hollejos (63).

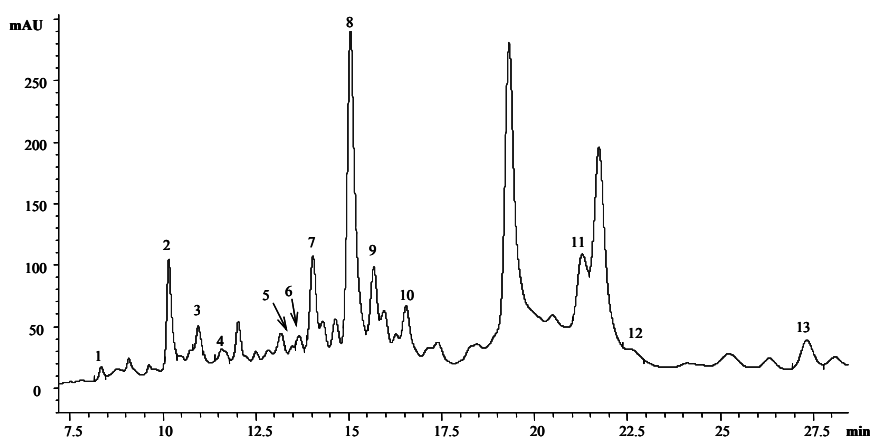


Figura 1.10. Perfil cromatográfico de los extractos de hollejo registrado a 280 nm.

En la **Figura 1.10** se muestra un perfil cromatográfico de extracto de hollejo registrado a 280 nm. En la **Tabla 1.3** se recoge la identificación de los picos numerados en la figura así como las características cromatográficas y de masas de los mismos. En total se han identificado 13 compuestos, la mayoría correspondientes a proantocianidinas.

Tabla 1.3. Identificación de ácidos hidroxibenzóicos y proantocianidinas del hollejo.

Pico	Rt (min)	[M-H] ⁺ (m/z)	Fragmentos MS ²	Compuesto
1	8.3	171		Ácido Gálico
2	10.2	595	303, 288	Prodelfinidina Dímera
3	11.0	307	151, 139	Galocatequina
4	11.6	579	427, 409, 291	Dímero
5	13.5	579	427, 409, 291	Dímero
6	13.7	579	427, 409, 291	Dímero
7	14.0	185		Galato de metilo
8	15.0	867	715, 697, 579, 291	Trímero
9	15.7	291	165, 139, 123	(+)-Catequina
10	16.5	867	715, 697, 579, 291	Trímero
11	21.3	867	715, 697, 579, 291	Trímero
12	22.4	291	165, 139, 123	Epicatequina
13	27.3	579	427, 409, 291	Dímero

Rt: tiempo de retención, ion molecular [M-H]⁺ y fragmentos obtenidos en MS²

En la **Figura 1.11** se recoge la evolución del contenido de procianidinas y prodelfinidinas a lo largo de la maduración. Se puede ver una mayor influencia de las condiciones del año que de la zona de cultivo, tanto en prodelfinidinas como en procianidinas. En 2008 las procianidinas obtienen valores mucho más elevados y con una tendencia diferente a los de 2009. Su contenido aumenta a lo largo de la maduración y al llegar a la madurez tecnológica disminuye. Sin embargo, en 2009 el contenido experimenta un ligero aumento al final de la maduración. La tendencia observada en 2008 ocurre en los dos viñedos; pero en el viñedo 2, zona conocida como de maduración más tardía, sucede algo después. Parece apuntarse que los años en los que se obtiene un alto contenido en antocianos, la concentración de procianidinas del hollejo es baja y *viceversa*.

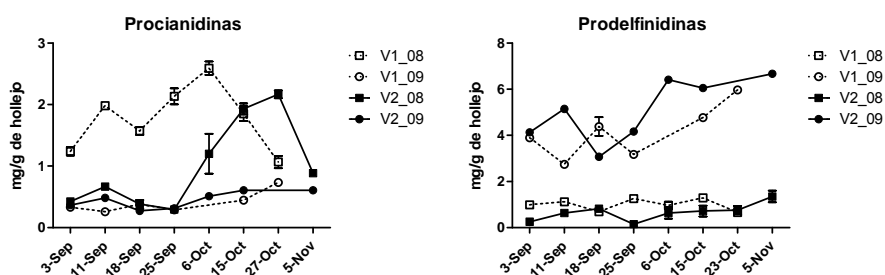


Figura 1.11. Contenido de procianidinas y prodelfinidinas del hollejo. V1_08: viñedo 1 2008; V1_09: viñedo 1 2009; V2_08: viñedo 2 2008; V2_09: viñedo 2 2009.

En el caso de las prodelfinidinas, existe un alto contenido en las muestras de 2009 y además sufren un mayor aumento con la maduración. Hay que recordar que en 2009 se registraron temperaturas más elevadas y una mayor acumulación de horas de luz (ver **Figura 1.2**). Estos resultados estarían en consonancia con otros estudios en los que se puso de manifiesto que las bayas con mayor luminosidad presentaban un contenido más alto de prodelfinidinas (13, 64, 65).

Un alto contenido en prodelfinidinas podría, por tanto estar asociado a buenas cosechas en cuanto a madurez fenólica se refiere.

FLAVONOLES

La síntesis de flavonoles tiene lugar en dos períodos. El primero es cercano a la floración y el segundo ocurre durante el desarrollo y la maduración (66). En la **Tabla 1.4** y en la **Figura 1.12** se muestra el perfil cromatográfico y las características cromatográficas, espectrales y de masas de los flavonoles identificados en los hollejos de Graciano. En total se han identificado 12 flavonoles, tanto derivados glicosilados como aglucones, de miricetina, quercetina, kaempferol e isorhamnetina.

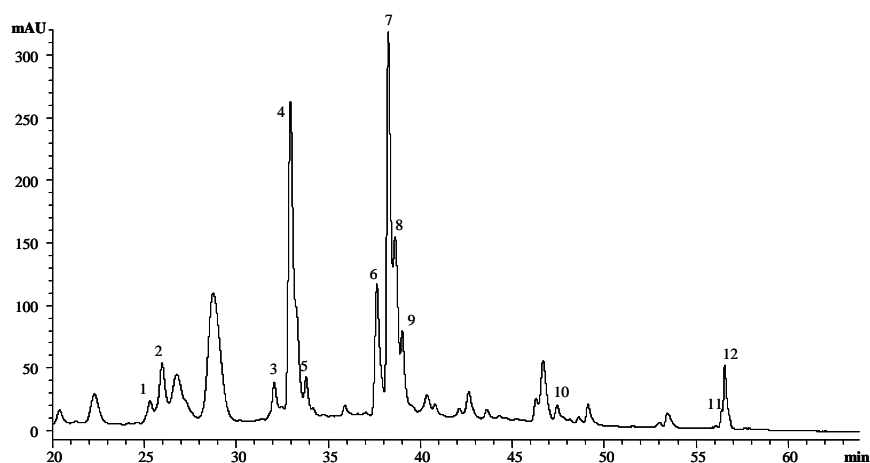


Figura 1.12. Cromatograma de los flavonoles identificados en hollejo registrado a 360 nm.

De acuerdo con la **Figura 1.13** parece que el contenido total de flavonoles del hollejo presenta una tendencia a aumentar durante la maduración. Si bien es cierto que antes del envero, tal y como ya apuntaron otros autores (66), ya se habían sintetizado una buena parte del contenido final de los flavonoles. En cuanto a las zonas de cultivo, no existen apenas diferencias entre ellas sin embargo las condiciones climatológicas de cada año parecen introducir mayor variabilidad. Así, en 2009, año con un verano más soleado y cálido que 2008, se favoreció la síntesis de flavonoles. Estos datos estarían en consonancia con estudios en los que se ha observado que una mayor exposición luminosa se traducía en un aumento de flavonoles (13, 15, 23, 24).

Tabla 1.4. Identificación de flavonoles en hollejos de Graciano.

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	[M-H]⁺ (m/z)	Fragmentos MS²	Compuesto
1	25.3	378	481	319	Miricetina-3-galactósido
2	26.0	318, 378	481	319	Miricetina-3-glucósido
3	32.1	300, 354	465	303	Quercetina-3-galactósido
4	33.0	300, 354	465	303	Quercetina-3-glucósido
5	33.8	256, 298, 355	479	303	Quercetina-3-glucurónido
6	37.5	348	449	287	Kaempferol-3-galactósido
7	38.4	348	449	287	Kaempferol-3-glucósido
8	38.8	296, 348	463	287	Kaempferol-3-glucurónido
9	39.2	254, 305, 374	319	153, 181	Miricetina aglucón
10	47.4	256, 371	303	153, 181,	Quercetina aglucón
11	56.5	266, 367	287	153	Kaempferol aglucón
12	56.7	302, 370	317	303	Isorhamnetina aglucón

Rt: tiempo de retención, ion molecular [M-H⁺] y fragmentos obtenidos en MS²

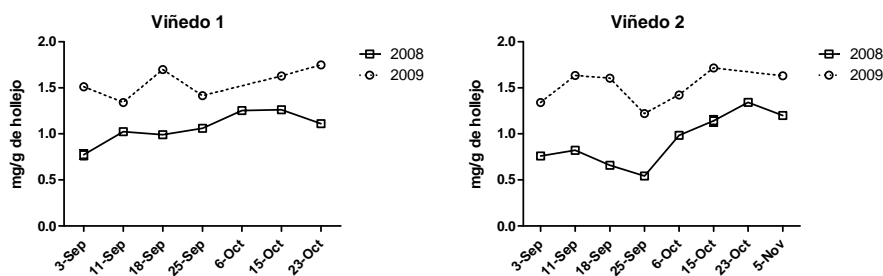


Figura 1.13. Evolución de los flavonoles a lo largo de la maduración.

ACIDOS FENÓLICOS

En la **Figura 1.14** se muestra el cromatograma de un extracto de hollejo registrado a 330 nm. Los picos numerados corresponden a los ácidos hidroxicinámicos. La identificación así como las características cromatográficas, espectrales y de masas de estos ácidos se recogen en la **Tabla 1.5**. Los ácidos determinados corresponden al ácido cutárico, caftárico, fertárico y cafeico. Así como a las hexosas del ácido cumárico.

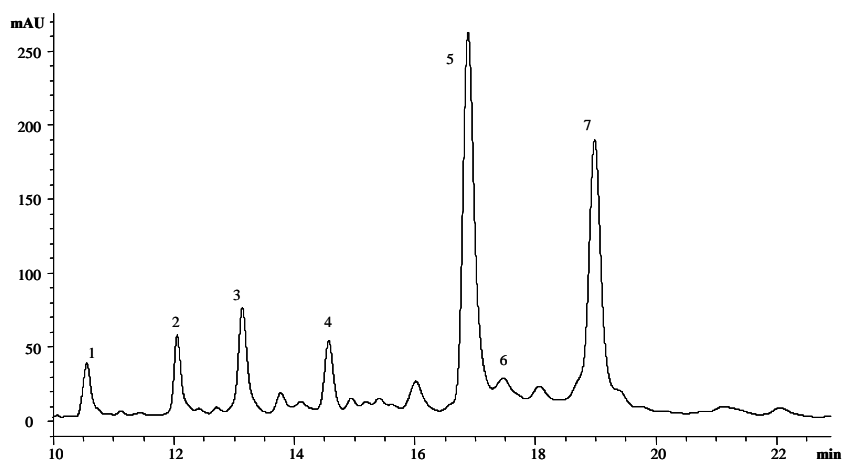


Figura 1.14. Cromatograma registrado a 330 nm correspondiente a un extracto de hollejos de Graciano. Los picos numerados corresponden a los ácidos hidroxicinámicos encontrados.

Tabla 1.5. Identificación y características cromatográficas, espectrales y de masas de los ácidos hidroxicinámicos encontrados en los hollejos de Graciano.

Pico	Rt (min)	λ_{max} (nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	Compuestos
1	10.5	302, 328	179	Ácido <i>trans</i> -caftárico
2	12.2	292, 314	295	Ácido <i>cis</i> -cutárico
3	13.3	292, 314	295	Ácido <i>trans</i> -cutárico
4	14.8	298, 328	325	Ácido fertárico
5	17.4	292, 308	325	Hexosa del ácido <i>p</i> -cumárico (<i>cis</i>)
6	18.1	298, 324	179	Ácido cafeico
7	19.5	292, 312	325	Hexosa del ácido <i>p</i> -cumárico (<i>trans</i>)

Rt: tiempo de retención, ion molecular [M-H]⁻ y fragmentos obtenidos en MS²

En la **Figura 1.15** presenta la evolución de la concentración de ácidos fenólicos, en hollejo a lo largo de la maduración. Los datos de los ácidos hidroxibenzoicos que aparecen en esta figura se corresponden con el cromatograma registrado a 280 nm (**Figura 1.10**). Parece que las condiciones climáticas anteriores al envero pueden influenciar la síntesis de ácidos fenólicos. De tal forma que primaveras menos lluviosas y veranos más secos y calurosos favorecen la concentración de los mismos. A la vista de los resultados expuestos no se puede decir que exista una tendencia clara para los ácidos fenólicos. Únicamente parece apuntarse que el viñedo 2 en 2008 (condiciones climatológicas más atípicas) presenta mayores variaciones de dichos compuestos. Esta muestra además sufre un descenso muy acusado de los ácidos hidroxicinámicos en el último punto de muestreo (5 de noviembre), fecha de vendimia tardía para esta zona, cercana a la sobremaduración.

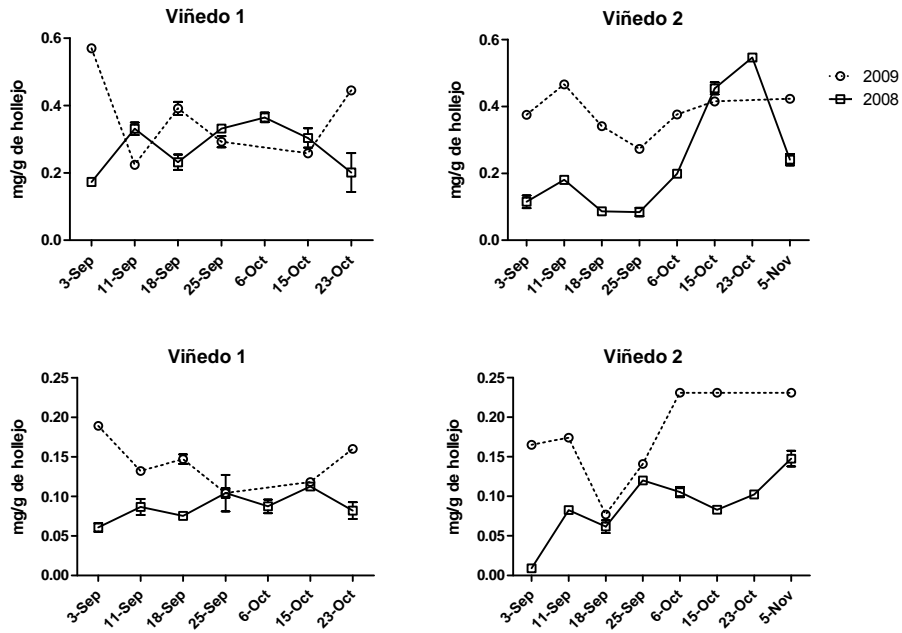


Figura 1.15. Evolución de los ácidos hidroxicinámicos (arriba) e hidroxibenzoicos (abajo) durante la maduración.

1.4.4 Estudio de correlación de los compuestos fenólicos de los hollejos

En la **Figura 1.16** se muestran las matrices de correlación de Pearson entre los compuestos individualizados y agrupados por familias. La nomenclatura utilizada es la siguiente: (1) procianidinas monómeras; (2) procianidinas dímeras; (3) prodelfinidinas; (4) ácidos hidroxibenzoicos; (5) ácidos hidroxicinámicos; (6) monoglucósido de delfinidina; (7) monoglucósido de cianidina; (8) monoglucósido de petunidina; (9) monoglucósido de peonidina; (10) monoglucósido de malvidina; (11) acetato de malvidina; (12) cafeoato de malvidina; (13) cumarato de cianidina-*trans*; (14) cumarato de petunidina-*trans*; (15) cumarato de malvidina-*cis*; (16) cumarato de peonidina; (17) cumarato de malvidina-*trans*; (18) antocianos glucosilados; (19) antocianos acetilados; (20) antocianos cumaroilados; (21) antocianos totales; (22) derivados de miricetina; (23) derivados de quercetina; (24) derivados de kaemferol; (25) derivados de isorhamnetina; (26) flavonoles totales.

Se observan diferentes estructuras en las matrices de correlación entre los compuestos del hollejo a lo largo de la maduración. En todos los casos las correlaciones significativas ($p < 0.05$) son siempre positivas. En el año 2008 las matrices son más parecidas entre sí que en el año 2009. La matriz más diferente es la correspondiente al viñedo1 en 2009 donde el número de correlaciones es menor.

A pesar de las diferencias entre las matrices de correlación se puede decir que todos los compuestos fenólicos del hollejo van en el mismo sentido puesto que no se aprecian correlaciones significativas negativas.

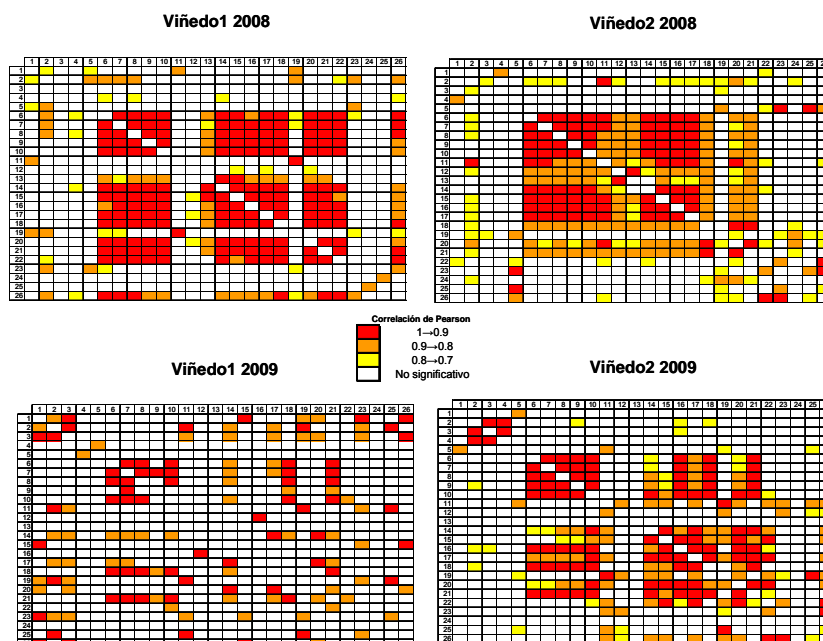


Figura 1.16. Mapas de correlación (Pearson) entre los compuestos fenólicos del hollejo.

1.4.5 Estudio de correlación de compuestos fenólicos de las semillas

En la **Figura 1.17** se muestran las correlaciones obtenidas entre la composición fenólica de las semillas. Los compuestos que se han correlacionado son los siguientes: (1) procianidinas monómeras; (2) procianidinas dímeras; (3) procianidinas trímeras; (4) procianidinas tetrámeras; (5) procianidinas dímeras galoiladas; (6) procianidinas trímeras galoiladas; (7) total de procianidinas galoiladas; (8) procianidinas totales; (9) dímero B1; (10) dímero B3; (11) trímero EEC; (12) catequina; (13) dímero B4; (14) dímero B2; (15) epicatequina; (16) B2 3-O-galato; (17) epicatequina 3-O-galato.

Al igual que en el caso anterior, se obtienen matrices de correlación diferentes, siendo también más parecidas las de 2008 que las de 2009. La matriz que corresponde al viñedo1 2008 es la que presenta más cantidad correlaciones significativas ($p < 0.05$). En esta matriz también se aprecia el mayor número de correlaciones significativas negativas, las cuales están siempre asociadas al dímero B2. También está asociado a

este compuesto el resto de casos en los que aparece correlación negativa. El viñedo1 de 2009 al igual que ocurría en los hollejos, tiene menor número de correlaciones significativas.

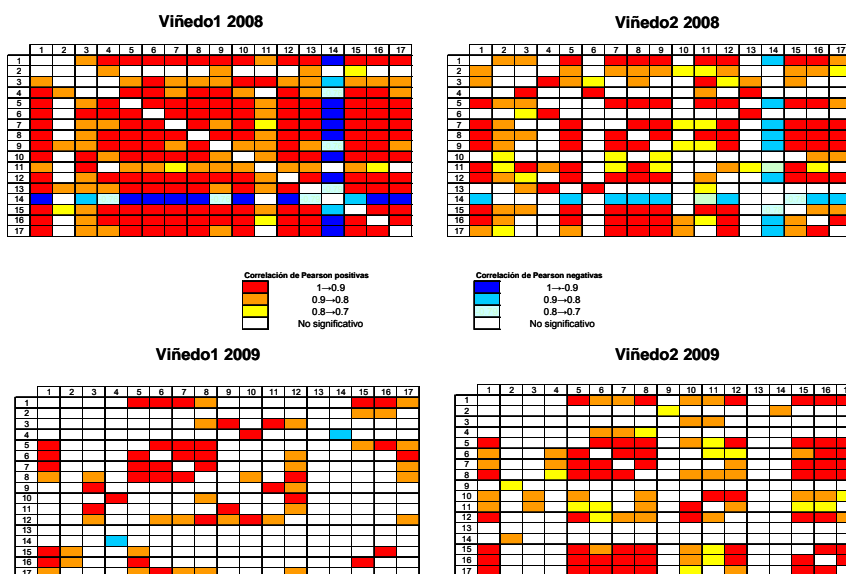


Figura 1.17. Mapas de correlación (Pearson) entre los compuestos fenólicos de la semilla.

1.4.6 Análisis de componentes principales de la composición fenólica del hollejo y de la semilla

Las Figuras 1.18 y 1.19 corresponden con el análisis de componentes principales de los compuestos fenólicos del hollejo y de la semilla respectivamente. La nomenclatura utilizada es la siguiente: la letra V hace referencia al viñedo 1 y la Z al viñedo 2. El número de la derecha hace referencia al punto de muestreo de más verde a más maduro (1-8). El número 2 que aparece a la izquierda de algunas letras indica que se trata del año 2009 la ausencia de éste número 2 indica que se trata del año 2008.

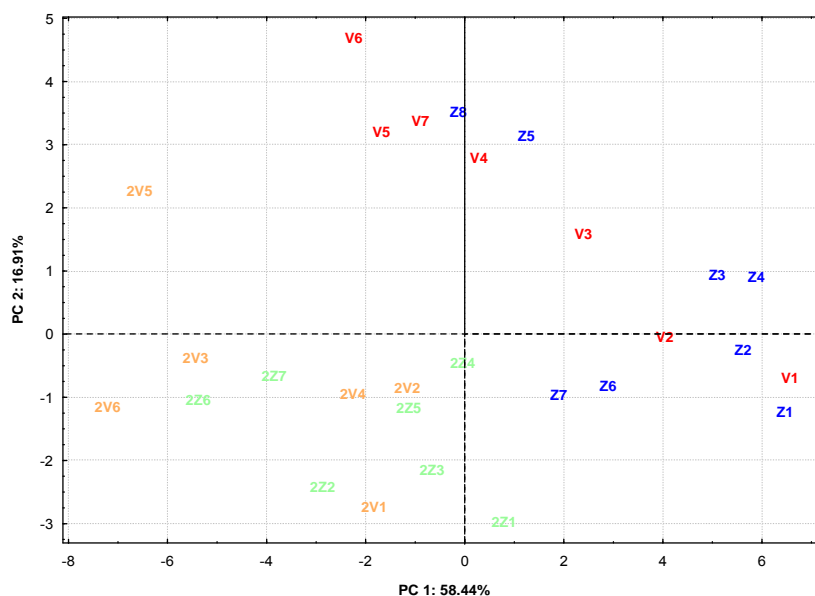


Figura 1.18. Análisis de componentes principales de los compuestos fenólicos del hollejo durante la maduración en los viñedos de estudio.

En el gráfico de la Figura 1.18 arriba se pueden apreciar dos grupos bien definidos que corresponden a los dos años de estudio. Las muestras correspondientes a 2008 se sitúan en la parte superior derecha del gráfico y las de 2009 en la parte inferior izquierda. Dentro de estas agrupaciones y a lo largo del PC 1 se puede apreciar la evolución temporal de las muestras hacia la madurez (de derecha a izquierda). Los viñedos siguen pautas diferentes de maduración. Así, se observa para los dos viñedos que en el año

2008 existe una mayor variación temporal que en 2009. Esto se pone de manifiesto en una mayor distancia entre muestras situadas en los extremos (V1 y V6 en 2008 y 2Z1 y 2V6 en 2009) en el año 2008 que en el año 2009. Tanto para 2008 como para 2009 parece que el viñedo 1 (letra V) presenta una mayor variación en los compuestos del hollejo a lo largo de la maduración que el viñedo 2 (letra Z), ya que las muestras aparecen más dispersas.

En la **Figura 1.19**, correspondiente a la composición fenólica de las semillas, se diferencian dos agrupaciones. Una referente al viñedo 2 en 2008 (arriba) y otra correspondiente al resto de casos. Si atendemos a PC 1 podemos ver que las variaciones en 2008 (letras Z y V) son mayores que en 2009 (letras 2Z y 2V). Asimismo, dentro de cada año, la variación del viñedo 2 (letra Z) es mayor que la del viñedo 1 (letra V).

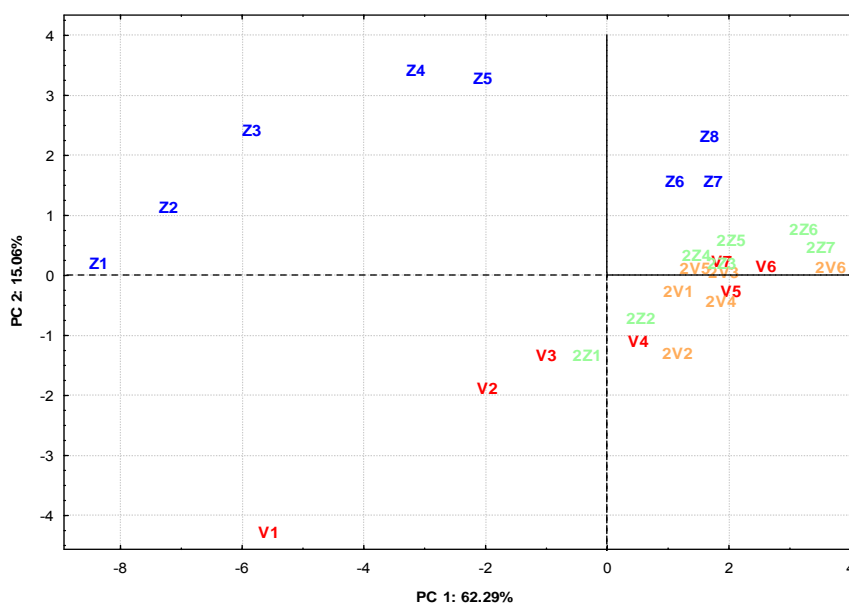


Figura 1.19. Análisis de componentes principales de los compuestos fenólicos de la semilla durante la maduración en los viñedos de estudio.

Parece apuntarse que dentro de un mismo año cuando la madurez fenólica en la semilla se alarga, en el hollejo parece más corta y *viceversa* (se aprecia mejor en el año 2008).

La **Figura 1.20** muestra los *loadings* del análisis de componentes principales realizado con los datos de composición fenólica (FlavaH: flavanoles del hollejo; Ac.F.H: Ácidos fenólicos del hollejo; FlavoH: flavonoles del hollejo; Ant: antocianos; FlavaS: flavanoles de la semilla), los datos tecnológicos de bodega (A.T: acidez total, d: densidad y pH) y los parámetros climáticos durante el período vegetativo (T^a: temperatura media, P: pluviometría, Rg: radiación solar acumulada).

Los resultados muestran una evidente oposición del pH frente a la acidez total y de la pluviometría frente a la radiación solar y la temperatura.

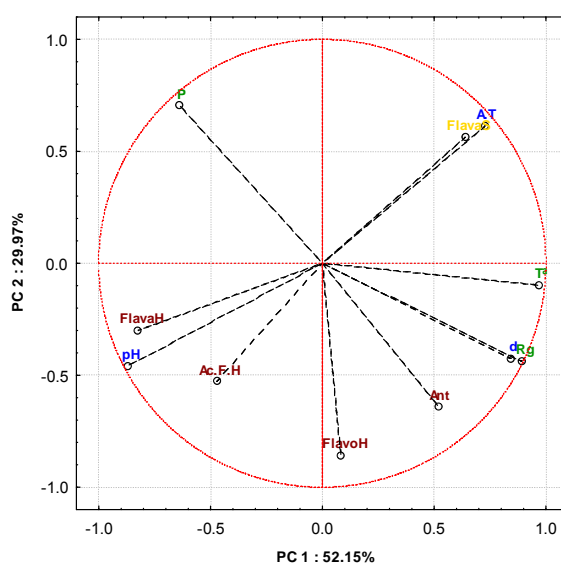


Figura 1.20. Loadings del PCA realizado a partir de datos de fenólicos, datos tecnológicos y parámetros climáticos.

Asimismo, se enfrentan el contenido en compuestos fenólicos del hollejo con los de la semilla, siendo el enfrentamiento más directo en los *loadings* de los flavanoles y de

los ácidos fenólicos. A la vista de los resultados expuestos, se pone por tanto de manifiesto la diferencia entre la maduración fenólica del hollejo y de la semilla. Esto sugiere la necesidad de realizar una evaluación independiente de la maduración del hollejo y de la semilla para determinar el momento óptimo de madurez fenólica de la uva.

1.5) CONCLUSIONES

En condiciones climatológicas como las acontecidas en 2008 (primaveras lluviosas y veranos poco calurosos), se sintetiza menos cantidad de compuestos fenólicos en el hollejo y el contenido final de los compuestos fenólicos, en los extractos de semillas, es mayor. Sin embargo, en las condiciones climatológicas de 2009 la acumulación de antocianos en el cultivar Graciano se favorece y el contenido de procianidinas en los extractos de semillas es menor. Estas últimas condiciones podrían estar asociadas *a priori* a una buena "madurez fenólica".

Un alto contenido en prodelfinidinas podría estar asociado a una buena madurez fenólica ya que las uvas presentan un mayor contenido de estos compuestos cuando el año es de condiciones climáticas favorables (mayor temperatura y acumulación de horas de luz).

El contenido en flavonoles en Graciano está más influido por las condiciones climatológicas del año que por su zona de cultivo.

En las regiones estudiadas, los años en los que las condiciones climatológicas son las habituales, se produce una menor variación en los compuestos fenólicos de las semillas que de los compuestos fenólicos del hollejo, a lo largo de la maduración. Sin embargo, en los años de condiciones más irregulares, las variaciones en las semillas pueden ser incluso mayores que en los hollejos.

Este estudio muestra las diferencias de maduración fenólica que existen entre las semillas y los hollejos. Esto sugiere la necesidad de realizar una evaluación independiente de la maduración del hollejo y de la semilla para determinar el momento óptimo de madurez fenólica de la uva.

Capítulo 2.

Influencia de la composición fenólica de las uvas de Graciano en el color y la composición del vino.

2.1) OBJETIVOS

El objetivo principal de este capítulo es conocer la influencia de la composición fenólica de las uvas de Graciano en el color y composición del vino. El estudio se ha realizado en dos años consecutivos y se han elaborado cinco vinos con diferente madurez fenólica, utilizando las mismas técnicas de vinificación. La evolución de los vinos ha sido evaluada desde el final de fermentación alcohólica hasta el embotellado.

2.2) JUSTIFICACIÓN

Los compuestos fenólicos extraídos de los hollejos y las semillas tienen una influencia trascendental en la calidad final del vino, debido a la alta implicación en aspectos fundamentales de calidad, como el color, la astringencia, el amargor y la capacidad para envejecer.

Como hemos visto en el capítulo anterior y había sido puesto de manifiesto en bibliografía, la composición fenólica del vino, está determinada por el grado de maduración de la uva (67-74). Se ha comprobado que uvas con un grado de madurez insuficiente tienen una menor extractabilidad de los antocianos y de las proantocianidinas de los hollejos y una extractabilidad más alta de las proantocianidinas de las semillas (75, 76). Asimismo, la heterogeneidad de la vendimia influye en la composición final del vino (77). Vendimias heterogéneas producen vinos más astringentes, amargos y de poco color, en definitiva de peor calidad. Igualmente ocurre con una vendimia de grado de madurez insuficiente.

Como consecuencia, en las bodegas existe una alta preocupación por conseguir una "maduración fenólica" adecuada. Este hecho, está además asociado en la actualidad a las demandas de los consumidores que, en los últimos tiempos, buscan vinos con más color, más cuerpo, tanicidad suave y aromas afrutados. Conocer el potencial fenólico de la uva

es fundamental para decidir como modificar las condiciones durante la fermentación (duración, frecuencia e intensidad de los remontados, temperatura), con el fin de obtener las mejores cualidades en función del tipo de vino a elaborar.

2.3) MATERIAL Y MÉTODOS

2.3.1 Muestras

Se han evaluado un total de cinco vinos (V9, Z9, V8, Z8, 2Z8) elaborados a partir de las uvas estudiadas en el capítulo anterior. Los vinos corresponden a dos años (2008 y 2009) y a dos parcelas (V = viñedo 1 y Z = viñedo 2) y en uno de los casos (parcela Z, año 2008) a dos fechas de vendimia diferentes (Z8 y 2Z8). Durante su elaboración y crianza se realizaron cinco puntos de muestreo. Los puntos corresponden al final de la fermentación alcohólica (FA), descube (D), fin de fermentación maloláctica (FML), seis meses en barrica (BAR) y un mes después del embotellado (EMB).

2.3.2 Análisis colorimétrico

Los espectros de absorción fueron obtenidos con un espectrofotómetro Hewlett-Packard UV-visible HP 8452 (Palo Alto, CA, USA), usando una cubeta de cuarzo de 1 mm de paso óptico. Para los cálculos colorimétricos se consideró el espectro visible (380-770 nm) registrando a intervalos de $\Delta\lambda = 1$ nm. Siguiendo la directrices de la CIE (Commission Internationale de l'Eclairage) se utilizó el iluminante D₆₅ y el observador estándar de 10°. Los parámetros CIELAB (L^* , a^* , b^* , C^*_{ab} , h_{ab}) y CIELuv (s^*_{uv}) fueron determinados usando el software original CromaLab® (78) y referidos a una cubeta de 1 mm. La saturación, ($s^*_{uv} = C^*_{uv}/L^*$) fue incluida en los análisis colorimétricos porque es considerada como el parámetro que mejor se correlaciona con la saturación visual percibida no pudiendo definir una correlación similar el espacio CIELAB (79).

2.3.3 Medida de la copigmentación

La magnitud del efecto de la copigmentación se estimó mediante la diferencia de absorbancias a 520 nm entre la muestra de vino (pH 3.6) a la que se ha añadido acetaldehído al 10% en proporción 1:100 (A_{acet}) y una muestra de vino diluido 1:20 (solución tampón) y multiplicada por el factor de dilución, según la ecuación de Boulton (80).

$$\text{Porcentaje de copigmentación} = [(A_{\text{acet}} - A^{20}) / A_{\text{acet}}] \times 100$$

2.3.4 Elaboración de los vinos

Los vinos fueron elaborados expresamente para este proyecto por Bodegas RODA S.A. (Haro, La Rioja). Se planificó un diseño experimental con la intención de obtener la mayor homogeneidad posible durante la elaboración y crianza en bodega. Los vinos fueron elaborados por duplicado en depósitos de acero inoxidable de 1200 litros de capacidad.

Las uvas eran evaluadas durante la maduración mediante los análisis rutinarios de la bodega (peso de la baya, acidez total, pH, intensidad colorante, etc.). Una vez determinada la fecha de cosecha se vendimiaba de forma manual, en cajas de 18 Kg que se transportaban rápidamente a la bodega. Se realizaba una selección y despallado y finalmente eran encubadas y ligeramente sulfitadas.

Se realizaron maceraciones pre-fermentativas de 4 días de duración a 14°C. Durante la fermentación (aproximadamente 7 días) los depósitos eran remontados con aireación mientras que durante la maceración post-fermentativa (7 días) los remontados se hicieron sin aireación. Después de este tiempo, los vinos fueron descubados a barricas nuevas de roble francés de 225 L, de tostado medio. El período de crianza en bodega fue de 12 meses y se realizó en una sala de barricas termostatizada. Se realizaron trasiegos periódicos cada 4 meses, manteniendo el nivel de sulfuroso libre en 30 mg/L. Finalmente el vino fue embotellado.

2.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Parámetros enológicos

En la tabla siguiente se muestran los datos medios determinados en bodega del mosto recién encubado. Como se puede apreciar, los mostos de partida presentan diferencias en sus parámetros enológicos. Cabe destacar la baja densidad de los mostos procedentes de la parcela Z en el año 2008 y el mayor grado alcohólico que siempre alcanzan los vinos de la parcela V frente a la Z. Estos datos están en concordancia con los resultados obtenidos en el **Capítulo 1** donde se mostraba que las condiciones climáticas de esta segunda parcela eran más desfavorables. También se pone de manifiesto el bajo pH de las muestras (3.1-3.5), característico de las uvas de Graciano.

Tabla 2.1. Datos registrados en bodega del mosto recién encubado.

<i>Muestras</i>	<i>Z8</i>	<i>2Z8</i>	<i>V8</i>	<i>V9</i>	<i>Z9</i>
Densidad	1080.0	1081.0	1096.5	1104.5	1100.0
Ac. Total (g/L tartárico)	4.3	3.6	4.3	4.3	4.2
pH	3.2	3.5	3.2	3.1	3.3
°Baumé	10.7	10.8	12.5	13.7	13.2
SO ₂ libre (mg/L)	31.0	13.0	25.5	27.0	25.5
Temperatura °C	20	20	18	20	14
FAN (mg/L)	193.9	184.8	149.8	129.0	140.0
Ac.Málico (g/L)	2.25	2.17	1.44	0.76	1.21
Ac.Tartárico (g/L)	6.06	5.55	4.58	11.27	4.75

2.4.2 Influencia de la composición fenólica de las uvas en el vino

ANTOCIANOS

En la **Figura 2.1** se puede observar la evolución de los antocianos, tanto de las uvas como de los vinos. En el gráfico de la izquierda (**Figura 2.1**) están marcadas las fechas de vendimia (V9, Z9, V8, Z8, 2Z8) para cada parcela y cada año. Se puede apreciar que el contenido de antocianos en el momento de cosecha es diferente en cada caso. Lógicamente, dicha variabilidad es consecuencia de las diferentes condiciones

edafoclimáticas de las muestras (años 2008 y 2009; parcelas V y Z) y en el caso de Z8 frente a 2Z8, del diferente momento de vendimia seleccionado para el estudio.

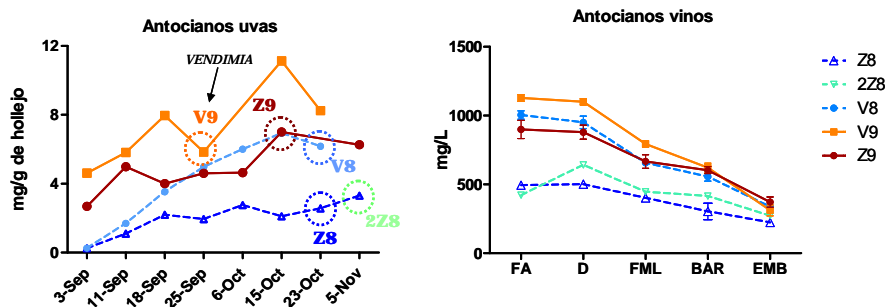


Figura 2.1. Evolución de los antocianos en uvas y vinos.

De forma general, observamos que, en el momento de cosecha, las muestras que presentan un menor contenido de antocianos en las uvas (2Z8 y Z8) también tienen una menor cantidad en los vinos recién fermentados (FA). La parcela Z del año 2008, en sus dos fechas de vendimia, presenta los menores contenidos de antocianos en uvas. Sin embargo, la parcela Z en 2009 es la que contiene la mayor cantidad de estos compuestos en el momento de cosecha, aunque esto no tiene equivalencia en el vino (vinos procedentes de V8 y V9 presentan mayor contenido). Al comparar el contenido de antocianos de las uvas y del vino (en vendimia y FA, respectivamente) se obtuvo que las muestras V9 y Z8 eran las que mejor habían cedido estos compuestos, seguidas de V8.

Se ha postulado que la madurez celular de la uva depende principalmente de la fecha de vendimia (81, 82) y que la extracción de antocianos aumenta con el tiempo de maduración de la uva como consecuencia de la degradación de la pared celular por enzimas pectolíticas (83, 84). En este estudio, al finalizar la fermentación alcohólica (FA) todos los vinos, a excepción de 2Z8, parece que habían extraído el máximo de antocianos posible ya que en el descube presentan igual o menor contenido de los mismos. Sin embargo, en 2Z8 sigue aumentando el contenido en antocianos hasta el descube (D), lo que podría estar ligado a su tardía fecha de cosecha (5 de noviembre) y por tanto a una mayor degradación de estructuras celulares que favorecería la liberación

de antocianos. Por otro lado, tampoco se aprecia una relación clara entre la facilidad de extracción y la cantidad de azúcar acumulada en la uva, lo que estaría en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores (82, 85).

En cuanto a la evolución del vino, observamos que en todas las muestras hay tendencia a disminuir el contenido de antocianos a lo largo de la vinificación, situándose a niveles similares en el punto de embotellado (EMB). Esta disminución es más acusada en los vinos que tenían un mayor contenido inicial. Han sido, por tanto, más inestables en este período de tiempo.

En la **Figura 2.2** se puede observar un descenso muy acusado de los antocianos monoglucósidos no acilados. Las muestras V9 y V8 son las que experimentan un descenso más acusado. El vino V9 pasa de casi 900 mg/L a cerca de 200 mg/L y el vino V8 de aproximadamente 800 mg/L a 200 mg/L. En las muestras correspondientes al viñedo V, se extraen buena cantidad de antocianos, pero resultan inestables con el tiempo.

En cuanto al contenido en antocianos acetilados y cumaroilados también desciende a lo largo del muestreo, si bien, de forma menos acusada. De forma general, parece apuntarse que los antocianos no acilados son menos estables que los cumaroilados y estos a su vez, menos que los acetilados. Asimismo, al establecer la relación entre el contenido de estos compuestos en uvas (comparar con figura 1.9) y el contenido en vino, parecía apuntarse una mejor extractabilidad de los compuestos acetilados frente a los cumaroilados.

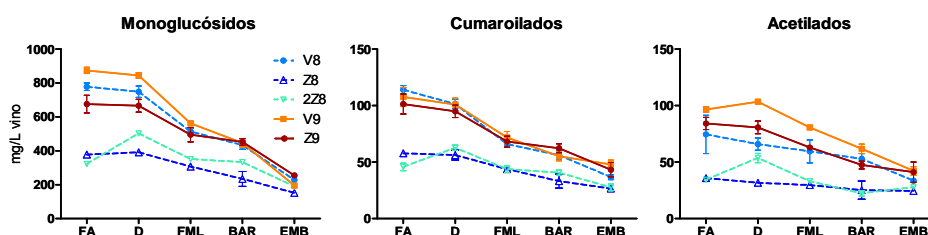


Figura 2.2. Evolución de los antocianos monoglucósidos, cumaroilados y acetilados en el vino.

FLAVONOLES

La diferencia en el contenido en flavonoles de las muestras en el momento de cosecha es menor que en el caso de los antocianos (**Figura 2.3**). Como hemos visto en el capítulo anterior, la máxima variación de estos compuestos viene dada por la influencia de la añada que va a repercutir considerablemente en el contenido final de los vinos.

Un alto contenido de flavonoles en las uvas no siempre conduce a contenidos elevados en el vino. Por ejemplo, en el caso de V8 a pesar del bajo contenido en las uvas, el vino presenta un alto contenido relativo, por lo que proporcionalmente se ha extraído más cantidad que en el resto de los casos. Por un lado y de forma general, parece que la extractabilidad relativa de antocianos y flavonoles es similar, pero en ocasiones, como en el caso de V8, la extracción de flavonoles está ligeramente más favorecida en relación a la de antocianos (**Figura 2.1** y **Figura 2.3**). Hay que señalar que en V8 se observó una buena cesión de antocianos de las uvas al vino, si bien mucho menos importante que la que se observa para el caso de los flavonoles.

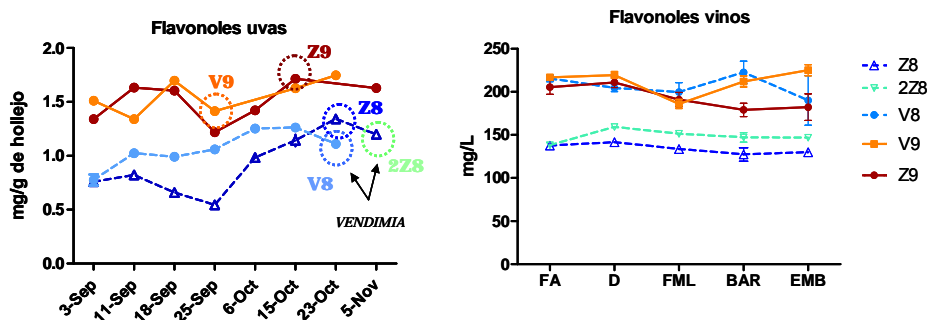


Figura 2.3. Evolución de los flavonoles en uvas y vinos.

En los flavonoles, al igual que ocurre en los antocianos, tampoco parece existir una relación entre la facilidad de extracción y el contenido de azúcar en la uva. Al igual que ocurría para los antocianos, la muestra 2Z8, a diferencia del resto, continúa extrayendo

flavonoles hasta el momento del descube. Como se señaló, esto podría estar ligado a su fecha más tardía de vendimia.

Por otra parte, señalar que los flavonoles parecen ser compuestos poco reactivos ya que durante la vinificación y el envejecimiento en barrica son muy estables y su contenido sufre pocas modificaciones.

FLAVANOLES

En cuanto a las catequinas y proantocianidinas, es bien sabido que su concentración en el vino viene determinada tanto por su contenido en semillas como en hollejos. Hay que tener en cuenta que la extracción de las procianidinas de las semillas está condicionada por la presencia de alcohol (75, 86) y que su extracción apenas tiene lugar en las primeras fases de la fermentación, sino cuando se alarga el proceso de maceración post-fermentativa.

Algunos autores han realizado ensayos con maceraciones de hollejos y de semillas de diferente grado de madurez y bajo diferentes grados alcohólicos (86, 87). Se ha visto que a medida que aumenta el grado de madurez del hollejo se incrementa la cantidad de taninos cedida al medio y lo mismo ocurre cuando se alarga la maceración, hasta un momento a partir del cual se estabilizaba. Con las semillas se ha visto algo similar, a medida que aumenta el tiempo de maceración, se extrae más cantidad. Sin embargo, cuanto más verde está, hay un mayor aporte de tanino. En disoluciones modelo, se ha estimado que con maceraciones largas (tres semanas) se puede llegar a obtener hasta un 70% del tanino procedente de la semilla de uvas verdes y un 50% con uvas maduras (87). En los ensayos realizados por González-Manzano (86) tras una semana de maceración la contribución de la semilla madura al total de flavanoles era del 82% y sobrepasaba el 90% cuando la maceración se alargaba 3 semanas.

Procianidinas

El contenido de procianidinas en hollejos es menor que en semillas. A pesar de esto, las del hollejo son una fuente importante en el vino debido a su fácil extracción (5,

74), por lo que, representan un componente muy importante en las características organolépticas del vino (88).

En la **Figura 2.4** se muestra el contenido de procianidinas de la semilla y del hollejo en el momento de vendimia, además del contenido y evolución de estos compuestos en el vino. El alto contenido de procianidinas del hollejo en 2008 no se ve reflejado en los vinos elaborados ese año, puesto que al final de alcohólica (FA) tienen menor cantidad que los de 2009 (especialmente V8). Es posible que se haya dificultado la extracción desde el hollejo debido a la peor maduración que hubo en 2008 frente a 2009 (ver capítulo anterior).

Atendiendo a las semillas, a pesar de existir una concentración similar en todos los casos en el momento de vendimia, es posible que el aporte al vino no haya sido el mismo, debido a las diferencias en cuanto a madurez de la uva. Así, es posible que en 2008 las semillas que eran más verdes hayan liberado taninos durante la maceración post-fermentativa, hasta el descube (D) y esta sea la causa del aumento en el contenido de procianidinas en los vinos V8 y Z28 en esa etapa (**Figura 2.4**).

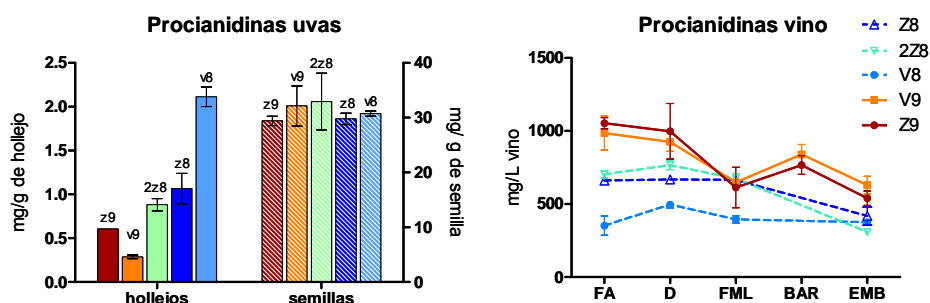


Figura 2.4. Contenido de procianidinas en hollejos y semillas en el momento de cosecha y su evolución en el vino.

En cuanto a la evolución de las procianidinas a lo largo de la vinificación, durante el período de crianza observamos que todas las muestras tienen una tendencia a disminuir. Esto es probablemente debido a la combinación o adsorción de estos compuesto fenólicos con sólidos, proteínas o incluso con levaduras y bacterias lácticas.

También puede deberse a una posible oxidación o polimerización con otros compuestos (74, 89). La disminución es más acusada en las muestras con un contenido inicial más alto, al igual que ocurría con los antocianos.

En la **Figura 2.5** se puede observar con más detalle la evolución de estos compuestos agrupados por su grado de polimerización desde monómeros hasta trímeros. Al establecer la relación entre el contenido de monómeros, dímeros y trímeros de procianidinas en uvas (ver figura 1.6) y el contenido en vino al final de fermentación alcohólica, parecía apuntarse una mejor extractabilidad de los trímeros frente a los dímeros y de éstos frente a los monómeros.

Cabe destacar el aumento de trímeros que se observa en la muestra correspondiente al momento de descube, lo que podría indicar una cesión de estos compuestos durante la maceración post-fermentativa. Probablemente, la fuente de estos compuestos sean las semillas. Por una parte se postula que la liberación de los flavanoles de la semilla se produce principalmente en esta etapa de la vinificación y por otra, como se ha señalado anteriormente, el contenido de trímeros en las semillas de Graciano es elevado (ver figura 1.6).

En cuanto a la evolución de estos compuestos, los monómeros sufren menor variación que los dímeros y estos a su vez menos que los trímeros, lo que parece indicar, que estos últimos sean más reactivos y/o más lábiles.

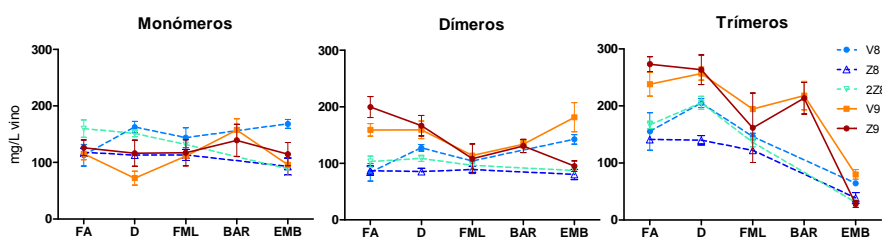


Figura 2.5. Evolución de las procianidinas en el vino según su grado de polimerización.

Prodelfinidinas

En ocasiones, el contenido en prodelfinidinas se ha utilizado como marcador para determinar el contenido de taninos del vino que procede de la semilla y del hollejo. Asumir esta hipótesis es arriesgado porque la extracción de los compuestos fenólicos puede variar según la estructura de cada familia y dentro de estas según su grado de polimerización (90). Además, la cantidad de prodelfinidinas cedidas al vino no siempre es proporcional con su contenido en uvas (**Figura 2.6**). Así, la muestra V9 cede proporcionalmente mayor cantidad de prodelfinidinas que la muestra Z9 y las muestras de 2008 ceden hasta un 65% más de estos compuestos. Los datos sugieren que la extractabilidad de prodelfinidinas tampoco estaría en relación con la madurez glucosídica ya que las muestras del año 2008 tenían menor contenido en sólidos solubles (**Tabla 2.1**). Las muestras de maduración más larga (Z28 y Z8), independientemente de su contenido en sólidos solubles, podrían tener más facilidad para liberar prodelfinidinas, ya que a mayor tiempo de permanencia en el viñedo, las uvas presentan mayor degradación de la pared celular (83, 84). Esto también parecía apuntarse anteriormente en el caso de los antocianos y los flavonoles.

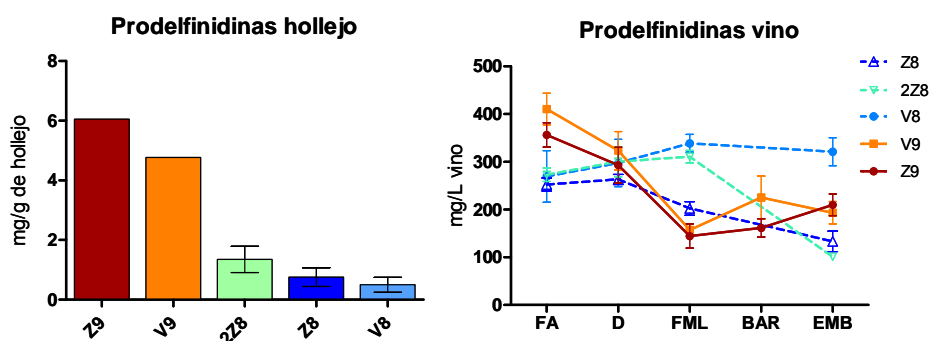


Figura 2.6. *Prodelfinidinas del hollejo en el momento de cosecha y su evolución en el vino.*

La extractabilidad de las principales familias de compuestos fenólicos no parece estar relacionada directamente ni con su contenido total ni con la cantidad de azúcar de la baya, por tanto deben existir otros factores que facilitan o dificultan la misma. Entre ellos debe considerarse la dureza del hollejo, el grosor y su facilidad para dilacerar (91,

92). En este sentido, algunos estudios bibliográficos (82, 92), señalan que el contenido de azúcar de la baya está directamente relacionado con el grosor del hollejo y este a su vez tendría una relación indirecta con el porcentaje de extracción.

Hay que recordar que en 2009, la maduración estuvo favorecida con respecto a 2008 debido a las condiciones climatológicas y que su contenido en azúcar era mayor (ver tabla 2.1). En la muestra 2Z8 que permaneció más tiempo en la viña y por tanto seguramente presentara una mayor degradación de la pared celular de los hollejos, podría enmascarse este efecto.

En relación a la evolución de las prodelphinidinas en los vinos, parece apuntarse una disminución con el envejecimiento. Se observa que los vinos que tenían un contenido más alto al inicio de la vinificación descienden rápidamente mientras que los vinos con menor contenido inicial lo mantienen durante más tiempo.

ÁCIDOS FENÓLICOS

Según la bibliografía, el contenido en ácidos fenólicos presenta gran variabilidad dependiendo del cultivar, el clima, las condiciones de maduración, etc. Por tanto, no es de extrañar que se encuentren grandes diferencias entre las concentraciones publicadas para diferentes tipos de vino.

Entre los ácidos hidroxibenzoicos, el ácido gálico suele ser el más abundante seguido del ácido protocatéquico. Entre los hidroxicinámicos el ácido *trans*-caftárico es predominante, llegando a representar un 50% del total de estos ácidos (93).

En la **Figura 2.7** podemos observar que las muestras de 2009 tienen contenidos de ácidos hidroxibenzoicos más bajos que de hidroxicinámicos, lo que está de acuerdo con los datos encontrados en bibliografía (93). Sin embargo, en 2008 los contenidos de hidroxibenzoicos son mucho más elevados que los de hidroxicinámicos, lo que podría ser achacado a las condiciones climatológicas de ese año. A lo largo de la vinificación, el contenido de ácidos hidroxibenzoicos parece menos estable, al menos en las muestras correspondientes a 2008. Por otro lado, el aumento que se aprecia en los ácidos hidroxicinámicos puede ser debido a la hidrólisis de otros compuestos del vino. Así,

otros autores habían observado un incremento del ácido *trans-p*-cumárico durante el envejecimiento del vino, asociado a la desaparición de antocianos cumarilados (94).

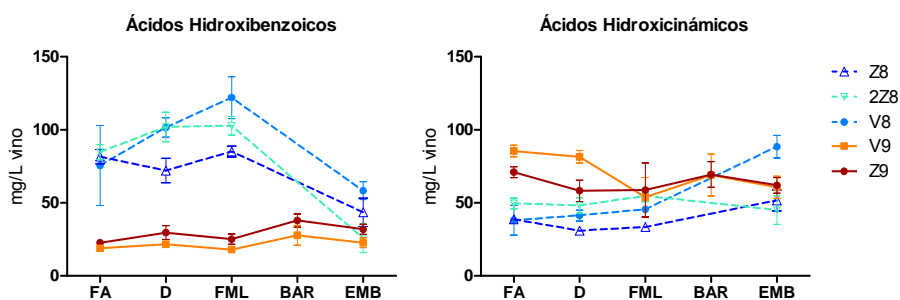


Figura 2.7. Evolución de los ácidos fenólicos en el vino.

A tenor de los resultados obtenidos en este estudio de la influencia de la composición fenólica de las uvas en el vino, se puede apuntar que la facilidad de extracción de los compuestos fenólicos de las uvas no está relacionada con su contenido total y tampoco tiene una relación directa con su madurez glucosídica. Asimismo, la extracción de algunos compuestos fenólicos puede estar favorecida frente a la de otros. Parece apuntarse, que los años que alcanzan una buena madurez fenólica, la extracción de antocianos y procianidinas es mejor que la del resto de compuestos fenólicos.

2.4.3 Estudio de correlación entre la composición fenólica de las uvas y de los vinos

En la Figura 2.8 se muestra una tabla resumen de las correlaciones entre uvas, vino joven y vino envejecido. De una forma visual, se aprecia que los compuestos fenólicos de las uvas, en el momento de cosecha, apenas tienen correlación entre sí, salvo entre los flavonoles y las prodelphinidinas. También se aprecia que no existen correlaciones entre los compuestos fenólicos de los vinos jóvenes. Entre los envejecidos sólo hay una correlación positiva entre el contenido de prodelphinidinas y ácidos fenólicos.

El mayor número de correlaciones se obtiene entre los compuestos fenólicos del vino joven y del vino envejecido. Atendiendo a los distintos grupos de compuestos fenólicos, existe una fuerte correlación entre el contenido de antocianos de las uvas y del vino envejecido, lo que indica que, a pesar de las fuertes pérdidas de estos compuestos a lo largo de la elaboración, un mayor contenido en uvas finalmente se refleja en el vino embotellado.

Las procianidinas del hollejo y de las semillas no están correlacionadas con las procianidinas de los vinos, indicando que existen ciertos factores (lignificación de la semilla, relación mosto/semillas, etc.) que afectan a la presencia de procianidinas en el vino.

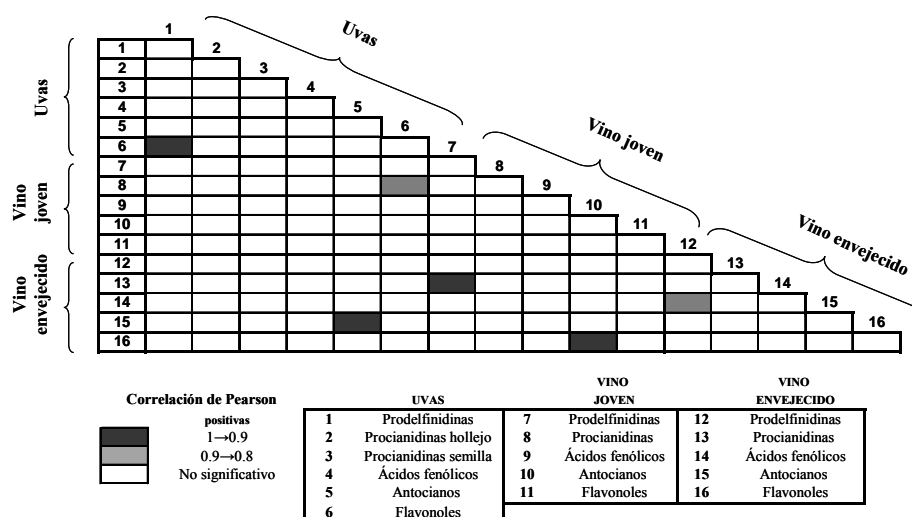


Figura 2.8. Matriz de correlación entre las principales familias de compuestos fenólicos determinadas en uvas, vino joven (fin de alcohólica) y vino envejecido.

2.4.4 Estudio colorimétrico del vino

En este apartado se estudian los parámetros colorimétricos definidos en el espacio CIELAB considerando también la saturación visual del espacio CIELuv. La luminosidad es un parámetro que juega un importante papel en cuanto a la predicción del potencial del vino para envejecer, de forma que ha sido puesto de manifiesto, que los vinos que presentan una baja luminosidad, tienen buen potencial para envejecer (95). Observando la **Figura 2.9** se puede ver que los vinos V9 y Z9 mantienen una baja luminosidad en comparación con los de 2008, lo que podría indicar un mejor potencial para envejecer. Los vinos de 2009 son vinos más oscuros y con mayor cantidad de color y en igualdad de otros atributos, podrían ser considerados como vinos de mejor calidad. Este apunte concuerda con los datos obtenidos en el análisis sensorial que se muestra más adelante. La muestra 2Z8 se vendimió más tarde que Z8 con la finalidad de obtener una mayor madurez fenólica, pero si bien inicialmente el vino de 2Z8 era más oscuro tiende a igualarse con Z8 posteriormente.

Asimismo, se ha visto que durante un apropiado período de envejecimiento esta coordenada no sufre variaciones importantes ni siquiera cuando tiene lugar una pérdida en el contenido total de pigmentos (96). En este estudio ocurre algo similar, ya que una pérdida alta de antocianos (ver figuras 2.1 y 2.2) no se corresponde con un mayor aumento de la luminosidad.

El tono es un parámetro muy importante en la calidad del vino, de hecho, vinos tintos con tonalidades anaranjadas indican un exceso de envejecimiento y de oxidación e incluso nos conduce a cuestionar su calidad ya que podrían haber comenzado a deteriorarse. Los vinos estudiados presentan diferencias en la tonalidad sólo en las fases iniciales de la elaboración. En la fase de barrica, éstas todavía se mantienen, pero después de ser embotellados todos tienden a presentar tonos muy parecidos.

La saturación visual percibida viene reflejada por el parámetro s^*_{uv} definido como el cociente entre el croma y la luminosidad del espacio CIELuv. En las muestras estudiadas este parámetro presentó los valores más altos en las correspondientes al año 2009, fundamentalmente en las muestras del vino V9. Por tanto este vino es un vino más cubierto o con más capa concordando también con los datos de cromaticidad (C^*_{ab}).

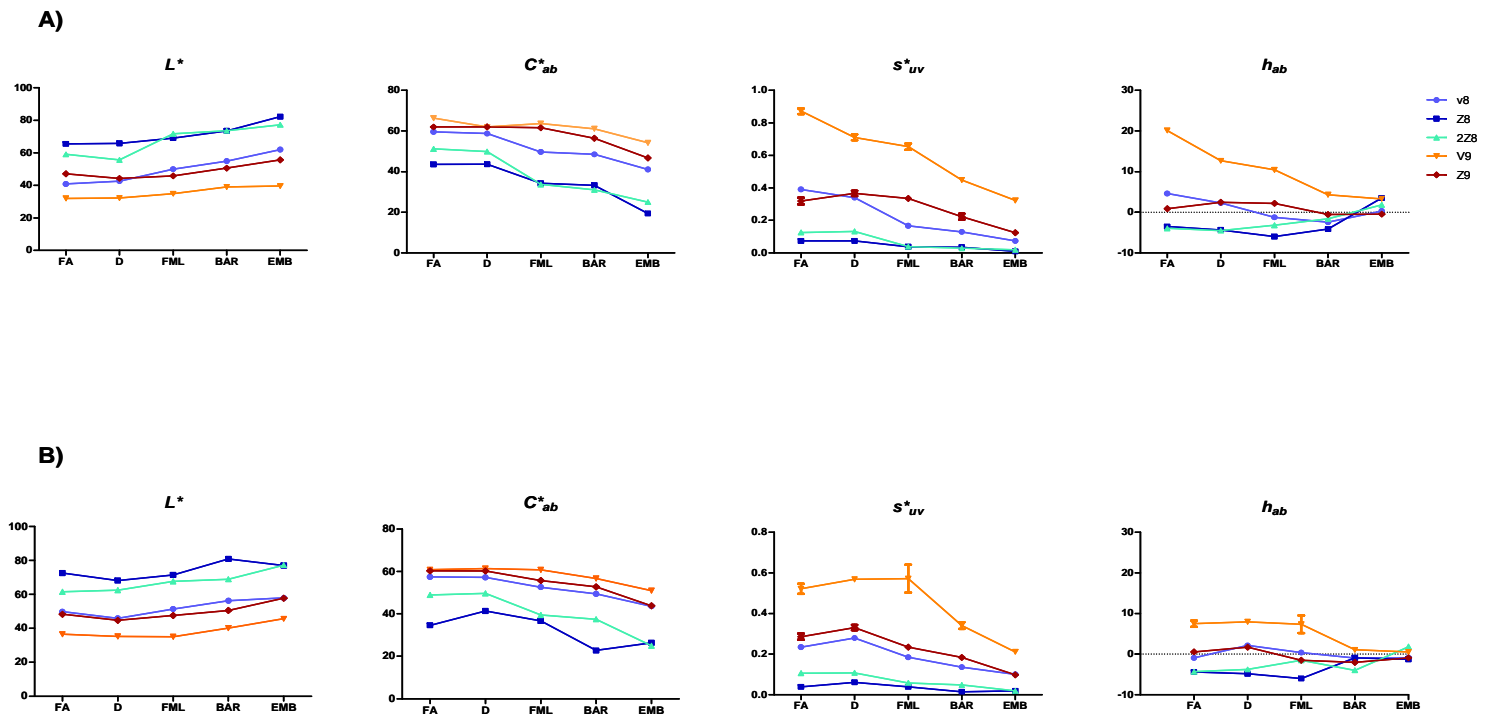


Figura 2.9. Parámetros de color a pH del vino (A) y a pH 3.6 (B).

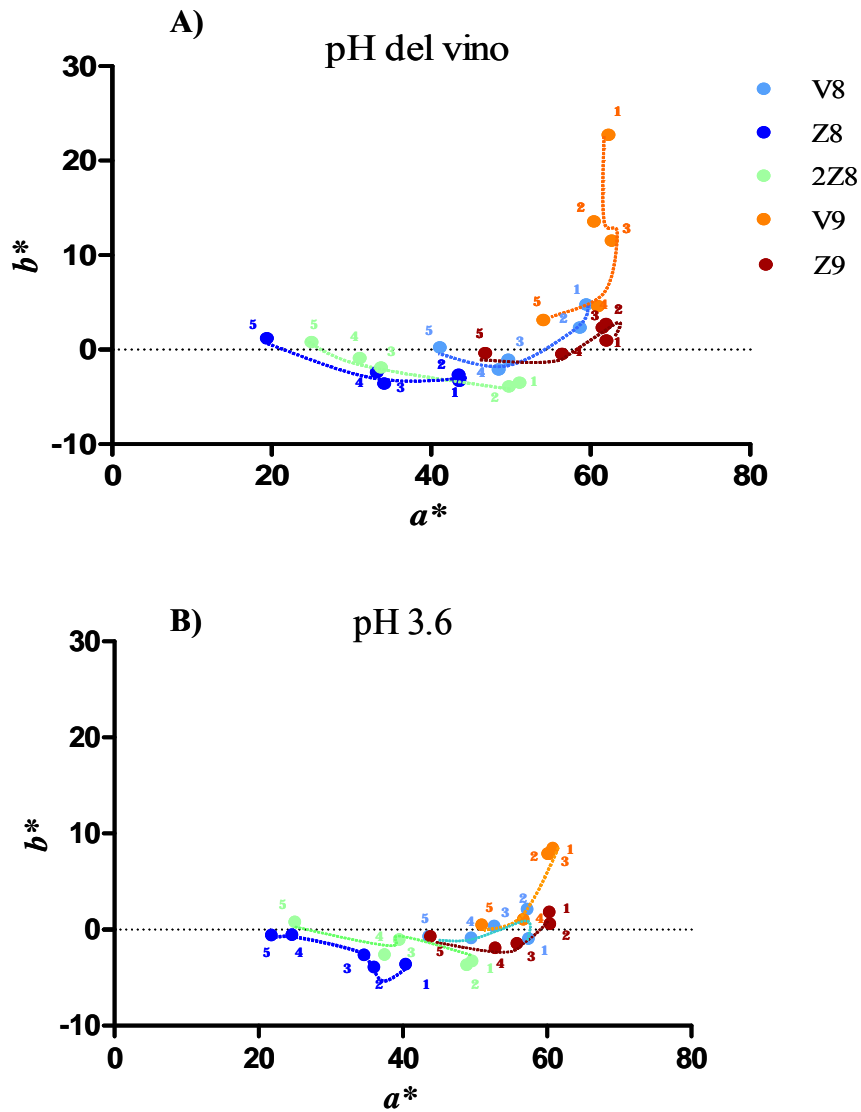


Figura 2.10. Evolución de los parámetros CIELAB a^* y b^* a lo largo de la elaboración. Fin de la fermentación alcohólica (1); descube (2); fin de la fermentación maloláctica (3); seis meses en barrica (4); embotellado (5).

En este trabajo se estudia el vino desde su elaboración hasta su embotellado, sin considerar el envejecimiento en botella. En esta etapa "joven" del vino se aprecian

variaciones tanto en el parámetro a^* , como en el b^* (**Figura 2.10**). El primero presenta una clara disminución a lo largo del tiempo, en todos los vinos estudiados, lo que puede ser interpretado como una cierta pérdida de pureza del color rojo.

En relación al parámetro b^* , cabe destacar los valores elevados de las muestras del vino V9 correspondientes a las etapas iniciales de vinificación cuando son obtenidos al pH propio del vino. En estas etapas, cabría esperar obtener valores más bajos y próximos a los encontrados en el resto de las muestras ya que el contenido en antocianos es todavía muy alto y su expresión de color elevada, máxime cuando el pH de la muestra tomada al final de la fermentación alcohólica es menor que el de las otras muestras (pH 3.1 frente a pH 3.4-3.7 del resto). No obstante, como es lógico, el vino es un medio complejo en el que otros compuestos presentes también pueden afectar al color. Se ha intentado esclarecer el hecho señalado observando las gráficas de composición fenólica (**Figuras desde 2.1 hasta 2.7**) sin poder llegar a una explicación, por lo que tal vez el fenómeno se deba a la presencia de otro tipo de compuestos presentes en el vino.

El parámetro b^* no presenta una tendencia clara en el período de tiempo estudiado. Las muestras correspondientes a los vinos Z8 y 2Z8 aumentan ligeramente (4 unidades CIELAB en ambos casos) mientras que las de los vinos V8, Z9 y V9 tienden a disminuir.

Parece apuntarse que esta etapa del vino (desde fin de alcohólica hasta embotellado), que es cuando se da la mayor pérdida de pigmentos, está más relacionada con una disminución de a^* que con las variaciones sufridas en el parámetro b^* . Finalmente, es de señalar que de forma general el color de los vinos en la fase de embotellado, expresa todavía matices de juventud.

Se han calculado las diferencias de color entre los vinos con la siguiente ecuación: $\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ (**Tabla 2.2**). En general, el ojo humano es capaz de discriminar entre dos colores cuando $\Delta E^*_{ab} \geq 1.0$ unidad CIELAB (97), pero en el caso del vino, según Martínez *et al.*, (98) al observarlo a través de un cristal estandarizado la discriminación es peor y la tolerancia aceptable para un ojo humano no entrenado es de aproximadamente $\Delta E^*_{ab} \geq 3.0$ unidades.

Los resultados obtenidos superan considerablemente este valor y por tanto los vinos son distinguibles fácilmente entre sí. Las mayores diferencias se dan entre la muestra Z8 y V9 (diferente año y diferente viñedo). Aunque las diferencias de color más pequeñas se dan entre mismo año y mismo viñedo (muestras Z8 y 2Z8) se puede decir que la fecha de vendimia afecta claramente al color del vino.

Tabla 2.2. Diferencias de color entre los vinos en el punto de embotellado.

ΔE^*_{ab}	ΔE^*_{ab}	ΔE^*_{ab}	ΔE^*_{ab}
V8-Z8	29.7	Z8-2Z8	7.5
V8-2Z8	22.2	Z8-V9	55.0
V8-V9	26.0	Z8-Z9	38.2
V8-Z9	8.5	2Z8-V9	47.6
		2Z8-Z9	30.7
		V9-Z9	18.0

En la **Figura 2.11** se presenta una simulación de los colores de los vinos, creada a partir de sus coordenadas CIELAB. Esta figura nos puede dar una idea visual de los colores que tienen estos vinos en las diferentes etapas de elaboración. Además, se pueden confirmar visualmente las diferencias de color que existen entre las muestras.

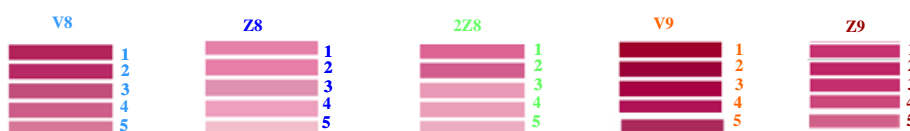


Figura 2.11. Representación de los colores del vino en sus diferentes etapas a partir de las coordenadas CIELAB. Fin de la fermentación alcohólica (1); descube (2); fin de la fermentación maloláctica (3); seis meses en barrica (4); embotellado (5).

Por otro lado, se han evaluado las implicaciones colorimétricas de la copigmentación en el color del vino considerando el espectro visible entero (380-770 nm) (99, 100). Asimismo, el porcentaje de copigmentación también ha sido calculado a 520 nm según el método de Boulton (80).

El color del vino con copigmentación se ha obtenido a partir de los espectros de absorbancia de los vinos después de eliminar el efecto del sulfuroso mediante la adición de acetaldehído en exceso. El color teórico del vino sin copigmentación fue reconstituido a partir del espectro de absorbancia del vino después de diluir 20 veces con vino sintético (pH 3.6) y multiplicar por el factor de dilución.

En la **Figura 2.12** se muestra los espectros de absorción de los vinos estudiados (V8, Z8, 2Z8, V9, Z9) con copigmentación y sin copigmentación (teórico). También se expone el porcentaje de copigmentación considerando todo el espectro visible (% área), el porcentaje de copigmentación según Boulton a 520 nm (% copig), las diferencias en el tono y las diferencias porcentuales de croma y luminosidad del espectro tratado con acetaldehído (con copigmentación) frente al diluido y reconstituido (sin copigmentación).

Es bien sabido que el porcentaje de copigmentación es mayor en los vinos jóvenes que en los envejecidos. En nuestro estudio vemos que los vinos presentan valores máximos de un 46% de copigmentación al final de la fermentación alcohólica y de un 25% después de ser embotellados. La pérdida de la copigmentación no es igual para todos los vinos. Así, el vino V9 presenta el mayor descenso en el valor del porcentaje de copigmentación, 67%, frente al vino Z8 que muestra un descenso del 29%. Esto podría indicar una evolución más rápida del primero.

En cuanto a las dos formas de valorar el porcentaje de copigmentación, la medida según Boulton parece estar ligeramente sobrestimada frente a una medida en la que se considera el espectro entero. No obstante, las dos medidas presentan pocas diferencias cuando los porcentajes de copigmentación son bajos (10-20%). Sin embargo se encuentran diferencias de hasta un 18.7% cuando la copigmentación está más establecida, generalmente en las fases iniciales de la elaboración.

Para cada vino, las variaciones en los parámetros cuantitativos de color (luminosidad y cromaticidad) son más altas en la etapa de final de fermentación alcohólica (% copigmentación más elevado) que en la etapa de embotellado (% de copigmentación más bajo). No obstante, este fenómeno implica cambios cualitativos (variaciones de tono) más importantes en las etapas finales (embotellado) que en etapas iniciales.

En los estudios de correlación llevados a cabo con estos dos puntos de muestreo, se puso de manifiesto que la copigmentación está linealmente correlacionada ($p < 0.05$) de manera negativa con la luminosidad y de forma positiva con el croma (-0.30 y 0.56), respectivamente.

A su vez, cuando el porcentaje de copigmentación aumenta, las variaciones en el croma (ΔC^*_{ab}) y en el tono (Δh_{ab}) son mayores, con una correlación lineal de ($p < 0.05$) 0.55 y 0.48, respectivamente.

De forma preliminar, podemos señalar que la distinta composición fenólica de los vinos, que en nuestro caso se debe principalmente a la distinta madurez fenólica alcanzada por las uvas en el momento de la vinificación, tiene una clara influencia en los parámetros colorimétricos.

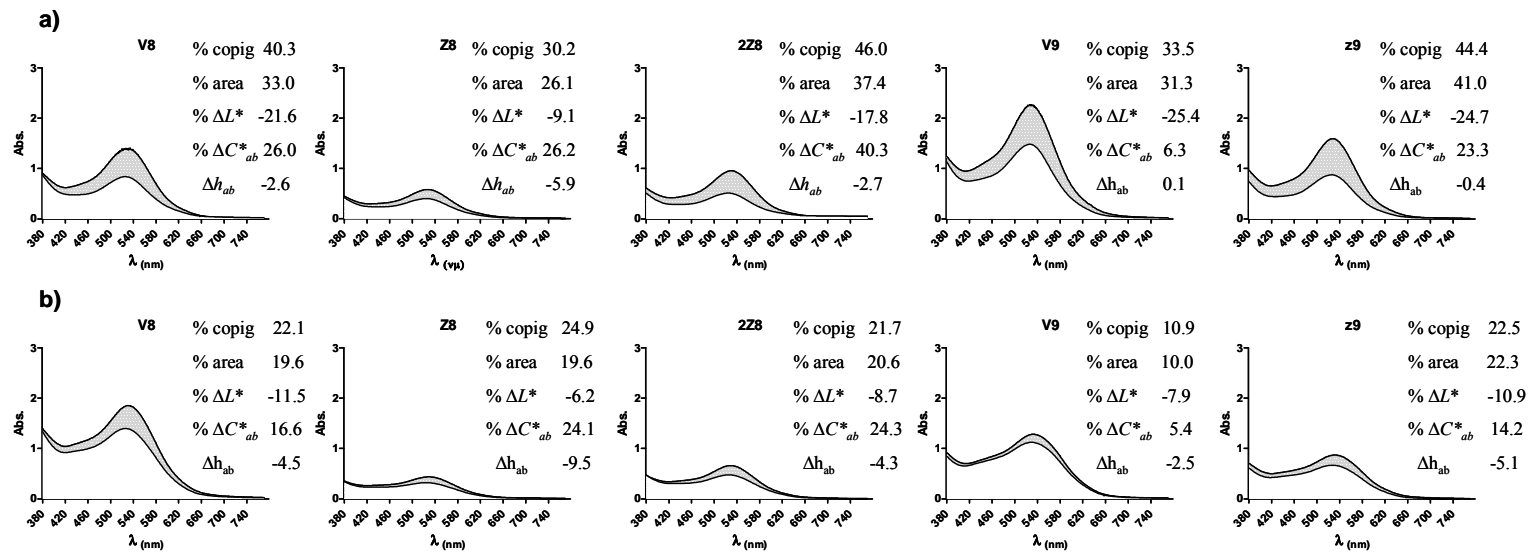


Figura 2.12. Espectros de absorción de los vinos con copigmentación y sin copigmentación al final de la fermentación alcohólica (a) y en embotellado (b). Porcentaje de copigmentación considerando todo el espectro visible (% de area), porcentaje de copigmentación a 520 nm (% copig) e incremento de los parámetros CIELAB.

2.4.5 Análisis sensorial de los vinos

Los vinos fueron evaluados por un panel de catadores, el cual estaba compuesto por seis expertos. Todos ellos son miembros de la bodega y tienen una alta experiencia en la cata de este tipo de vinos. El análisis sensorial se llevó a cabo, en la sala de catas de la bodega, mediante catas a ciegas.

Los vinos, de forma general, fueron valorados como bastante ácidos, característica típica de Graciano. Los de 2009 fueron mejor valorados por el panel de catadores que los de 2008. Hay que señalar que en nuestros estudios observamos que los vinos de la cosecha 2009, además de tener mejores cualidades colorimétricas, también contenían un mayor contenido en compuestos fenólicos.

Entre los vinos de 2008, el correspondiente a la muestra Z8 resultó ser el peor valorado. Según el panel de catadores se trataba de un vino muy rústico, sencillo, ligero y poco agradable de beber. En nuestros análisis observamos que este vino contenía el menor contenido de antocianos y flavonoles. También tenía un bajo contenido en prodelfinidinas y procianidinas monómeras, dímeras y trímeras.

El vino correspondiente a 2Z8 también era un vino rústico, tánico, simple, secante, con notas herbáceas, aunque algo más complejo que el anterior. Si observamos los gráficos de composición fenólica, se puede apreciar que este vino tiene una composición muy parecida al anterior.

El vino V8 fue el mejor de ese año, era un vino más equilibrado, con una estructura correcta, algo falto de volumen pero con notas peculiares que caracterizan a este cultivar. Este vino presentaba la mayor concentración de prodelfinidinas y de forma general, su contenido en compuestos fenólicos era próximo al de los vinos de 2009. Sobre todo en el caso de los antocianos y los flavonoles.

En cuanto a los vinos de 2009, los dos eran muy parecidos entre sí, presentaban exceso de acidez pero buenas y peculiares notas aromáticas a fruta madura, regaliz, tinta, minerales y frutos secos. Según el panel de catadores, eran casi demasiado especiados. El panel de catadores también señaló que el vino Z9 tenía algo menos de color (en concordancia con los parámetros CIELAB de nuestro estudio). Asimismo, se

calificó como más equilibrado y amable que V9, aunque este último era más concentrado y con más volumen.

2.5) CONCLUSIONES

El contenido de los compuestos fenólicos de las uvas afecta claramente a las características del vino, como era de esperar. Si bien la fecha de vendimia ejerce una evidente influencia en los vinos, las condiciones climatológicas del año son fundamentales para la definición de la calidad global del mismo. Así, de manera general, los vinos monovarietales de Graciano presentan mejores características organolépticas cuando su contenido en compuestos fenólicos es mayor.

La facilidad de extracción de los compuestos fenólicos de las uvas no está relacionada con su contenido total y tampoco tiene una relación directa con su madurez glucosídica. Asimismo, la extracción de algunos compuestos fenólicos puede estar favorecida frente a la de otros. Parece apuntarse, que los años que alcanzan una buena madurez fenólica, la extracción de antocianos y procianidinas es mejor que la del resto de compuestos fenólicos.

Los vinos de Graciano elaborados a partir de uvas de composición fenólica diferente presentan evidentes diferencias de color, aunque tienen tonalidades parecidas. Los parámetros cuantitativos y cualitativos del color están correlacionados con la copigmentación, de tal forma que una mayor copigmentación implica más cantidad de color en el vino, menos luminosidad y variaciones significativas en el tono.

En cuanto a las dos formas de valorar el porcentaje de copigmentación, la medida según Boulton (520 nm) parece estar ligeramente sobrestimada frente a una medida en la que se considera el espectro visible entero (380-770 nm). No obstante, las dos medidas presentan pocas diferencias cuando los porcentajes de copigmentación son bajos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ibañez, J., M.T. de Andrés, and J. Borrego, Identificación de las variedades de vid mediante análisis de ADN. **1999**. Sevi. No.2776/77: p. 3713-3720.
2. Borrego, J., et al., *Characterisation of the most important spanish grape varieties trough isozyme and microsatellite analysis.*, in *International Symposium on Molecular Markers for Characterizing Genotypes and Identifying Cultivars in Horticulture*. 2001: Montpellier.
3. Montaner, C., et al., Application of microsatellite markers for the characterization of 'Parralela': an autochthonous Spanish grapevine cultivar. *Scientia Horticulturae*, **2004**. 101(3): p. 343-347.
4. González-Manzano, S., *Antocianos y Falvanoles en Uvas y Vino. Influencia de la Composición en los Procesos de Copigmentación y Estabilidad del Color*, in *Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología*. 2007, Universidad de Salamanca: Salamanca.
5. Monagas, M., et al., Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(22): p. 6475-6481.
6. Núñez, V., et al., Non-galloylated and galloylated proanthocyanidin oligomers in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006**. 86(6): p. 915-921.
7. Núñez, V., et al., *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and Technology*, **2004**. 31(1): p. 69-79.
8. Cacho, J., et al., Evolution of 5 Anthocyanidin-3-Glucosides in the Skin of the Tempranillo, Moristel, and Garnacha Grape Varieties and Influence of Climatological Variables. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1992**. 43(3): p. 244-249.
9. Downey, M.O., N.K. Dokoozlian, and M.P. Krstic, Cultural Practice and Environmental Impacts on the Flavonoid Composition of Grapes and Wine: A Review of Recent Research. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006**. 57(3): p. 257-268.
10. Fuleki, T. and J.M. Ricardo da Silva, Catechin and Procyanidin Composition of Seeds from Grape Cultivars Grown in Ontario. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1997**. 45(4): p. 1156-1160.
11. Mateus, N., M.J. Machado, and V. de Freitas, 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(14): p. 1689-1695.
12. Yokotsuka, K., et al., Changes in Anthocyanins in Berry Skins of Merlot and Cabernet Sauvignon Grapes Grown in Two Soils Modified With Limestone or Oyster Shell Versus a Native Soil Over Two Years. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**. 50(1): p. 1-12.

13. Downey, M.O., J.S. Harvey, and S.P. Robinson, The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2004**. 10(1): p. 55-73.
14. Hermosín-Gutiérrez, I. and E. García- Romero, Antocianos de variedades tintas cultivadas en La Mancha: perfiles varietales característicos de la uva y de los vinos monovarietales, evolución durante la maduración de la baya. *Alimentaria*, **2004**: p. 127-138.
15. Spayd, S.E., et al., Separation of Sunlight and Temperature Effects on the Composition of *Vitis vinifera* cv. Merlot Berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2002**. 53(3): p. 171-182.
16. Yamane, T., et al., Effects of Temperature on Anthocyanin Biosynthesis in Grape Berry Skins. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006**. 57(1): p. 54-59.
17. Roubelakis-Angelakis, K.A. and W.M. Kliewer, 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(4): p. 275-280.
18. Arozarena, I., et al., Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years. *European Food Research and Technology*, **2002**. 214(4): p. 303-309.
19. Di Stefano, R., et al., Influenza di fattori climatici e colturali sul profilo antocianico varietale. *Annali dell'Istituto Sperimentale per l'Enologia Asti*, **1994**. 25 (1): p. 31-46.
20. Katalinic, V. and P. Males, Compositional changes in grape polyphenols throughout maturation. *Journal of Wine Research*, **1997**. 8(3): p. 169 - 177.
21. Crippen, D.D. and J.C. Morrison, The Effects of Sun Exposure on the Phenolic Content of Cabernet Sauvignon Berries During Development. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1986**. 37(4): p. 243-247.
22. Gao, Y. and G.A. Cahoon, Cluster shading effects on fruit quality, skin color and anthocyanin content and composition in Reliance (*Vitis* híbrido). *Vitis*, **1994**. 33: p. 205-209.
23. Haselgrove, L., et al., Canopy microclimate and berry composition: The effect of bunch exposure on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L cv. Shiraz grape berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2000**. 6(2): p. 141-149.
24. Price, S.F., et al., Cluster Sun Exposure and Quercetin in Pinot noir Grapes and Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1995**. 46(2): p. 187-194.
25. Bindon, K.A., P.R. Dry, and B.R. Loveys, The interactive effect of pruning level and irrigation strategy on grape berry ripening and composition in *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *South African Journal of Enology and Viticulture*, **2008**. 29: p. 71-78.
26. De La Hera Orts, M.L., et al., Effect of moderate irrigation on grape composition during ripening. *Spanish Journal of Agricultural Research*, **2005**. 3: p. 352-361.

27. Delgado, R., et al., 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(7): p. 623-630.
28. Esteban, M.A., M.J. Villanueva, and J.R. Lissarrague, Effect of irrigation on changes in the anthocyanin composition of the skin of cv Tempranillo (*Vitis vinifera* L.) grape berries during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2001**. 81(4): p. 409-420.
29. Intrigliolo, D.S. and J.R. Castel, Effects of Irrigation on the Performance of Grapevine cv. Tempranillo in Requena, Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2008**. 59(1): p. 30-38.
30. Keller, M. and G. Hrazdina, Interaction of Nitrogen Availability During Bloom and Light Intensity During Veraison. II. Effects on Anthocyanin and Phenolic Development During Grape Ripening. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1998**. 49(3): p. 341-349.
31. Kennedy, J.A., M.A. Matthews, and A.L. Waterhouse, Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, **2000**. 55(1): p. 77-85.
32. Kennedy, J.A., M.A. Matthews, and A.L. Waterhouse, Effect of Maturity and Vine Water Status on Grape Skin and Wine Flavonoids. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2002**. 53(4): p. 268-274.
33. Sipiora, M.J. and M.-J.G. Granda, Effects of Pre-Veraison Irrigation Cutoff and Skin Contact Time on the Composition, Color, and Phenolic Content of Young Cabernet Sauvignon Wines in Spain. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1998**. 49(2): p. 152-162.
34. Ojeda, H., et al., Influence of Pre- and Postveraison Water Deficit on Synthesis and Concentration of Skin Phenolic Compounds during Berry Growth of *Vitis vinifera* cv. Shiraz. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2002**. 53(4): p. 261-267.
35. Cavaliere, C., et al., The interactive effects of irrigation, nitrogen fertilisation rate, delayed harvest and storage on the polyphenol content in red grape (*Vitis vinifera*) berries: A factorial experimental design. *Food Chemistry*, **2010**. 122(4): p. 1176-1184.
36. Peña-Neira, A., et al., Effects of ripening stages and of plant vegetative vigor on the phenolic composition of grapes (*Vitis vinifera* L.) cv. Cabernet Sauvignon in the Maipo Valley (Chile). *Vitis*, **2004**. 43(2), 51-57(2): p. 51-57.
37. Ribereay- Gayon, P., et al., Handbook of enology. The microbiology of wine and vinification, ed. W.a.S.L. Ed. 1999, Chichester
38. Cortell, J.M., et al., Influence of Vine Vigor on Grape (*Vitis vinifera* L. Cv. Pinot Noir) and Wine Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**. 53(14): p. 5798-5808.
39. Valls Fonayet, J., *Composició fenòlica en varietats negres de Vitis vinifera. Influència de diferents factors*, in *Departamento de Bioquímica y Biotecnología*. 2004, Universidad Rovira y Virgili: Tarragona.

40. Gil-Muñoz, R., et al., Anthocyanin profile in Monastrell grapes in six different areas from Denomination of Origen Jumilla during ripening stage. *International Journal of Food Science and Technology*, **2010**. 45(9): p. 1870-1877.
41. Vilanova, M., M. Santalla, and A. Masa, Environmental and genetic variation of phenolic compounds in grapes (*Vitis vinifera*) from northwest Spain. *Journal of Agricultural Science*, **2009**. 147: p. 683-697.
42. De Freitas, V.A.P., Y. Glories, and A. Monique, 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(4): p. 397-403.
43. Downey, M.O., J.S. Harvey, and S.P. Robinson, Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2003**. 9(1): p. 15-27.
44. Jordao, A.M., J.M. Ricardo Da Silva, and O. Laureano, Evolution of Catechins and Oligomeric Procyanidins during Grape Maturation of Castelao Frances and Touriga Francesa. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2001**. 52(3): p. 230-234.
45. Kennedy, J.A., et al., Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2000**. 6(3): p. 244-254.
46. De Freitas, V.A.P. and Y. Glories, 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(12): p. 1601-1606.
47. De Freitas, V.A.P., et al., Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry*, **1998**. 49(5): p. 1435-1441.
48. Brossaud, F., et al., Flavonoid Compositional Differences of Grapes Among Site Test Plantings of Cabernet franc. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**. 50(3): p. 277-284.
49. Roggero, J.P., S. Coen, and B. Ragonnet, 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(1): p. 77-83.
50. González-San José, M.L., G. Santa-María, and C. Díez, Anthocyanins as parameters for differentiating wines by grape variety, wine-growing region, and wine-making methods. *Journal of Food Composition and Analysis*, **1990**. 3(1): p. 54-66.
51. Brar, H.S., Z. Singh, and E. Swinny, Dynamics of anthocyanin and flavonol profiles in the 'Crimson Seedless' grape berry skin during development and ripening. *Scientia Horticulturae*, **2008**. 117(4): p. 349-356.
52. Castillo-Muñoz, N., et al., Flavonol profiles of *Vitis vinifera* red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2007**. 55(3): p. 992-1002.

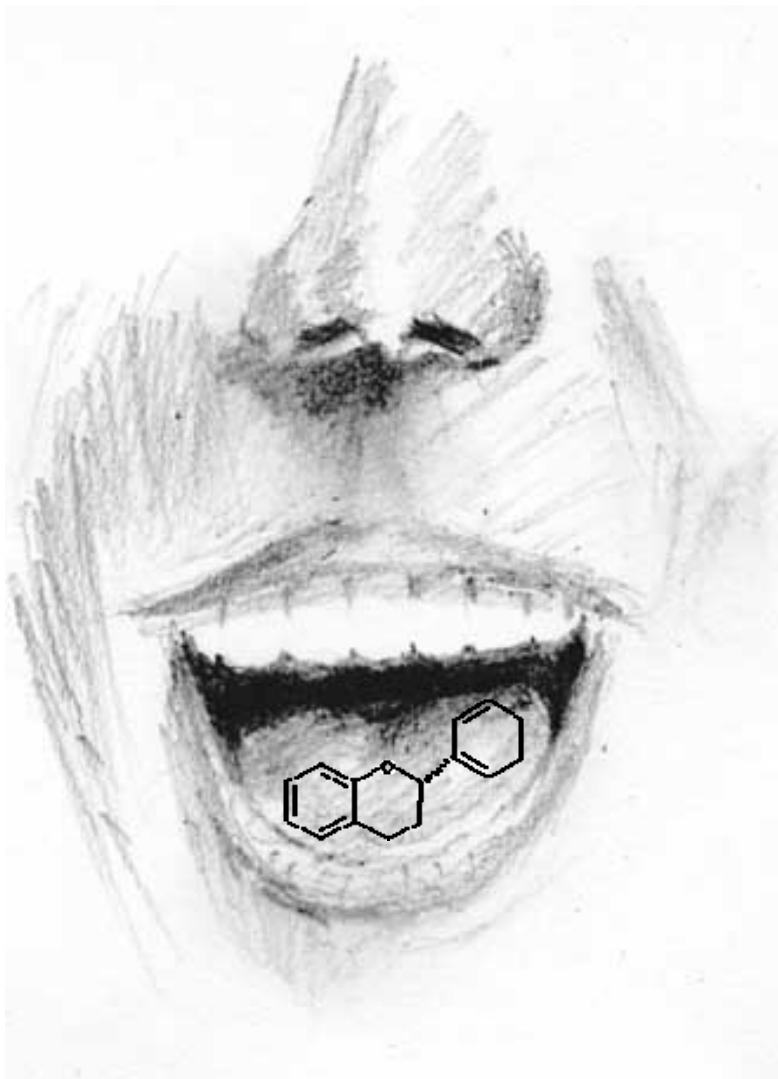
53. Meléndez, E., et al., Multivariate analysis to study the relation between sensory and physico-chemical variables during grape maturity in the "D.O. Rioja", ed. C.C. Mediterraneum. 2010, Granada (Spain).
54. Bourzeix, M., D. Weyland, and N. Heredia, Etude des catechines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres derives de la vigne. *Bulletin de l'OIV*, **1986**. 59: p. 1171-1254.
55. Escribano-Bailón, M.T., et al., Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, **1995**. 200(3): p. 221-224.
56. Jordao, A.M., J.M. Ricardo-Da-Silva, and O. Laureano, Evolution of anthocyanins during grape maturation of two varieties (*Vitis vinifera* L.), Castelao Frances and Touriga Francesa. *Vitis*, **1998**. 37(2): p. 93-94.
57. Santos-Buelga, C., E.M. Francia-Aricha, and M.T. Escribano-Bailón, Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chemistry*, **1995**. 53(2): p. 197-201.
58. Obreque-Slier, E., et al., Comparative Study of the Phenolic Composition of Seeds and Skins from Carménère and Cabernet Sauvignon Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**. 58(6): p. 3591-3599.
59. Rodríguez Montealegre, R., et al., Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2006**. 19(6-7): p. 687-693.
60. Chira, K., et al., Grape Variety Effect on Proanthocyanidin Composition and Sensory Perception of Skin and Seed Tannin Extracts from Bordeaux Wine Grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for Two Consecutive Vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**. 57(2): p. 545-553.
61. Revilla, E., et al., Value of high-performance liquid chromatographic analysis of anthocyanins in the differentiation of red grape cultivars and red wines made from them. *Journal of Chromatography A*, **2001**. 915(1-2): p. 53-60.
62. De Gaulejac, N.V., et al., Anthocyanin in grape skins during maturation of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon and Merlot Noir from different Bordeaux terroirs. *Journal International Sciences Vigne Vin*, **2001**. 35(3): p. 149-156.
63. Obreque-Slier, E., *Caracterización fenólica de uvas del cultivar Carménère y su relación con la sensación de astringencia*, in *Bioquímica y Biotecnología*. 2010, Rovira y Virgili: Tarragona.
64. Cortell, J.M. and J.A. Kennedy, Effect of light exposure on accumulation of flavonoids in Pinot noir fruit and extraction in a model system. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006**. 57(3): p. 382A-395.
65. Cortell, J.M. and J.A. Kennedy, Effect of Shading on Accumulation of Flavonoid Compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot Noir Fruit and Extraction in a Model System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(22): p. 8510-8520.

66. Downey, M.O., J.S. Harvey, and S.P. Robinson, Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2003**. 9(2): p. 110-121.
67. Cosme, F., J.M. Ricardo-Da-Silva, and O. Laureano, Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry*, **2009**. 112(1): p. 197-204.
68. González-Neves, G., et al., Phenolic potential of Tannat, Cabernet-Sauvignon and Merlot grapes and their correspondence with wine composition. *Analytica Chimica Acta*, **2004**. 513(1): p. 191-196.
69. Mattivi, F., et al., Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2009**. 15(1): p. 27-35.
70. Pérez-Magariño, S. and M.L. González-San José, Evolution of Flavonols, Anthocyanins, and Their Derivatives during the Aging of Red Wines Elaborated from Grapes Harvested at Different Stages of Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**. 52(5): p. 1181-1189.
71. Pérez-Magariño, S. and M.L. González-San José, Effect of ripening stage of grapes on the low molecular weight phenolic compounds of red wines. *European Food Research and Technology*, **2005**. 220(5): p. 597-606.
72. Pérez-Magariño, S. and M.L. González-San José, Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, **2006**. 96(2): p. 197-208.
73. Ryan, J.-M.a. and E. Revilla, Anthocyanin Composition of Cabernet Sauvignon and Tempranillo Grapes at Different Stages of Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(11): p. 3372-3378.
74. Sun, B.S., et al., Transfer of Catechins and Proanthocyanidins From Solid Parts of the Grape Cluster Into Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**. 50(2): p. 179-184.
75. Canals, R., et al., 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(10): p. 4019-4025.
76. Peyrot des Gachons, C. and J.A. Kennedy, Direct Method for Determining Seed and Skin Proanthocyanidin Extraction into Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(20): p. 5877-5881.
77. Kontoudakis, N., et al., Influence of the heterogeneity of grape phenolic maturity on wine composition and quality. *Food Chemistry*, **2011**. 124(3): p. 767-774.
78. Heredia, F.J., et al., CromaLab®, análisis de color, Registro General de la Propiedad Intelectual SE-1052-04: Sevilla, Spain. **2004**.
79. Wyszecski, G. and W.S. Stiles, Color Science. Concepts and Methods. Quantitative Data and Formulae. 2 ed, ed. J.W. Sons. 1982, New York.

-
80. Boulton, R.B., *A method for the assessment of copigmentation in red wines*. 1996, Presented at the 47th Annual Meeting of the American Society for Enology and Viticulture: Reno, NV, June.
81. Cagnasso, E., et al., *Valutazione delle Potenzialità Fenoliche di Uve Rosse Piemontesi*. 2006, Quaderni di Scienze Viticole ed Enologiche.
82. Torchio, F., et al., Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas. *Analytica Chimica Acta*, **2010**. 660(1-2): p. 183-189.
83. Ribéreau-Gayon, P., et al., *Handbook of Enology*. Vol. 2. 2000, Baffins Lane, Chichester: John Wiley.
84. Segade, S.R., E.S. Vazquez, and E.D. Losada, Influence of ripeness grade on accumulation and extractability of grape skin anthocyanins in different cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2008**. 21(8): p. 599-607.
85. Fournand, D., et al., Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(19): p. 7331-7338.
86. González-Manzano, S., J.C. Rivas-Gonzalo, and C. Santos-Buelga, Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, **2004**. 513(1): p. 283-289.
87. Zamora, F., *Influencia del cambio climático en la elaboración del vino*, in *V Foro Mundial del Vino*, G.d.l. Rioja, Editor. 2008: Logroño. p. 93-96.
88. Bordiga, M., et al., Characterisation of polymeric skin and seed proanthocyanidins during ripening in six *Vitis vinifera* L. cv. *Food Chemistry*, **2011**. 127(1): p. 180-187.
89. Sun, B., et al., Evolution of Phenolic Composition of Red Wine during Vinification and Storage and Its Contribution to Wine Sensory Properties and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**. 59(12): p. 6550-6557.
90. González-Manzano, S., et al., Characterization of the Mean Degree of Polymerization of Proanthocyanidins in Red Wines Using Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (LC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(12): p. 4326-4332.
91. Rolle, L., et al., Relationship between Skin Break Force and Anthocyanin Extractability at Different Ripening Stages. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2009**. 60(1): p. 93-97.
92. Segade, S.R., et al., Berry skin thickness as main texture parameter to predict anthocyanin extractability in winegrapes. *LWT - Food Science and Technology*, **2010**. 44(2): p. 392-398.
93. Rentsch, M., A. Wilkens, and P. Winterhalter, *Non-flavonoid Phenolic Compounds*, in *Wine Chemistry and Biochemistry*, M.V. Moreno-Arribas and M.C. Polo, Editors. 2009, Springer: New York, USA. p. 509-529.

94. Monagas, M., B. Bartolome, and C. Gomez-Cordoves, Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle - II. Non-anthocyanin phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, **2005**. 220(3-4): p. 331-340.
95. Jaffré, J., et al., Burgundy red wines: Representation of potential for aging. *Food Quality and Preference*, **2009**. 20(7): p. 505-513.
96. Boido, E., et al., Aging Effect on the Pigment Composition and Color of *Vitis vinifera* L. Cv. Tannat Wines. Contribution of the Main Pigment Families to Wine Color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(18): p. 6692-6704.
97. Gonnet, J.-F., Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited--1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chemistry*, **1998**. 63(3): p. 409-415.
98. Martínez, J.A., et al., Note. Visual and Instrumental Color Evaluation in Red Wines. *Food Science and Technology International*, **2001**. 7(5): p. 439-444.
99. Gómez-Míguez, M., et al., Influence of Different Phenolic Copigments on the Color of Malvidin 3-Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(15): p. 5422-5429.
100. Lambert, S.G., et al., Copigmentation between malvidin-3-glucoside and some wine constituents and its importance to colour expression in red wine. *Food Chemistry*, **2011**. 125(1): p. 106-115.

BLOQUE II



II. INTRODUCCIÓN

II.1 Aspectos generales

La astringencia se caracteriza por dar una sensación de rugosidad, sequedad y aspereza en la cavidad bucal. La palabra deriva del latín “*ad stringere*” que significa unir, amarrar y se piensa que está relacionada con la capacidad de ciertas sustancias para unirse a proteínas. Esta sensación fue considerada como gustativa por Aristóteles (384-322 a.C.); aunque no fue descrita hasta 1964, cuando Joslyn y Golstein la definieron como el resultado de una interacción entre los taninos y las proteínas salivares (1).

No se trata de una sensación ligada a una zona particular de la boca, es un fenómeno difuso que demora entre 15-20 segundos en manifestarse. La pérdida gradual de esta sensación se relaciona con el lavado de los complejos tanino-proteína gracias a saliva fresca o nueva (2). Esta sensación se incrementa en intensidad y duración tras repetidas degustaciones, por eso algunos catadores recomiendan su valoración la primera vez que se percibe. Sin embargo, otros consideran que debe ser estimada después de varias repeticiones, cuando las modificaciones que afectan a la saliva han sido minimizadas. Este incremento en la percepción de astringencia puede afectar significativamente en la evaluación de los vinos, ya que a menudo, los que se catan primero parecen más suaves y armónicos.

La saliva está constituida principalmente por agua (99.5%), el resto son proteínas y sustancias inorgánicas. La fracción proteica está constituida principalmente por glicoproteínas, enzimas, inmunoglobulinas y una cierta cantidad de péptidos (3). Los constituyentes de la saliva cumplen importantes funciones en la digestión y nutrición, también mantienen lubricada la boca cuando hablamos. El agua permite que los alimentos se disuelvan y se perciba el sabor. Los iones cloruro, activan la amilasa salival, mientras que el bicarbonato y fosfato neutralizan el pH de los alimentos y protegen de la corrosión bacteriana. El mucus lubrica el bolo alimenticio para facilitar la deglución y el avance por el tubo digestivo. Por otro lado, la lisozima tiene efectos antimicrobianos y la α -amilasa, hidroliza parcialmente el almidón en la boca, comenzando la digestión de los hidratos de carbono (4).

La saliva es producida por glándulas mayores y menores situadas en la cavidad bucal. Las glándulas mayores son: la parótida, la sublingual y la submandibular. Otras

glándulas menores, las palatinas, situadas en lengua, labios y mejillas, también secretan fluido salival.

II.2 Astringencia y compuestos fenólicos

La saliva de los animales contiene diversos componentes proteicos: histatinas, estaterinas, lisozimas, amilasas, peroxidasas, proteínas ricas en prolina y mucinas, entre otros. Algunos de ellos presentan una alta afinidad por los taninos, como las proteínas ricas en prolina (PRPs) (5).

Se ha postulado que los complejos tanino-proteína son estables en todo el tracto digestivo, modulando así cualquier efecto fisiológico de los taninos. Los polifenoles pueden tener una variedad de efectos perjudiciales en los animales como la interferencia con la absorción del hierro en la dieta alimenticia o la inhibición de enzimas digestivas (6). Se cree que las proteínas salivares pueden actuar como una defensa primaria contra taninos perjudiciales (principalmente taninos de alto peso molecular) mediante la formación de complejos insolubles (7). La precipitación de estos complejos podría prevenir ciertos efectos nocivos en el tracto intestinal (8). Esta función de las PRPs ha sido constatada con estudios que muestran que dichas proteínas son producidas fundamentalmente por animales que consumen cantidades significativas de polifenoles (9). Los polifenoles también pueden interactuar con otras proteínas salivares como las histatinas, las amilasas y otras de diferente composición aminoacídica.

La percepción de la astringencia parece aumentar con el peso molecular de los fenoles, así como con su grado de galoilación (10-12). Así, los taninos de menor grado de galoilación tienden a unirse menos con las proteínas salivares. Por otra parte, en vino se ha observado recientemente una alta correlación entre el peso molecular de los fenoles y la astringencia (13). Sin embargo, existe cierta controversia ya que algunos autores indican que las proantocianidinas de peso molecular alto, mayores de siete unidades, son insolubles y por tanto incapaces de contribuir en la astringencia (14). Por otro lado también se ha postulado que los taninos más grandes tienen la capacidad de formar múltiples uniones o puentes con residuos vecinos de prolina y también de asociarse y apilarse con otras moléculas de taninos después de unirse a las proteínas (5). Estudios recientes han mostrado que las proantocianidinas polimerizadas son solubles

en medio hidro-alcohólico y se muestran astringentes (11). En contraste, los fenoles simples podrían tener solamente la oportunidad de unirse a residuos de prolina simples.

Los compuestos fenólicos tienen distinta afinidad por distintas clases de proteínas (15, 16). Esta afinidad está afectada por diferentes características intrínsecas a la proteína como la hidrofobicidad, el tamaño y la flexibilidad estructural. También influyen factores extrínsecos como el pH, la temperatura, la fuerza iónica del medio, la presencia de disolventes orgánicos y de carbohidratos (17, 18). En este sentido, los polisacáridos pueden modular la interacción entre proteínas salivares y taninos, ya que son coloides que limitan la agregación, floculación, turbidez y por tanto la formación de precipitados en el vino (17, 19). Los polímeros de manosa o manoproteínas secretadas al vino durante la autólisis celular de las levaduras forman estructuras estables con los taninos, imposibilitando su asociación con las proteínas (20) y, por tanto, modulando la sensación de astringencia. También se ha constatado que otros factores como el flujo salival (21), la composición de la saliva (22, 23), la viscosidad (18, 24), el contenido de ácidos orgánicos e inorgánicos (25), el dulzor y algunos minerales (26) intervienen fuertemente en la percepción de la astringencia.

Se ha postulado que los polifenoles actúan como un ligando multidentado, con participación de sus núcleos aromáticos y grupos fenólicos, donde la fuerza impulsora o facilitadora principal parece ser el efecto hidrofóbico (27, 28). La interacción con la proteína podría tener lugar con la superficie rígida, plana y abierta del anillo pirrolidina de un residuo de prolina (29). Jöbstl *et al.* (28) han postulado que la formación de complejos insolubles tanino-proteína ocurre en tres etapas (**Figura II.1**). En la primera, las proteínas están libres y tienen una conformación enrollada aleatoriamente, la apertura y estructura flexible de la proteína es un requisito previo para la unión al tanino. La unión simultánea de los polifenoles multidentados en varios sitios de la proteína lleva al enrollamiento de la misma alrededor de los taninos, provocando una disminución del tamaño de la proteína, haciéndola más compacta y esférica. En la segunda etapa, a medida que la concentración de polifenoles aumenta, los polifenoles complejados en la superficie de la proteína se unen a otras proteínas con la consiguiente dimerización y oligomerización, causando la insolubilización. En la última etapa, los dímeros y oligómeros se agrupan y las moléculas resultantes precipitan.

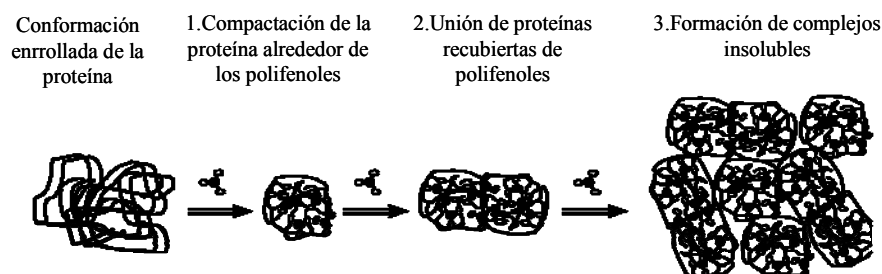


Figura II.1. Formación de complejos tanino-proteína (adaptado de Jöbstl et al. 2004)

II.3 Estimación de la astringencia

La astringencia es uno de los atributos sensoriales más importantes de los vinos tintos. Habitualmente se estima mediante el análisis sensorial, siendo caracterizada como sensaciones orales diferentes (30). Actualmente existe una gran cantidad de propuestas metodológicas y ensayos modelo que proponen evaluar objetivamente las interacciones entre taninos y proteínas. Con este fin, han sido estudiados una gran cantidad de componentes fenólicos (ácido tánico, procianidinas puras, extractos y fracciones de semillas y hollejos), así como un alto número de proteínas (fracciones salivares, α -amilasa, ovoalbúmina, gelatina, caseína, etc.).

Los métodos utilizados con dicha finalidad van desde las primeras tinciones de proteínas unidas a polifenoles en el año 1976 (31) hasta las últimas técnicas termodinámicas y espectrométricas utilizadas actualmente (32, 33). Durante este período de tiempo se han utilizado diversas herramientas como: técnicas calorimétricas (34, 35), cromatografía en papel y de alta presión unida al análisis sensorial (36-38), microplacas (39), fluorimetría (40-43), electroforesis (44), resonancia magnética nuclear (45), turbidimetría y nefelometría (6, 46, 47), ensayos enzimáticos (48), lengua electrónica (49), modelos moleculares y matemáticos (28, 50).

Capítulo 3.

Análisis sensorial de los hollejos de Graciano, durante la maduración y su relación con los compuestos fenólicos.

3.1) OBJETIVOS

El propósito de este capítulo es evaluar los cambios ocurridos en los parámetros sensoriales de los hollejos de Graciano, durante la maduración y obtener una relación con su correspondiente composición fenólica. Con ello se pretende determinar qué familias de compuestos fenólicos explican las variaciones sensoriales ocurridas en este cultivar, a lo largo de este período de madurez.

Con este fin se ha estudiado la composición fenólica de los hollejos de uvas con distinto grado de maduración, a lo largo de dos cosechas. Los resultados de composición obtenidos mediante el análisis HPL-DAD-MS se han correlacionado con las puntuaciones otorgadas, por un panel de catadores, a los parámetros sensoriales evaluados.

3.2) JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado con anterioridad, los compuestos fenólicos de las uvas tienen una alta implicación en características organolépticas como el color, la astringencia y el amargor, fundamentales para determinar la calidad del vino.

Se ha comprobado que los derivados de catequina y galocatequina de los hollejos, tienen una alta contribución en la composición fenólica del vino (51, 52). Su concentración y su estructura parecen tener una alta repercusión en la astringencia. El peso molecular y el grado de galoilación de estos compuestos (11, 15, 53) parece aumentar esta sensación, que a su vez puede estar influida por la presencia de flavonoles y ácidos fenólicos (54, 55). Contrariamente a lo considerado hasta ahora, incluso se ha postulado que es posible que los flavanoles no sean compuestos relevantes en la astringencia (38, 54).

Como se ha visto anteriormente, son varios los estudios que han intentado esclarecer estos aspectos, pero todavía hoy, existe mucha confusión en cuanto a qué tipo de compuestos fenólicos y en qué medida contribuyen a la sensación de astringencia. Por este motivo, se siguen realizando trabajos que intentan correlacionar la composición fenólica de hollejos y semillas con estos atributos sensoriales (55).

Debido a que el mecanismo en el que se fundamenta la astringencia todavía no está completamente explicado, el análisis sensorial sigue siendo una herramienta muy utilizada para evaluar este tipo de sensaciones orales (23, 37, 56). En este contexto, consideramos importante estudiar los cambios ocurridos en los parámetros sensoriales, a lo largo de la maduración, y su relación con la composición fenólica de los hollejos.

3.3) MATERIAL Y MÉTODOS

El muestreo de uva y la extracción y el análisis por HPLC-DAD-MS de los compuestos fenólicos estudiados en este apartado fue realizado tal y como se describe en el **Capítulo 1** de esta memoria.

3.3.1 Análisis sensorial

La degustación de la uva es una herramienta comúnmente utilizada para evaluar su grado de madurez. Con un mínimo de entrenamiento, permite caracterizar su estado, y en particular, su maduración fenólica y potencial cualitativo (57).

En este estudio, el análisis sensorial se llevó a cabo según las normas de l'Institut Coopératif du Vin (58). El panel de catadores estaba constituido por once panelistas, no fumadores, siete mujeres y cuatro hombres. Los catadores fueron entrenados previamente para reconocer y evaluar la intensidad percibida en cuanto a acidez, amargor y astringencia. Se usaron respectivamente las siguientes disoluciones: ácido tartárico (0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1 y 2 g/L), quinina clorhidrato (dihidrato) (0.025, 0.037, 0.05 g/L) y sulfato de aluminio y potasio (0.3, 0.45, 0.6 y 0.9 g/L).

En las sesiones de entrenamiento los panelistas debían anotar a qué concentración empezaban a sentir alguna sensación en la boca. Posteriormente, para cada sensación,

tenían que ordenar las muestras según su intensidad. También se llevaron a cabo pruebas dúo-trío, que consistían en reconocer la entre tres disoluciones cual de ellas era distinta.

Por otra parte, también se realizó un entrenamiento con aromas. Para este propósito, se utilizó un kit de aromas con diferentes descriptores, comúnmente encontrados en uvas (**Anexo I**).

Asimismo, los catadores fueron instruidos para masticar las muestras (los hollejos) el mismo número de veces y con la misma intensidad. Se cataron muestras de hollejos pertenecientes a los años 2008 y 2009, desde el envero hasta la sobremaduración, en ocho puntos de muestreo. En cada año se recogían muestras de dos parcelas diferentes.

Los atributos sensoriales evaluados fueron los siguientes: facilidad de dilaceración del hollejo, intensidad tánica, astringencia, acidez, sequedad, intensidad de aroma y tipo de aroma. En el momento de la cata, los panelistas disponían de una ficha adaptada de Rousseau y Delteil (58) (**Anexo I**).

3.3.2 Análisis quimiométrico

Para observar posibles tendencias de los datos obtenidos se aplicó un análisis de componentes principales (PCA), método de pautas no prefijadas destinado a la reducción de variables con fines exploratorios. La matriz de datos fue construida con las puntuaciones sensoriales de las muestras y su composición fenólica, utilizando posteriormente la matriz de correlación. Para el procesado de los datos se usó el software SPSS 13.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

3.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la **Figura 3.1** se representan las puntuaciones sensoriales obtenidas por el panel de catadores. Cada atributo sensorial está representado en un eje, en el que se presenta el valor para cada muestra. Parece apuntarse que las variaciones en las puntuaciones están más relacionadas con la añada que con el viñedo ya que los diagramas radiales presentan mayores diferencias entre años que entre viñedos. Las muestras de 2008 presentan más acidez al inicio de la maduración y tienen una mayor intensidad de aroma que las de 2009. Sin embargo las muestras de 2009 alcanzan aromas más pasificados en las últimas etapas de maduración (ver puntuaciones **Anexo I**).

También se puede observar la evolución de los parámetros sensoriales a lo largo de la maduración. La dilaceración del hollejo, el tipo de aroma y la intensidad del aroma tienden a aumentar con la maduración, mientras que la intensidad tánica, la astringencia, la sequedad y la acidez muestran una pauta contraria.

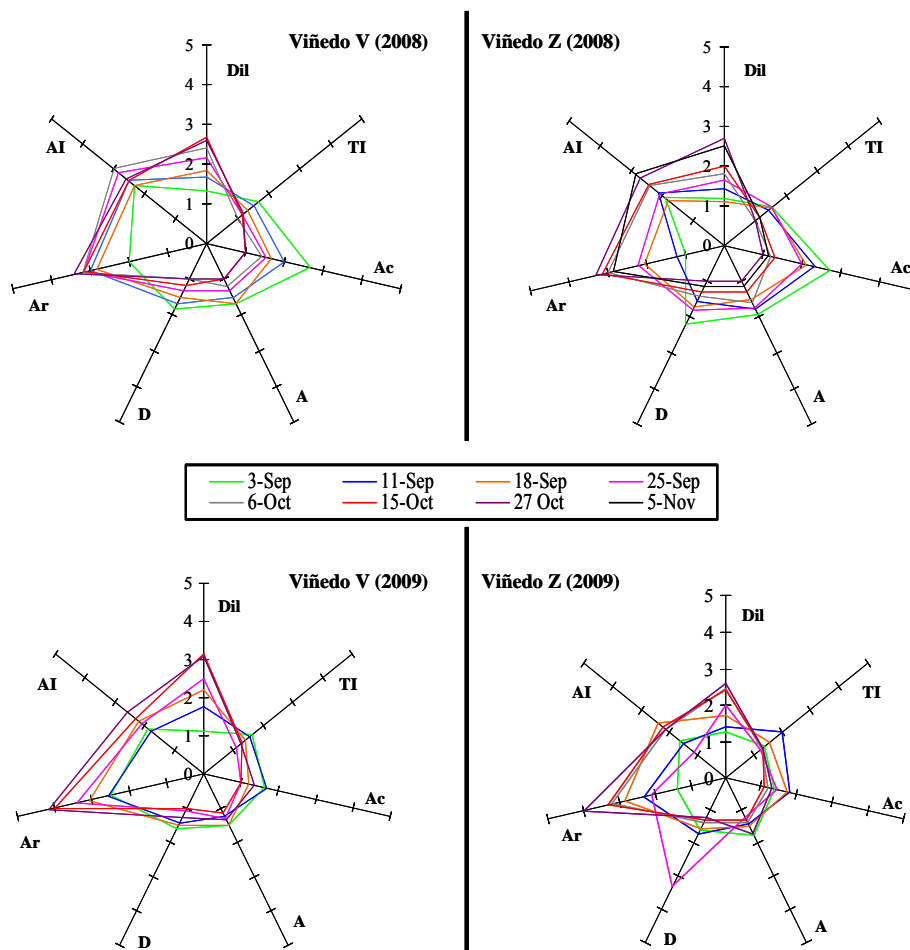


Figura 3.1. Puntuaciones sensoriales de los hollejos durante la maduración. Facilidad de dilaceración del hollejo (Dil); Intensidad tánica (TI); Acidez (Ac); Astringencia (A); Sequedad (D); Tipo de aroma (Ar); Intensidad de aroma (AI).

Con la finalidad de evaluar la relación entre los parámetros sensoriales y la composición fenólica de los hollejos se ha aplicado un análisis de componentes principales (PCA). En la **Figura 3.2** se presenta la proyección de las muestras en el plano definido por el primer y el segundo componente principal. También se representan los *loadings*. El primer componente principal (PC 1) explica el 46.2% de la variabilidad de los datos y el segundo (PC 2) explica un 24.6% del total.

Las muestras están codificadas de tal forma que indican: el viñedo (V y Z), el año (el 2 a la izquierda de la letra indica que se trata de 2009, la ausencia del 2 indica que se trata de 2008) y el punto de muestreo (1-8, de verde a maduro).

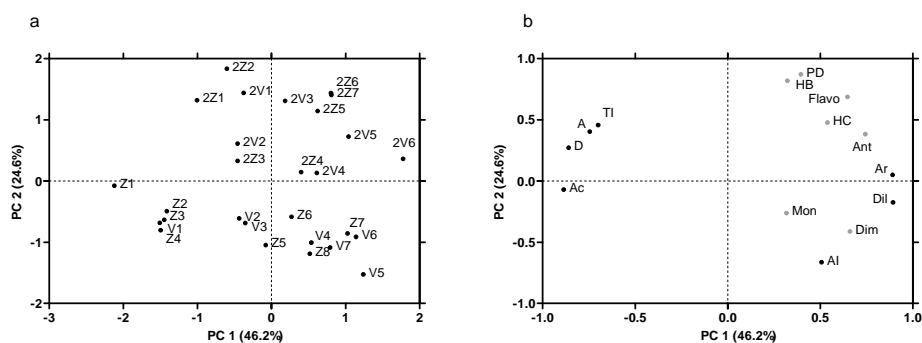


Figura 3.2. PCA realizado con los valores del análisis sensorial y de la composición fenólica. Representación de las puntuaciones (a) y de los loadings (b).

Puede apreciarse, a lo largo del PC 1, la evolución de las muestras durante la maduración. Esta pauta queda resaltada en la **Figura 3.3**. En la **Figura 3.2** se observa que el año 2009 presenta mayor homogeneidad (muestras menos dispersas) y que el 2008 comienza en puntuaciones más negativas. Esto podría estar en relación con una maduración más temprana y homogénea en 2009 y un envero algo más tardío en 2008.

En la **Figura 3.3**, las primeras fechas de cada muestra presentan puntuaciones negativas en el PC 1, que tienden a aumentar con la maduración. En este gráfico también se puede apreciar de forma rápida el valor de puntuación máxima del PC 1 obtenido por las muestras en cada año y viñedo. Estos valores se corresponden con atributos sensoriales más positivos (baja astringencia, baja acidez, baja sequedad y baja intensidad tánica y altos valores de dilaceración, intensidad y tipo de aroma) y están asociados a su vez con las puntuaciones de los compuestos fenólicos (**Figura 3.2.b**). Las muestras que obtuvieron los valores más altos en este primer componente principal, fueron para cada viñedo: V5 y Z7 en 2008 y 2V6, 2Z6 y 2Z7 en 2009. Esto podría revelar el momento óptimo de vendimia en cada caso, teniendo en cuenta tanto la composición fenólica del hollejo como el análisis sensorial.

En la **Figura 3.3**, también se puede apreciar las distintas tendencias de maduración que siguen las parcelas dependiendo del año. Parece que en 2009, las puntuaciones dentro del PC 1 aumentan con el tiempo, lo que indicaría una mejora en cuanto a madurez fenólica y sensorial a lo largo de la maduración. Por otro lado, en 2008 parece que, dentro de este PC, se alcanza un máximo para luego disminuir, mientras que en 2009 la mejor madurez fenólica se alcanza en las últimas fechas. Estas observaciones, en cierta medida, pueden ser consecuencia de las condiciones climáticas de cada año, favorables en 2009 y desfavorables en 2008 (ver **Capítulo 1**).

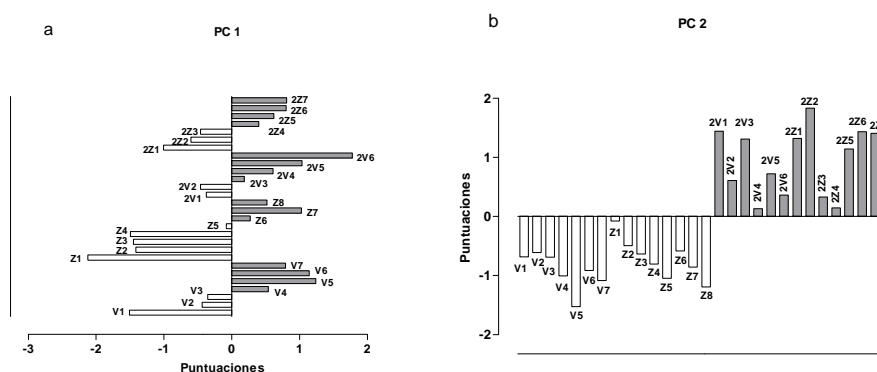


Figura 3.3. Diagrama de barras de las puntuaciones del primer (a) y del segundo (b) componente principal.

En la **Tabla 3.1** y en la **Figura 3.2.b** se puede apreciar que las variables más importantes en el PC 1 son variables sensoriales (Ar, Dil, Ac, D). La **Figura 3.2.b** muestra una relación entre la dilaceración del hollejo (Dil), el tipo de aroma (Ar) y en menor medida la intensidad de aroma (AI) ya que sus valores dentro del PC 1 son cercanos. Las puntuaciones sensoriales de estas variables tienden a aumentar a medida que avanza la maduración, por encontrarse a la derecha del PC 1. Esta pauta sugiere que la dilaceración del hollejo puede tener cierta relación con los dos parámetros aromáticos estudiados pero no con el resto de atributos sensoriales. Como ya se ha dicho, la facilidad de dilaceración del hollejo aumenta con la maduración, lo que podría mejorar la liberación de compuestos aromáticos.

Tabla 3.1. Loadings obtenidos en análisis de componentes principales.

	Componente	
	1	2
Mon (monómeros)	0.317	-0.261
Dim (dímeros)	0.660	-0.413
PD (prodelphinidinas)	0.396	0.871
HB (ác. hidroxibenzoicos)	0.322	0.820
HC (ác. hidroxicinámicos)	0.539	0.478
Ant (antocianos)	0.743	0.383
Flavo (flavonoles)	0.646	0.687
Dil (facilidad dilaceración)	0.892	-0.175
TI (intensidad tánica)	-0.700	0.457
Ac (acidez)	-0.886	-0.071
A (astringencia)	-0.745	0.404
D (sequedad)	-0.860	0.272
Ar (tipo de aroma)	0.891	0.050
AI (intensidad de aroma)	0.506	-0.665

En el PC 1, los compuestos fenólicos del hollejo presentan una pauta similar a la observada para la dilaceración del hollejo (Dil), el tipo de aroma (Ar) y la intensidad de aroma (AI), especialmente los antocianos (Ant) y dímeros de procianidinas (Dim) (valores próximos a estas sensaciones en PC 1), por lo que estos compuestos también aumentan con la maduración. Sin embargo, la intensidad tánica (TI), la astringencia (A), la sequedad (D) y la acidez (Ac) presentan una pauta opuesta, indicando una disminución de sus puntuaciones sensoriales a lo largo de la maduración. Cabe señalar que la sequedad (D) y la acidez (Ac) presentan una alta relación en el PC 1. Esta relación también existe aunque con menor fuerza, entre la intensidad tánica (TI) y la astringencia (A).

Estas observaciones se pueden deducir de la **Figura 3.2.b** por la distancia de las puntuaciones dentro del PC 1 y se pueden comprobar observando los valores de la **Tabla 3.1**.

En cuanto al PC 2 se observa una clara separación entre el año 2008 y 2009 (**Figura 3.2.a**), esta pauta queda destacada en la **Figura 3.3.b**. El gráfico de los *loadings*

(Figura 3.2.b) y sus valores Tabla 3.1 muestran que las variables más importantes en este componente principal son las prodelphinidinas (PD), los ácidos hidroxibenzoicos (HB) y en menor medida los flavonoles (Flavo) y la intensidad de aroma (AI) por presentar los valores absolutos más altos en este PC 2. Esta pauta sugiere altos valores de estos compuestos fenólicos (PD, HB y Flavo) en 2009 y más intensidad aromática en 2008. La tendencia de la intensidad de aroma ya había sido observada en la Figura 3.1 donde se presenta sólo los resultados del análisis sensorial.

3.5) CONCLUSIONES

El análisis multivariante aplicado a los datos sensoriales y a los compuestos fenólicos del hollejo muestra la relación entre ellos y la evolución de las muestras a lo largo de la maduración.

Se ha puesto de manifiesto que el aumento de procianidinas dímeras, flavonoles y principalmente antocianos está relacionado con las sensaciones orales consideradas como buenas (mejor dilaceración del hollejo, mayor intensidad aromática y aromas más maduros) y que sus valores aumentan con la maduración. Por el contrario, la intensidad tánica, la astringencia, la sequedad y la acidez presentan una pauta opuesta, indicando una disminución de sus puntuaciones sensoriales a lo largo de la maduración. Cabe señalar que la sequedad y la acidez están muy relacionadas entre sí. Esta relación también ocurre, aunque en menor medida, con la astringencia y la intensidad tánica.

Asimismo, se ha podido establecer una clara separación entre el año 2008 y 2009. Las variables más importantes para ello son, entre los compuestos fenólicos, las prodelphinidinas, los ácidos hidroxibenzoicos y en menor medida los flavonoles y en los parámetros sensoriales, la intensidad de aroma.

Capítulo 4.

Correlaciones estadísticas entre la composición flavanólica de las semillas de Graciano, el color y los parámetros sensoriales.

4.1) OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es estudiar la posible existencia de correlaciones estadísticas entre el análisis sensorial, el color (parámetros CIELAB) y el contenido de los principales flavanoles presentes en las semillas de uva de Graciano.

Se intenta esclarecer qué compuestos individuales o familias de compuestos fenólicos de las semillas están implicadas en las sensaciones orales percibidas, tanto durante el período de maduración de la uva como en el momento de cosecha.

4.2) JUSTIFICACIÓN

Es comúnmente aceptado, y se ha podido evidenciar en el primer capítulo de esta memoria, que la composición fenólica de semillas de uva varía a lo largo de la maduración. Estos cambios, pueden afectar a importantes parámetros organolépticos, como el color y la astringencia. Los cambios de color que tienen lugar en las semillas durante la maduración han sido relacionados con los cambios en el contenido de los antocianos y de los compuestos fenólicos de las uvas. Esto parece indicar, que la apariencia externa de la semilla podría ser usada como indicador del grado de maduración de la uva (60).

En la uva, las catequinas y procianidinas se encuentran principalmente en los hollejos y las semillas, las cuales son una fuente importante de flavanoles para los vinos (61). En éstos, contribuyen directamente a la sensación de astringencia e indirectamente, mediante la interacción con antocianos, al color de los vinos.

Los mecanismos de la astringencia, todavía hoy no se explican completamente, aunque es bien aceptado que resultan de la interacción entre los compuestos fenólicos y las proteínas o glicoproteínas del epitelio oral (62). Como se ha mencionado anteriormente, diversos estudios apuntan a que la afinidad de las proteínas con los

polifenoles aumenta con el grado de polimerización y con el número de unidades galoiladas (12, 15, 63). Por otro lado, varios autores indican que la extractabilidad de los flavan-3-oles monómeros y las procianidinas de bajo peso molecular disminuye a lo largo de la maduración (64-66), lo que podría afectar a la astringencia de las semillas.

En bibliografía, se han utilizado diversos métodos para obtener una medida objetiva de la astringencia, muchos de ellos son indirectos y en la mayoría de los casos es difícil sacar conclusiones claras. Por este motivo el análisis sensorial continúa siendo una herramienta muy utilizada para obtener una buena estimación de las sensaciones orales (38, 57, 58).

En este sentido, es interesante estudiar las posibles correlaciones entre los parámetros sensoriales considerados comúnmente en bodega y la composición fenólica de las semillas. Así, como la contribución de estos compuestos, dependiendo de su grado de polimerización y galoilación, en las sensaciones orales. Además se pretende evaluar el espacio CIELAB como herramienta para estimar el momento óptimo de maduración desde un punto de vista fenólico.

4.3) MATERIAL Y MÉTODOS

La extracción y el análisis de HPLC-DAD-MS de los compuestos fenólicos fue realizado tal y como se describe en el **Capítulo 1** de esta memoria.

4.3.1 Análisis sensorial

El panel de catadores ha sido descrito en el capítulo anterior. Los parámetros sensoriales estudiados en las semillas fueron: color, astringencia, intensidad tánica y dureza o facilidad de molido (**Anexo I**).

Las muestras utilizadas en este caso fueron recogidas en madurez tecnológica (2005-2008) con el objetivo de comparar las características de las semillas justo en ese momento. También se recogieron muestras a lo largo maduración en 2008, en ocho puntos diferentes de madurez (desde el 3 de septiembre hasta el 5 de noviembre).

4.3.2 Análisis colorimétrico

Con el fin de analizar objetivamente las variaciones de color de las semillas, a lo largo de la maduración, se registraron los parámetros del espacio CIELAB mediante un colorímetro. El equipo utilizado fue un Minolta CR-300 (Osaka, Japan) que permite registrar los parámetros: L^* ; a^* ; b^* y calcula la cromaticidad y tono de la muestra (C^*_{ab} ; h_{ab}). El equipo fue calibrado utilizando sulfato de bario como estándar ($L^*=97.10$, $a^*=0.13$, $b^*=1.88$, $C^*_{ab}=1.88$ y $h_{ab}=86.1$).

4.3.3 Análisis estadístico

Para el procesado de los datos se utilizó el software SPSS 13.0 para Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL). Las diferencias significativas fueron determinadas mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las correlaciones y las regresiones múltiples lineales (MLR) se realizaron con el mismo programa obteniendo los parámetros R (coeficiente de correlación múltiple), B (coeficiente de regresión no estandarizado) y β (coeficiente de regresión estandarizado).

4.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.1 Análisis sensorial

En la **Figura 4.1** se representan las puntuaciones asignadas por el panel de catadores para los atributos sensoriales estudiados en las semillas de 2008, a lo largo de la maduración. Los parámetros evaluados fueron: color, facilidad de molido, intensidad tánica y astringencia. El color, únicamente en el primero muestreo, obtuvo puntuaciones notablemente menores que en el resto de los puntos. Esto indica que los catadores no encontraron casi diferencias entre el color de las semillas correspondientes a los momentos de madurez cercanos a la vendimia. Por lo que se evidencia que la evaluación visual aporta una vaga información a cerca del estado de maduración de la semilla.

Observando el resto de los parámetros evaluados, en el primer muestreo (enero 3 de septiembre) la intensidad tánica y la astringencia consiguen las puntuaciones más altas y tienden a disminuir cuando avanza la maduración. La facilidad de molido

muestra una tendencia contraria. Por tanto cuando la semilla cruje y se rompe con facilidad, la sensación de sequedad y de aspereza que aporta en la boca es menor. Esto podría estar relacionado con la menor extracción de los compuestos fenólicos en la boca cuando la semilla está madura, debido a una mayor lignificación de la misma.

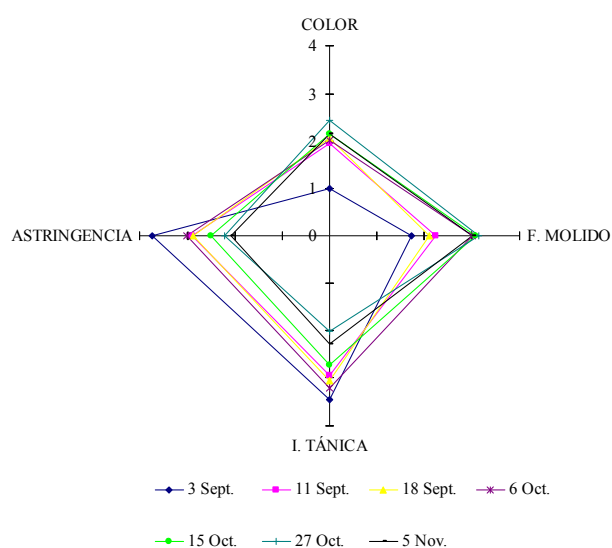


Figura 4.1. Puntuaciones de los parámetros sensoriales de las semillas evaluados a lo largo de la maduración.

En la **Figura 4.2** se muestran los resultados del análisis sensorial de las uvas en el momento de cosecha de cuatro vendimias consecutivas (2005-2008). Como en el caso anterior, se aprecia una relación directa entre la intensidad tánica y la astringencia y una relación indirecta entre estos dos atributos y la facilidad de molido. Según las puntuaciones otorgadas y bajo la percepción del panel de catadores, la vendimia que alcanzó mejor calidad sensorial fue 2005, frente a 2007 que fue la peor valorada.

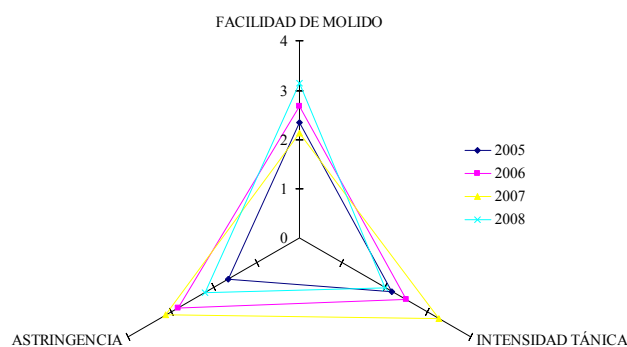


Figura 4.2. Puntuaciones de los parámetros sensoriales de las semillas en el momento de cosecha (vendimias 2005-2008).

4.4.2 Análisis HPLC-DAD-MS

En la **Tabla 4.1** se presenta el contenido total de los flavanoles de bajo peso molecular de los extractos de semillas de uva recogidas con diferente grado de maduración. En la **Tabla 4.2** se muestran los resultados correspondientes a los extractos recogidas en el momento de cosecha a lo largo de los años 2005-2008. Durante la maduración se aprecia un importante descenso en estos compuestos, siendo el contenido total al final de la misma, menos de la mitad que al inicio. Este descenso está probablemente relacionado con el descenso observado en los atributos sensoriales de astringencia e intensidad tánica y con el aumento de la facilidad de molido. Sin embargo, parece que el contenido total de flavanoles de la semilla no es el único factor que afecta a estos atributos. Las muestras de 2006 presentan el contenido en flavanoles más bajo pero tienen puntuaciones más altas en astringencia e intensidad tánica que en los años 2005 y 2008. Esto podría indicar que el perfil cualitativo de las semillas también podría jugar un papel importante en las sensaciones percibidas en la boca.

Tabla 4.1. Contenido total de flavanoles de las semillas con diferente grado de maduración expresado en mg/g de semilla.

	Fecha	Promedio	DS
2008	3-Sep	74.3	3.6 ^d
	11-Sep	70.5	6.7 ^{cd}
	18-Sep	64.4	1.3 ^c
	25-Sep	51.8	2.4 ^b
	6-Oct	45.6	1.2 ^b
	15-Oct	33.0	1.4 ^a
	27-Oct	30.8	0.5 ^a
	5-Nov	32.9	5.2 ^a

DS=desviación estándar (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras (p<0.05)

Tabla 4.2. Contenido total de flavanoles de las semillas correspondiente al momento de cosecha expresado en mg/g de semilla.

	2005		2006		2007		2008	
Total	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS
mg/g	40.9 ± 2.9 ^c		25.3 ± 4.1 ^a		35.4 ± 1.8 ^{bc}		30.8 ± 0.5 ^{ab}	

DS=desviación estándar (n=3). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras (p<0.05)

Los compuestos estudiados son: C: (+)-catequina; EC: (-)-epicatequina; B1: EC(4-8)C; B2: EC(4-8)EC; B3: C(4-8)C; B4: C(4-9)EC; EEC: EC(4-8)EC(4-8)C; C1: EC(4-8)EC(4-8)EC; ECG: (-)-epicatequina 3-O-galato; B2G: EC(4-8)EC 3-O-galato; M: monómeros; D: dímeros; T: trímeros; TE: tetrámeros; DG: dímeros galoilados; TG: trímeros galoilados; TTG: total compuestos galoilados.

Durante la maduración hay una caída en la concentración de la mayoría de los flavanoles identificados (**Figura 4.3**). Los monómeros y los compuestos galoilados sufren el mayor descenso. Entre ellos, el dímero galoilado: epicatequina (4-8)-

epicatequina 3-*O*-galato (B2G) y el monómero galoilado: (-)-epicatequina 3-*O*-galato (ECG) descienden un 60% y un 80% respectivamente. Es sabido que la galoilación incrementa la habilidad de las procianidinas para precipitar proteínas (15). Por esta razón, es posible que un descenso en estos compuestos pueda tener importantes consecuencias en la percepción de la astringencia y/o intensidad tánica. En las fechas cercanas a la maduración no se encuentran diferencias significativas en la composición flavanólica de las semillas. Parece que el 15 de octubre, la semilla ya había alcanzado su mejor madurez fenólica posible (debido probablemente a las condiciones climáticas). También parece mostrarse que la uva no iba a mejorar (desde un punto de vista fenólico) aunque permaneciera más tiempo en la viña.

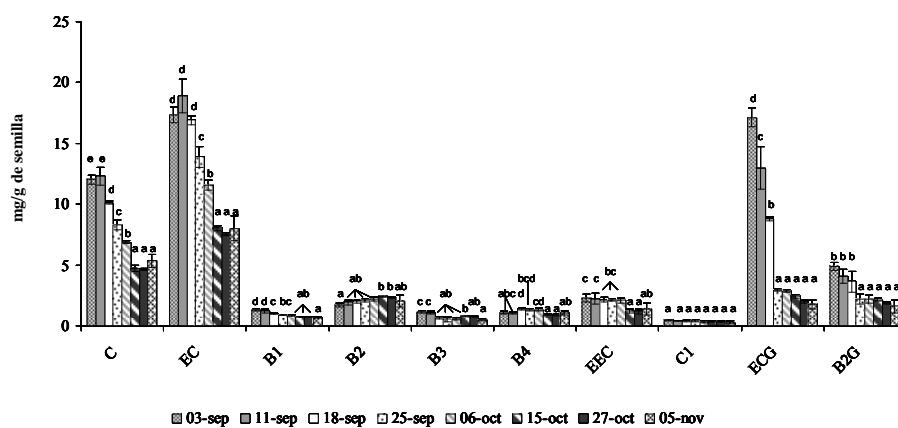


Figura 4.3. Contenido de las principales catequinas y procianidinas de bajo peso molecular presentes en las semillas de Graciano a lo largo de la maduración

Un descenso general en el contenido de las catequinas y las procianidinas de bajo peso molecular podría estar asociado a una disminución de la astringencia durante la maduración.

Las muestras correspondientes a 2006 y 2007, las cuales fueron puntuadas como más astringentes, tienden a presentar menores porcentajes relativos de monómeros y mayores de dímeros y trímeros que 2005 y 2008. Estos resultados estarían de acuerdo

con el estudio de Peleg *et al.* (67) donde se indica que la astringencia aumenta con el tamaño molecular desde monómeros hasta trímeros (**Tabla 4.3**).

Tabla 4.3. Distribución de la composición fenólica de las semillas correspondientes al momento de cosecha (2005-2008). Diferentes letras indican diferencias significativas entre muestras ($p < 0.05$), ($n=3$).

	2005		2006		2007		2008		
% Total	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	Promedio	DS	
M	37.72	± 1.63	b	27.55	± 3.69	a	35.73	± 2.81	b
D	21.42	± 0.59	a	24.64	± 1.33	bc	25.41	± 1.22	c
DG	8.63	± 0.56	b	9.30	± 0.47	bc	6.84	± 0.13	a
T	25.01	± 0.85	b	30.30	± 2.18	c	25.70	± 1.63	bc
TG	2.32	± 0.34	a	3.69	± 0.66	b	2.41	± 0.09	a
TE	5.06	± 0.76	a	4.53	± 0.29	a	3.92	± 0.03	a
TTG	14.68	± 0.31	a	16.52	± 2.50	a	14.94	± 0.16	a

4.4.3 Análisis colorimétrico

Durante el periodo de maduración de la uva el color de las semillas cambia, pasando de un color verde-amarillento, típico de semillas inmaduras, hasta un marrón-castaño, lo que podría estar relacionado con un proceso oxidativo (61, 64). Estos cambios sólo son visualmente apreciables en las primeras etapas de maduración, ya que en las últimas, el panel de catadores no pudo establecer diferencias (**Figura 4.1**).

Los parámetros de color obtenidos se muestran en la **Figura 4.4**. Durante la maduración, el parámetro b^* disminuye, mientras que el parámetro a^* parece mostrar un incremento. Estos cambios pueden ser interpretados como una disminución de los colores amarillo y verde y un aumento del azul y el rojo, dando como resultado el pardeamiento de la semilla. Los parámetros de color: C^*_{ab} , L^* y h_{ab} sufren un disminución progresiva con el tiempo, estabilizándose en fechas cercanas al 15 de octubre, momento en el que ya no se dan variaciones en la composición fenólica (**Tabla 4.1**).

Por otro lado, se han calculado las diferencias de color entre las tres últimas fechas de muestreo ($\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$). Los resultados indican que no es

posible distinguir el color entre ellas, ni analítica ni visualmente, ya que las diferencias son menores a 1 ($\Delta E^*_{ab} < 1.0$).

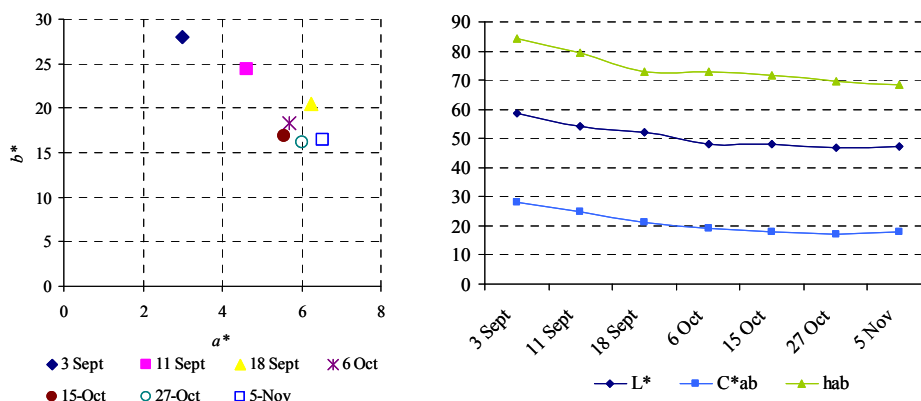


Figura 4.4. Evolución de los parámetros CIELAB de las semillas con diferente grado de maduración.

4.4.4 Análisis estadístico

Las correlaciones de Pearson obtenidas entre la composición flavanólica y los parámetros sensoriales muestra que los compuestos flavanólicos están altamente correlacionados con la intensidad tánica (TI) y la astringencia (A) (**Tabla 4.4**). Aunque existen diferencias de correlación entre la composición fenólica de las semillas y cada uno de estos parámetros. Existe una alta correlación entre A y los compuestos galoilados y especialmente con los dímeros galoilados (correlación de Pearson: 0.830 y 0.836, respectivamente). Observando las correlaciones observadas para TI se puede apreciar que no son tan altas con los compuestos galoilados como en el caso de A.

Se realizó una regresión múltiple lineal (MLR), llevando a cabo con un método de selección de variables, conocido como pasos hacia delante. Para seleccionar las variables apropiadas, se utilizaron sólo aquellas variables que previamente habían mostrado una correlación significativa $p < 0.05$ en el análisis de correlación. Con la finalidad de determinar qué compuestos o familia de compuestos fenólicos de las

semillas explican mejor los cambios ocurridos en las sensaciones orales. Las variables A, TI y HS fueron consideradas como dependientes y los compuestos fenólicos como variables independientes. Las ecuaciones obtenidas fueron las siguientes:

$$HS = -0.262 DG + 4.022 (R= 0.877)$$

$$TI = 0.191 T + 1.467 (R = 0.815)$$

$$A = 0.219 DG + 1.509 (R = 0.836)$$

Como se puede ver, las variables que mejor explican las variaciones ocurridas en los parámetros sensoriales HS y A son los dímeros galoilados y los trímeros en el caso de TI. En recientes estudios realizados en vinos, se ha puesto de manifiesto que la disminución de la astringencia con el tiempo, coincide con la desaparición de dímeros galoilados en las últimas etapas de envejecimiento (13).

En la **Tabla 4.5** se muestran los coeficientes de correlación entre los parámetros colorimétricos y la composición flavanólica de las semillas. Debido fundamentalmente a la tendencia opuesta que presentaban los parámetros a^* y b^* a lo largo de la maduración, cuando existe una correlación entre la composición fenólica y ambos parámetros (en los casos de C, B1, B3, ECG, B2G, M, DG y TTG), éstas resultan ser negativas en el caso de a^* y directas en el caso de b^* . Una vez más, los compuestos galoilados muestran los coeficientes de correlación más altos, siendo la epicatequina 3-*O*-galato la que presenta los valores mayores, -0.749 para a^* y 0.979 para b^* . No hay que olvidar que el contenido de este compuesto (ECG) es el que sufre el mayor descenso durante la maduración. Los parámetros de color C^*_{ab} , L^* y h_{ab} presentan altos coeficientes de correlación con algunos compuestos flavanólicos, principalmente con: ECG, TTG, B2G, B1, C, B3, DG and EC.

Se ha postulado que existe una relación entre el contenido de flavanoles y el grado de pardeamiento del vino blanco (68). También se ha evidenciado que los compuestos formados por la oxidación de flavanoles durante la fermentación del té negro son responsables de su color (69). Por lo que cabe pensar, que la relación encontrada en este estudio entre los flavanoles, compuestos no coloreados, y el cambio de color de las semillas a lo largo de la maduración podría estar ligado a procesos de oxidación.

Las ecuaciones obtenidas mediante la regresión lineal múltiple se presentan a continuación. El coeficiente β (coeficiente de regresión estandarizado) fue obtenido para conseguir una mejor contribución, de cada variable, al modelo.

$$L^* = 50.816 + 0.663 \text{ ECG} - 2.087 \text{ B2}; (R = 0.984); (\beta: \text{ ECG} = 0.894; \text{ B2} = -0.137)$$

$$a^* = 9.803 - 5.377 \text{ B3}; (R = 0.818); (\beta: \text{ B3} = -0.818)$$

$$b^* = 19.581 + 0.664 \text{ ECG} - 1.861 \text{ B2}; (R = 0.984); (\beta: \text{ ECG} = 0.904; \text{ B2} = -0.123)$$

$$C^*_{ab} = 19.357 + 0.403 \text{ ECG} + 4.517 \text{ B1} - 2.527 \text{ B2}; (R = 0.984); (\beta: \text{ ECG} = 0.604; \\ \text{ B1} = 0.270; \text{ B2} = 0.184)$$

$$h_{ab} = 74.168 + 1.661 \text{ ECG} - 1.454 \text{ C}; (R = 0.936); (\beta: \text{ ECG} = 1.549; \text{ C} = -0.723)$$

Los resultados muestran que ECG es el compuesto más relacionado con los parámetros de color L^* , b^* , C^*_{ab} , y h_{ab} , ya que muestra los valores más altos de β . En el caso del parámetro a^* , el dímero B3 juega un papel importante.

Tabla 4.4. Coeficientes de correlación de Pearson entre la composición flavanólica de las semillas y los parámetros sensoriales.

	C	EC	B1	B2	B3	B4	EEC	C1	ECG	B2G	M	D	T	TE	DG	TG	TTG
COL	-0.699**	-0.615**	-0.761**	0.623**	-0.557**	-0.169	-0.556**	-0.417*	-0.794**	-0.733**	-0.651**	-0.384	-0.533**	-0.282	-0.724**	-0.073	-0.792**
HS	-0.865**	-0.861**	-0.813**	0.590**	-0.386	-0.442*	-0.715**	-0.518**	-0.744**	-0.735**	-0.866**	-0.459*	-0.785**	-0.569**	-0.877**	-0.478*	-0.823**
TI	0.705**	0.730**	0.668**	-0.433*	0.272	0.594**	0.759**	0.432*	0.575**	0.605**	0.723**	0.487*	0.815**	0.717**	0.782**	0.543**	0.676**
A	0.780**	0.756**	0.813**	-0.528**	0.549**	0.387	0.717**	0.519**	0.785**	0.777**	0.768**	0.564**	0.698**	0.532**	0.836**	0.285	0.830**

Correlación de Pearson * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Tabla 4.5. Coeficientes de correlación de Pearson entre los parámetros colorimétricos y la composición flavanólica de las semillas.

	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>L</i> *	<i>C</i> * <i>ab</i>	<i>hab</i>
C	-0.464*	0.900**	0.904**	0.918**	0.692**
EC	-0.361	0.826**	0.836**	0.848**	0.606**
B1	-0.584**	0.927**	0.931**	0.937**	0.765**
B2	0.374	-0.678**	-0.685**	-0.695**	-0.516**
B3	-0.818**	0.790**	0.764**	0.760**	0.851**
B4	0.276	0.107	0.130	0.143	-0.091
EEC	-0.179	0.621**	0.621**	0.652**	0.402
C1	-0.216	0.456*	0.459*	0.475*	0.321
ECG	-0.749**	0.979**	0.978**	0.972**	0.888**
B2G	-0.673**	0.907**	0.917**	0.899**	0.819**
M	-0.404*	0.859**	0.867**	0.879**	0.643**
D	-0.395	0.537**	0.530**	0.531**	0.501*
T	0.007	0.530**	0.550**	0.577**	0.242
TE	0.211	0.228	0.255	0.269	-0.003
DG	-0.419*	0.843**	0.866**	0.862**	0.640**
TG	0.488*	-0.037	0.023	0.015	-0.296
TTG	-0.638**	0.955**	0.964**	0.958**	0.815**

4.5) CONCLUSIONES

El contenido en catequinas y procianidinas oligómeras de las semillas de Graciano sufre un importante descenso durante la maduración de la uva. Los contenidos de estos compuestos en el momento de vendimia son aproximadamente la mitad que en el envero. El dímero galoilado (B2G) y la epicatequina 3-*O*-galato son los compuestos cuyos contenidos descienden en mayor medida. Los cambios en la composición fenólica están ligados a cambios en la intensidad tánica y la astringencia, las cuales tienden a disminuir con la maduración, mientras que la facilidad de molido muestra una tendencia contraria. Cuando las semillas se rompen con facilidad, la sensación de aspereza y sequedad en boca es reducida.

El contenido de flavanoles en las semillas no es el único factor que afecta a estas sensaciones orales ya que las muestras con contenidos mayores de flavanoles presentan menor astringencia e intensidad tánica que muestras con contenidos más bajos. Por tanto, el perfil cualitativo de las semillas puede jugar un papel importante en este aspecto.

Los parámetros de color del espacio CIELAB estudiados en las semillas tienen coeficientes de correlación altos con algunos de los compuestos fenólicos estudiados, siendo ECG el más importante. Teniendo en cuenta que los flavanoles son flavonoides no coloreados, esta relación podría estar ligada a procesos de oxidación.

Por otro lado, el análisis estadístico muestra qué compuestos están más relacionados con los atributos sensoriales y con el color, lo que podría ser útil para esclarecer el papel de cada uno de estos compuestos en estas características organolépticas. Sin embargo, se debe realizar un estudio más completo para poder predecir los atributos sensoriales y los parámetros de color a partir de los compuestos fenólicos y *viceversa*.

Capítulo 5.

Interacción de las procianidinas de semillas de uva con seroalbúmina bovina y α -amilasa y su relación con la percepción de astringencia.

5.1) OBJETIVOS

El propósito de este capítulo es estudiar la capacidad de las procianidinas presentes en extractos de semillas de uva para unirse a seroalbúmina bovina y α -amilasa. Para llevar a cabo este objetivo se han utilizado uvas de Graciano recolectadas en dos puntos de madurez diferentes. Las técnicas utilizadas para este fin han sido la nefelometría y el *quenching* de fluorescencia. Además, se ha realizado un análisis sensorial para evaluar la astringencia y la intensidad tánica de las semillas.

5.2) JUSTIFICACIÓN

Lo que conocemos comúnmente como taninos de la semilla, generalmente son: monómeros, oligómeros (principalmente dímeros y trímeros) y polímeros compuestos por unidades de (+)-catequina, (-)-epicatequina y epicatequina galato. La presencia de estos monómeros y de los 4 dímeros con enlaces C4-C8, parece ser una constante en la composición flavánica de la uva. Los enlaces interflavánicos C4-C6 son menos habituales y no se encuentran en la uva niveles significativos de derivados con enlaces de tipo A. En general, los monómeros parecen ser los flavanoles mayoritarios de la semilla, aunque esto puede variar según la variedad (70-72). Las procianidinas B2 y B4 están prácticamente sólo presentes en las semillas de uvas (13), siendo el último el dímero mayoritario en las mismas. El trímero C1 (epicatequina (4 β →8)-epicatequina (4 β →8)-epicatequina) también se encuentra bien representado en las semillas de uva (63, 70). Entre los flavanoles galoilados, sólo se han encontrado derivados esterificados en las unidades de epicatequina; en la uva no se ha encontrado la unidad catequina galoilada. Los derivados esterificados con ácido gálico se encuentran siempre en menor proporción a la de sus equivalentes no acilados (73). Los derivados galoilados son más abundantes en la semilla que en el hollejo, en el cual prácticamente no se detectan (71). El contenido de los compuestos fenólicos de las uvas, como hemos visto en el **Capítulo**

1 y de acuerdo con otros autores, se modifica a lo largo de la maduración de la uva (64, 65, 74-77), lo que podría influir en su capacidad para unirse a sustancias como proteínas, polisacáridos, alcaloides, radicales libres e iones metálicos.

Los compuestos fenólicos reducen la capacidad lubricante de la saliva, incrementando la fricción y disminuyendo la viscosidad (78, 79). Algunos autores han indicado que la interacción de los taninos con las proteínas salivares está involucrada en los mecanismos de la astringencia (26, 80). Se han llevado a cabo numerosos estudios para correlacionar e incluso predecir esta sensación. Las técnicas *in vitro* basadas en la reactividad de los compuestos fenólicos con diferentes proteínas han sido ampliamente utilizadas (12, 15, 23, 40-42, 81-83). Así, la seroalbúmina bovina (BSA) y la α -amilasa han sido comúnmente utilizadas para estudiar la interacción tanino-proteína (6, 41-43). Ambas son proteínas globulares, la BSA es una cadena de polipéptidos, formada por 58 residuos de aminoácidos con dos residuos de triptófano, el cual es responsable de la fluorescencia intrínseca de la proteína. La α -amilasa obtenida de páncreas porcino, es una cadena polipeptídica formada por 496 residuos de aminoácidos y 17 residuos de triptófano con fluorescencia intrínseca (84-86) y generalmente, se considera que es similar a la humana (84).

Se ha comentado anteriormente que la interacción de los taninos con las proteínas ha sido ampliamente estudiada por diversas técnicas. La nefelometría, la turbidimetría y el *quenching* de fluorescencia han sido utilizados recientemente con esta finalidad (17, 42, 43, 46, 87). La nefelometría y la turbidimetría son técnicas que de forma sencilla permiten una estimación directa de la cantidad de complejos tanino-proteína formados (88). Las medidas de fluorescencia aportan además información sobre el entorno molecular que se existe en las proximidades del cromóforo.

La disminución de la intensidad de la fluorescencia intrínseca de la proteína se llama *quenching* (apagamiento). Puede ocurrir mediante diferentes mecanismos:

- *quenching* colisional o dinámico: el estado excitado del fluoróforo es desactivado por el contacto con otras moléculas, conocidas como *quenchers* [Q].
- *quenching* estático: es el resultado de la formación de complejos no fluorescentes entre el fluoróforo y los *quenchers*.

La interacción entre los polifenoles y las proteínas pueden ocurrir de dos formas (5). Entre el grupo hidroxilo de los compuesto fenólicos y el grupo carbonilo de los péptidos formando puentes de hidrógeno o entre la parte apolar de los residuos de los aminoácidos con el anillo aromático del compuesto fenólico mediante interacciones hidrofóbicas (apilamiento).

Aunque la precipitación de proteínas puede estar muy relacionada con la astringencia, este fenómeno no parece explicar completamente dicha sensación oral (91), encontrando incluso datos contradictorios (23). Por eso todavía hoy se sigue cuestionando la interacción tanino-proteína como una medida objetiva de este atributo organoléptico (92, 93). Además, la precipitación de proteínas salivares no es el único mecanismo involucrado en la percepción de la astringencia (94, 95). También puede ser debida, al menos en parte, a la unión de las procianidinas y/o de complejos tanino-proteína con células del epitelio oral (95-97). De hecho, se ha demostrado la unión entre la epigallocatequina 3-*O*-galato del té verde y el receptor laminar 67-kDa (98), proteína que ha sido encontrada en la matriz extracelular de la mucosa oral (99).

En este contexto y considerando que en este campo todavía queda mucho por explorar, se plantea este estudio, en el que se considera tanto la interacción tanino-proteína como la percepción de la astringencia.

5.3) MATERIAL Y MÉTODOS

5.3.1 Muestreo, extracción y análisis de las semillas

Las muestras de semillas utilizadas corresponden a dos años (2008-2009) y dos puntos de maduración (después del envero y en madurez tecnológica). La extracción y el análisis de los extractos han sido explicados en el capítulo 1. La metodología del análisis sensorial también ha sido explicada con anterioridad (**Capítulo 3**).

5.3.2 Fundamentos del *quenching* de fluorescencia

El fenómeno de *quenching* de fluorescencia se refiere a procesos que provocan una disminución en la intensidad de fluorescencia de una sustancia dada, mediante

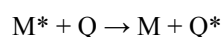
moléculas desactivadoras (*quenchers*). El *quenching* puede ser resultado de varios mecanismos, que incluyen, reacciones de los estados excitados, transferencia de energía, formación de complejos y *quenching* por colisiones (100). El *quenching* de fluorescencia proporciona evidencia de la existencia de interacciones moleculares y nos puede dar una valiosa información sobre la accesibilidad de las moléculas de triptófano a diferentes *quenchers*. Es una herramienta metodológica que permite visualizar cambios conformacionales, unión de ligandos o asociación de proteínas en disolución.

El fenómeno puede dividirse en dos grupos: “*quenching colisional o dinámico*”, cuando la desactivación es resultado de los choques entre moléculas (molécula fluorescente y quencher [Q]), y “*quenching estático*”, cuando es el resultado de formación de complejos. A veces no resulta fácil distinguir entre uno y otro, pero es posible con un estudio adecuado de los tiempos de vida de fluorescencia.

Ambos tipos de desactivación requieren de contacto molecular entre la molécula fluorescente y la molécula *quencher* [Q]. Este fenómeno es especialmente importante en disoluciones acuosas donde las colisiones son frecuentes. En disolución, el proceso difusional limita la velocidad con que ambas moléculas, especie excitada y *quencher*, se encuentran, pero hace el encuentro prolongado, pudiendo ocurrir cientos de choques antes de separarse.

Una gran variedad de sustancias pueden actuar como *quenchers* de fluorescencia. Uno de los mejores ejemplos de *quenching colisional* viene dado por el oxígeno molecular. Por ello es necesario eliminar el oxígeno disuelto de las muestras sobre las que se desea medir tiempos de vida de fluorescencia o rendimientos cuánticos de fluorescencia. Otros ejemplos son las aminas alifáticas y aromáticas, el xenón, el peróxido de hidrógeno, la acrilamida, los bromatos, los yoduros, etc. Debido a la gran variedad de moléculas *quenchers*, se debe identificar aquellas de interés para cada molécula fluorescente en particular.

Esquemáticamente, el *quenching colisional o dinámico* puede representarse como una transferencia de energía entre una especie excitada (M^*) y una especie *quencher* (Q):



El *quenching* dinámico se describe mediante la ecuación de Stern-Volmer:

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q] \quad \text{eq 1}$$

donde F_0 y F son las intensidades de emisión fluorescente en ausencia y presencia del *quencher* respectivamente, K_{sv} es la constante de Stern-Volmer, $[Q]$ es la concentración del *quencher*, k_q es la constante bimolecular de *quenching* y τ_0 es el tiempo de vida medio de fluorescencia de la especie emisora.

La constante de Stern-Volmer está relacionada con la accesibilidad del fluoróforo al *quencher* (mayor K_{sv} implica mayor accesibilidad) y cuando el *quenching* es colisional (dinámico) es igual al producto de la constante cinética de reacción entre el estado excitado y el *quencher* (k_q) y el tiempo de vida media del fluoróforo (τ_0).

La constante de velocidad k_q depende de los coeficientes de difusión del fluoróforo y del *quencher*. Mediante la ecuación de Einstein-Smoluchowski se puede utilizar K_{sv} para determinar coeficientes de difusión.

$$K_{sv} = k_q \cdot \tau_0$$

La ecuación 1 (eq 1) se aplica para determinar la constante de Stern-Volmer (K_{sv}), mediante una regresión lineal, en un gráfico de F_0/F frente a la concentración de *quencher* $[Q]$. Si se obtienen curvas lineales con pendientes idénticas a las constantes K_{sv} encontradas en las gráficas de Stern-Volmer obtenidas de las medidas de intensidad de fluorescencia, es indicativo de una sola clase de fluoróforos en la proteína, accesibles por igual para el *quencher*. Esto también significa que solamente ocurre un tipo de mecanismo, dinámico o estático. En el caso del mecanismo estático, se forma un complejo, y en tal caso, se calcula la constante K_q entre K_{sv} y τ_0 .

Para BSA, el tiempo de vida del fluoróforo es aproximadamente de 5 ns (100) y para la α -amilasa es aproximadamente de 2.97 ns (101).

El valor máximo posible de difusión límite de *quenching* en agua es $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, cuando el valor de la constante biomolecular de *quenching* es superior a éste, podría significar que existe la formación de un complejo entre la proteína y el *quencher*, lo que corresponde a un mecanismo estático. Hay estudios que indican que el *quenching* de BSA se debe a interacciones de tipo específico, en estos casos los valores de la

constante biomolecular de *quenching* son superiores al valor de difusión límite del agua. Los valores inferiores a $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pueden deberse a impedimentos estéricos con el fluoróforo.

En algunos casos, puede darse *quenching* colisional y estático con el mismo *quencher*. En otras ocasiones, una curvatura hacia arriba en la representación gráfica entre F_0/F y la concentración de *quencher* [Q] indica la presencia de una esfera de acción. Esto supone la existencia de un volumen de esfera alrededor del fluoróforo, en la cual el *quencher* tendría la posibilidad de unirse. Cuando es este el caso, en el gráfico de Stern-Volmer se da una curvatura cóncava hacia el eje y a altas concentraciones de *quencher*, y entonces F_0/F está relacionada con [Q] mediante la ecuación modificada de Stern-Volmer (eq 2):

$$F_0/F = (1 + K[Q])\exp([Q]VN/1000)$$

donde V es el volumen de la esfera y N es el número de Avogadro. Si $K[Q]$ es lo suficientemente pequeño, $(1 + K[Q]) \approx \exp(K[Q])$, lo que sería equivalente a $\exp([Q]VN)$ (102), entonces la anterior ecuación, se convierte en la ecuación 2 (eq 2):

$$F_0/F = e^{(K[Q])} \quad \text{eq 2}$$

5.3.3 *Quenching* de fluorescencia y actividad específica del tanino

Para los ensayos de *quenching* se utilizó un equipo Perkin-Elmer LS 45, la longitud de onda de excitación fue de 290 nm y el espectro de emisión fue registrado desde 300 hasta 500 nm, en ambos casos con un intervalo de 10 nm.

El ensayo del *quenching* de fluorescencia se llevó a cabo en tampón acetato 100 mM en (etanol/agua) al 12% (v/v) a pH 5.0. Es bien sabido que BSA y α -amilasa interaccionan bien con los polifenoles a este pH (42). Las soluciones de BSA y α -amilasa (20 μM) y los extractos de procianidinas (1:10) fueron preparados en ese medio. Todas las disoluciones fueron filtradas a través de un filtro con tamaño de poro de 0.45 μm . En microtubos de 2 mL, se ponían (75 μL) de disolución de BSA y se iba adicionando diferentes volúmenes de la disolución que contenía el extracto de semillas

(desde 0 hasta 200 μL), finalmente se añadía tampón acetato hasta completar un volumen final de 500 μL .

En los ensayos con α -amilasa, el volumen final era de 100 μL . A 15 μL de disolución de α -amilasa se iba adicionando diferentes volúmenes de la disolución que contenía el extracto de semillas (desde 0 hasta 30 α -amilasa). Durante la realización de los ensayos todas las disoluciones eran almacenadas a 4 °C en un baño de hielo. Los microtubos eran homogeneizados durante 10 segundos con ayuda de un vortex. El cambio en la intensidad de emisión de fluorescencia era medida un minuto después de adicionar el extracto de semillas a las disoluciones de proteínas. Para cada concentración de polifenoles se realizaba un blanco, en el que la disolución de proteína era remplazada por la cantidad correspondiente de tampón acetato. El espectro del blanco era automáticamente restado del espectro de emisión de la disolución correspondiente. Entre cada medida, la celda era lavada y se añadía una pequeña cantidad de la siguiente muestra para evitar una posible dilución.

La actividad específica de los extractos de polifenoles de semillas fue realizada mediante nefelometría (15, 90). En este caso la longitud de onda de emisión y de excitación es la misma (400 nm). A esta longitud de onda, las proteínas y los taninos no absorben la luz incidente (17). Los ensayos fueron realizados en tampón acetato 100 mM. A una disolución de BSA (50 μL) se añadían diferentes volúmenes (desde 0 hasta 70 μL) de extracto de semillas (1:20), el volumen final era de 500 μL . La mezcla de disoluciones se homogeneizaba y se dejaba reposar 30 minutos hasta su medición. El blanco era medido antes de la adición de BSA.

La actividad específica del tanino fue expresada en unidades de turbidez nefelométrica (NTU/mL de extracto). También se realizaron ensayos de nefelometría mediante un turbidímetro (HACH 2100N). A un volumen de 2800 μL de tampón acetato 100 mM se añadían 200 μL de extracto de semilla y se realizaba un blanco. Después se añadían 100 μL de disolución de BSA y se homogeneizaba durante 10 segundos. La mezcla reposaba durante 30 min antes de ser medida. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

5.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.4.1 Análisis sensorial

En la **Figura 5.1** se muestran los valores obtenidos por el panel de catadores en el análisis sensorial para los atributos de astringencia y de intensidad tánica (desde 1, menos sensación, hasta 4, más sensación, **Anexo I**). Se puede apreciar que existen diferencias entre los dos estados de maduración estudiados, de tal forma que los valores cuando las semillas están maduras son generalmente más bajos (por debajo de 3) que cuando están verdes (próximos o por encima de 3). Además, de los resultados se deduce que, de manera general, el año 2008 fue una añada más astringente y tánica que 2009. Entre los viñedos de estudio, el viñedo 1 obtuvo mayores puntuaciones en estas sensaciones que el viñedo 2, en el punto de maduración.

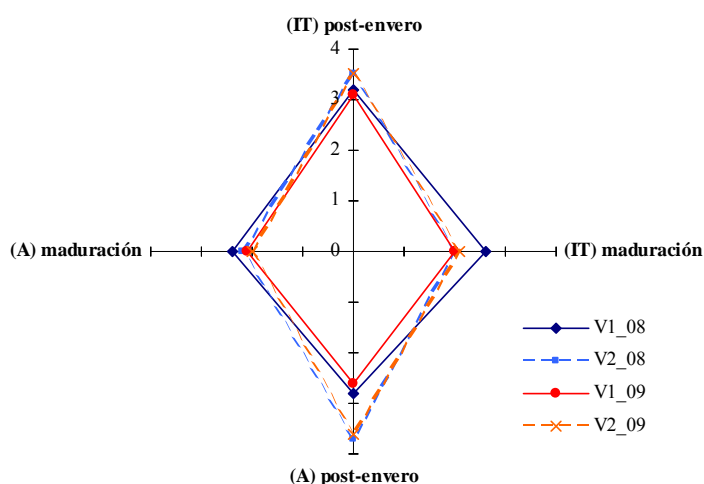


Figura 5.1. Análisis sensorial de las semillas de los parámetros sensoriales astringencia (A) e intensidad tánica (IT) en dos estados de maduración diferentes. V1_08: viñedo 1 año 2008; V2_08: viñedo 2 año 2008; V1_09: viñedo 1 año 2009; V2_09: viñedo 2 año 2009.

5.4.2 *Quenching* de fluorescencia

Los cambios conformacionales de las proteínas α -amilasa y BSA fueron evaluados mediante la medida de la intensidad de fluorescencia intrínseca de los residuos de triptófano antes y después de la adición del extracto de semillas. El *quenching* de fluorescencia de los complejos de α -amilasa y BSA fueron evaluados adicionando concentraciones crecientes de procianidinas de semillas, con dos grados de maduración diferentes (post-envero y madurez). En la **Figura 5.2** se muestra el efecto en el espectro de emisión de fluorescencia (λ_{ex} 290 nm), tanto para α -amilasa como para BSA, cuando se adicionan diferentes concentraciones de extracto de semillas (*quencher* [Q]). En todos los casos estudiados, se apreció una disminución en la intensidad de fluorescencia causada por el efecto *quenching*. Los espectros que se muestran en la **Figura 5.2** (no se muestran todos los casos) corresponden al viñedo 2 en el momento de post-envero y al año 2008 (V2_08). No se apreció un desplazamiento en el máximo de la longitud de onda de emisión, lo que significa que la conformación molecular de la proteína no se ve afectada por el mecanismo de interacción de los flavanoles. Todos los espectros fueron corregidos restando el espectro del *quencher* de fluorescencia a la concentración correspondiente en cada caso. Este modo de corrección había sido validado anteriormente (41). La intensidad de fluorescencia del triptófano disminuye fuertemente en ambas proteínas (α -amilasa y BSA) lo que demuestra una alta afinidad de los extractos de semillas para complejar proteínas, en las concentraciones estudiadas.

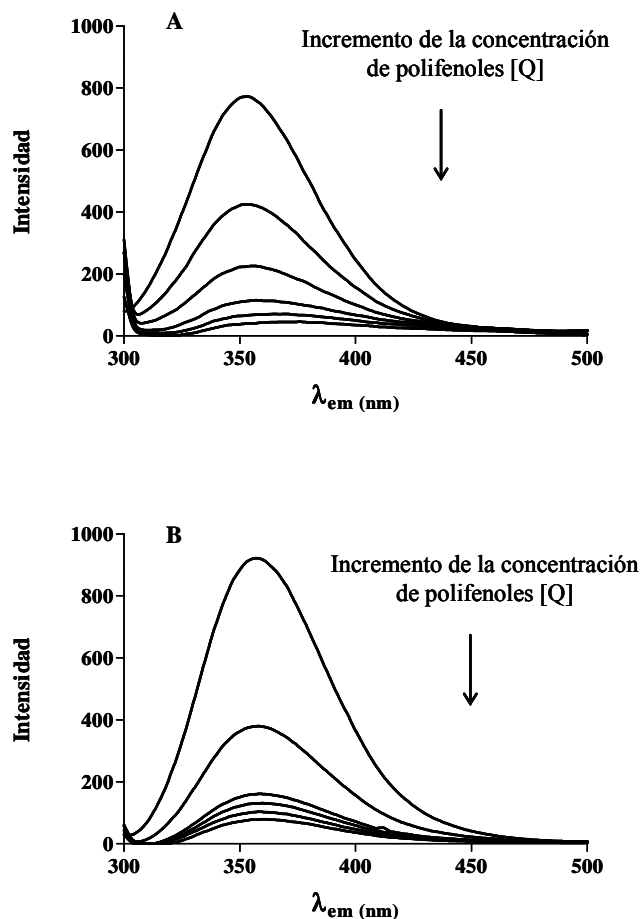


Figura 5.2. Espectros de emisión de α -amilasa (A) y BSA (B) $3 \mu\text{M}$ a $\lambda_{\text{ex}} 290 \text{ nm}$ en presencia de diferente concentración de procianidinas de semillas [Q] a pH 5.0.

En la **Figura 5.3** se muestra los gráficos de Stern-Volmer para el *quenching* de fluorescencia de BSA en el momento de post-enero y de maduración tecnológica. El gráfico de Stern-Volmer (**Figura 5.3.A**) presenta una curvatura cóncava en el eje y cuando las concentraciones del *quencher* [Q] son altas. Este comportamiento podría indicar que el fluoróforo podría unirse mediante los dos mecanismos descritos anteriormente, estático y dinámico, o la existencia de una esfera de acción. Por tanto, en ambos casos, tanto para BSA como para α -amilasa, el *quenching* de fluorescencia

obedece a la ecuación modificada de Stern-Volmer (eq 2) descrita previamente (Figura 5.3.B).

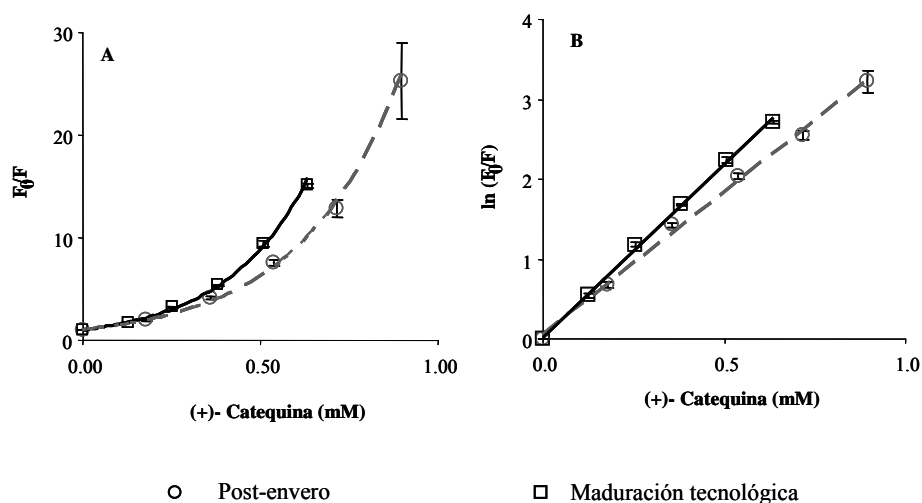


Figura 5.3. Gráfico de Stern-Volmer (A) y de la ecuación modificada de Stern-Volmer (B) según el grado de madurez de la semilla (BSA $3 \mu\text{M}$ y pH 5.0).

En la **Tabla 5.1** se presentan la constante modificada de Stern-Volmer (K_{app}) y la constante biomolecular (K_q) de todos los casos ensayados. La constante biomolecular permite establecer si el *quenching* es debido a la formación de complejos que afectan al entorno del triptófano. La constante biomolecular en los ensayos siempre es mayor a $10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ lo que sugiere la formación de complejos entre las proteínas estudiadas y los extractos de semillas. En la tabla también se puede observar que en algunos casos, los valores de K_{app} (pendiente de la recta obtenida a partir de la ecuación modificada de Stern-Volmer) muestran diferencias significativas entre los grados de madurez de la semilla, siendo siempre más elevados en el momento de madurez tecnológica que en post-envero. Generalmente, BSA obtiene valores de K_{app} más altos que α -amilasa, lo que podría explicar una mejor selectividad de la primera para unirse a los compuestos fenólicos presentes en las semillas de uva. Por otro lado, cabe mencionar que otros autores encontraron valores de la constante de Stern-Volmer mayores en α -amilasa que en BSA cuando estudiaron compuestos aislados (42). En el caso de los extractos de

semillas maduras, los valores de K_{app} son más elevados, lo que indica una mayor afinidad por unirse a las proteínas frente a los extractos verdes. Esto resultaba inesperado ya que cabría pensar que los extractos de semilla más verdes tuvieran mayor afinidad para unirse a las proteínas puesto que sensorialmente son más astringentes. Parece apuntarse, por tanto, que la astringencia percibida no puede ser evaluada de forma objetiva, al menos únicamente, por estos mecanismos.

Tabla 5.1. Constante aparente estática (K_{app}) y biomolecular (K_q) del quenching de fluorescencia para las interacciones entre extractos de semillas de uva con diferente grado de maduración y las proteínas α -amilasa y BSA a pH 5.0. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

BSA			BSA		
	Verde	Maduro		Verde	Maduro
Viñedo 1	$K_{app} (M^{-1})$		Viñedo 1	$K_q \times 10^{11} (M^{-1} s^{-1})$	
2008	2850 ± 110 ^{a,b}	3015 ± 83 ^{b,c}	2008	5.70 ± 0.22 ^{a,b}	6.03 ± 0.17 ^{b,c}
2009	2703 ± 140 ^a	3066 ± 37 ^{b,c}	2009	5.41 ± 0.28 ^a	6.13 ± 0.07 ^{b,c}
Viñedo 2	$K_{app} (M^{-1})$		Viñedo 2	$K_q \times 10^{11} (M^{-1} s^{-1})$	
2008	3243 ± 39 ^c	3929 ± 129 ^e	2008	6.48 ± 0.08 ^{c,d}	7.86 ± 0.26 ^{d,e}
2009	3564 ± 120 ^d	4319 ± 16 ^f	2009	7.13 ± 0.24 ^e	8.64 ± 0.03 ^f

α-amilasa			α-amilasa		
	Verde	Maduro		Verde	Maduro
Viñedo 1	$K_{app} (M^{-1})$		Viñedo 1	$K_q \times 10^{11} (M^{-1} s^{-1})$	
2008	1812 ± 37 ^a	2472 ± 164 ^b	2008	6.10 ± 0.12 ^a	8.32 ± 0.55 ^b
2009	3014 ± 122 ^c	3160 ± 143 ^c	2009	10.1 ± 0.41 ^c	10.64 ± 0.48 ^c
Viñedo 2	$K_{app} (M^{-1})$		Viñedo 2	$K_q \times 10^{11} (M^{-1} s^{-1})$	
2008	1919 ± 88 ^a	2280 ± 15 ^b	2008	6.46 ± 0.30 ^a	7.68 ± 0.05 ^b
2009	2453 ± 43 ^b	2905 ± 94 ^c	2009	8.26 ± 0.15 ^b	9.8 ± 0.32 ^c

5.4.3 Actividad específica del tanino

Se realizaron ensayos de nefelometría para observar la influencia del grado de madurez de la semilla en la habilidad para formar agregados insolubles con BSA comercial. La **Figura 5.4** muestra las diferencias en la formación de agregados insolubles entre los extractos maduros y verdes. Un incremento en la concentración de polifenoles produce siempre un mayor aumento en la intensidad de la luz dispersada. Sin embargo, cuando el extracto adicionado procede de semillas maduras la pendiente de la recta es mayor que cuando las semillas son verdes.

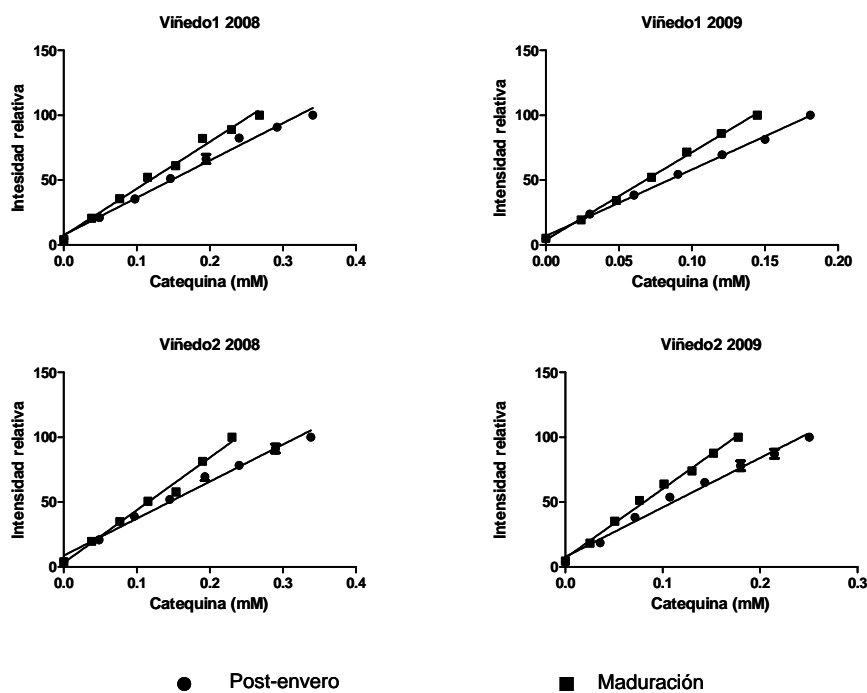


Figura 5.4. Actividad específica del tanino en extractos de semillas verdes y maduras.

En la **Tabla 5.2** se presentan los resultados obtenidos mediante nefelometría. Por un lado (**Tabla 5.2.A**), se muestran los valores de nefelometría a partir de la pendiente media (n=3) de las rectas obtenidas entre la intensidad de la luz dispersada y las

diferentes concentraciones de extracto de semillas adicionadas. Los valores son significativamente superiores cuando el extracto utilizado procede de semillas maduras. Por otro lado (**Tabla 5.2.B**), y mediante la utilización de un turbidímetro, se ha obtenido la actividad específica de los extractos expresada en unidades nefelométricas de turbidez (NTU/mL de extracto). Los resultados también muestran una mayor afinidad para unirse a proteínas cuando los extractos eran procedentes de semillas maduras. Este comportamiento es similar al observado en los ensayos de fluorimetría.

Tabla 5.2. Actividad específica de los extractos de semillas (NTU/mL de extracto) (A) mediante BSA y pendiente de la recta a partir de diferentes concentraciones de polifenoles (B). Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

A)			B)		
	Verde	Maduro		Verde	Maduro
Viñedo 1	<i>pendiente de la recta</i>		Viñedo 1	<i>NTUs</i>	<i>NTUs</i>
2008	287.2 ± 7.7 ^a	361.6 ± 8.5 ^b	2008	14.2 ± 0.6 ^{a,b}	21.4 ± 0.3 ^c
2009	512.9 ± 8.1 ^d	675.5 ± 11.4 ^f	2009	11.3 ± 2.6 ^a	18.2 ± 0.5 ^{b,c}
Viñedo 2	<i>pendiente de la recta</i>		Viñedo 2	<i>NTUs</i>	<i>NTUs</i>
2008	285.4 ± 8.3 ^a	405.5 ± 11.1 ^c	2008	14.0 ± 2.5 ^a	18.7 ± 0.9 ^c
2009	381.4 ± 12.1 ^b	534.3 ± 10.1 ^e	2009	19.0 ± 0.5 ^c	21.0 ± 1.7 ^c

5.4.4 Análisis HPLC-DAD-MS y espectrofotométrico

Se han identificado un total de 38 compuestos fenólicos en semillas de uva mediante HPLC-DAD-MS. Estos compuestos han sido agrupados teniendo en cuenta su grado de polimerización y de galoilación. En general, el contenido de procianidinas en semillas tiene un máximo en el momento de envero y después tiende a disminuir hasta su estabilización en momentos cercanos a la vendimia (63, 76-78, 103). En la **Tabla 5.3** se muestra el índice de polifenoles totales (IPT) medido a 280 nm y el contenido de polifenoles (mg/g de semilla) de los extractos de semillas maduras y verdes. En ambos casos, el mayor contenido alcanzado siempre corresponde con el momento de post-envero. Para un extracto de semillas dado, la adición de concentraciones crecientes del mismo provoca un incremento en la intensidad relativa de la luz dispersada y también una disminución en el espectro de emisión de fluorescencia. A pesar de esto, de manera general, un mayor contenido de polifenoles o un mayor IPT no implica una mayor afinidad de unión a proteínas (**Tablas 5.1, 5.2, 5.3**). Cabría por tanto pensar que el perfil cualitativo de cada extracto de semillas puede tener una alta implicación en su habilidad para unirse a proteínas.

Tabla 5.3. Índice de Polifenoles Totales (IPT) y contenido total de flavanoles de la semilla por HPLC (mg/g de semilla) en los puntos de post-envero y de madurez.

Abs. 280 nm	<i>IPT (Índice Polifenoles Totales)</i>		HPLC	<i>(mg/g de semilla)</i>	
	Viñedo 1	Viñedo 2		Viñedo 1	Viñedo 2
	Post-envero	Madurez		Post-envero	Madurez
2008	0.95 ± 0.03	0.77 ± 0.02	2008	62.1 ± 2.8	29.8 ± 1.0
2009	0.63 ± 0.01	0.53 ± 0.05	2009	34.1 ± 2.8	25.5 ± 4.9
	Post-envero	Madurez		Post-envero	Madurez
2008	0.94 ± 0.03	0.77 ± 0.02	2008	64.4 ± 1.3	30.7 ± 0.5
2009	0.73 ± 0.03	0.55 ± 0.05	2009	44.0 ± 0.9	29.4 ± 0.9

La **Figura 5.5** muestra el contenido de procianidinas de las semillas, en los dos estados de madurez estudiados. Se aprecia un mayor contenido de monómeros frente al resto de compuestos, lo que está en consonancia con los resultados obtenidos por otros autores (62, 63, 72, 75, 104). Los monómeros y los compuestos galoilados presentan las

mayores variaciones con la maduración, disminuyendo en el año 2008 hasta un 42% y un 48% respectivamente. Por el contrario, los dímeros, trímeros y tetrámeros apenas muestran variación.

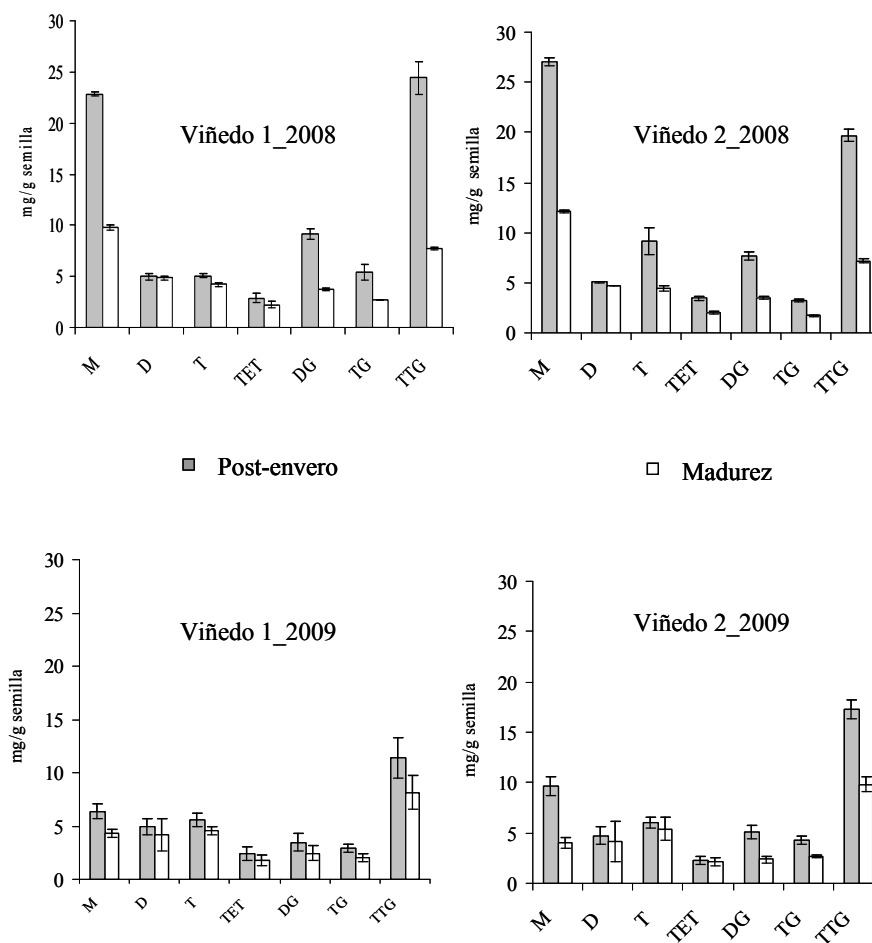


Figura 5.5. Cambios en los compuestos fenólicos de las semillas de bajo peso molecular con la maduración. M: monómeros; D: dímeros; T: trímeros; TET: tetrámeros; DG: dímeros galoilados; TG: trímeros galoilados; TTG: total galoilados.

Según bibliografía, el tamaño y la conformación estructural de los compuestos fenólicos y la presencia de grupos galoilados afecta a la afinidad para unirse a proteínas y al entorno de los residuos de triptófano (15, 42). Esta habilidad incrementa con el aumento del peso molecular (aumento de grupos catecol) (19, 29, 42, 105, 106), lo que estaría en consonancia con los resultados obtenidos en este estudio (**Figura 5.6**).

Durante la maduración se observa un descenso en el contenido de procianidinas de las semillas de uva. Sin embargo, como puede observarse, esta disminución no es homogénea, ocurriendo principalmente en monómeros y compuestos galoilados. Esta reducción de monómeros y compuestos galoilados provoca una mayor abundancia relativa de los compuestos de mayor peso molecular en el momento de maduración (**Figura 5.6**). Estos compuestos más polimerizados tendrían una mayor afinidad para complejar proteínas, lo que podría explicar la mayor reactividad que hemos encontrado cuando las semillas son más maduras incluso cuando su contenido en taninos es menor. Parece apuntarse, por tanto, que no es el descenso general en flavanoles el responsable de una mayor facilidad para formar agregados insolubles sino la proporción relativa en la que estos compuestos se encuentran, lo cual está condicionado por el estado de maduración.

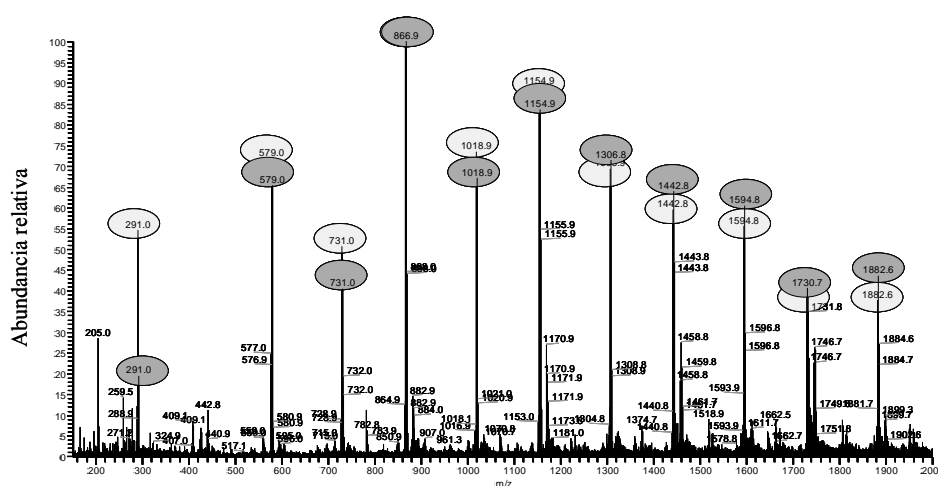


Figura 5.6. Representación del full masas de los extractos de semillas verdes (gris claro) y maduros (gris oscuro).

5.4.5 Análisis quimiométrico

Con la finalidad de observar las tendencias de las muestras se aplicó un análisis de componentes principales (PCA). En este caso la matriz de datos fue construida con las puntuaciones sensoriales de las semillas, con los datos cuantitativos de los compuestos fenólicos obtenidos a partir de HPLC, con los datos obtenidos mediante la medida de los extractos por espectrofotometría (280 nm), con los valores de la constante aparente de Sterm-Volmer (K_{app}) para ambas proteínas y con los valores de nefelometría (pendiente de la recta y NTUs).

En la **Figura 5.7**, correspondiente a los ensayos realizados en las dos clases de extractos (semillas verdes y maduras), se puede apreciar a lo largo del PC 1 una clara separación de las muestras verdes frente a las maduras. También se aprecia una mayor homogeneidad de las muestras maduras frente a las verdes ya que estas últimas están algo más dispersadas (PC 1).

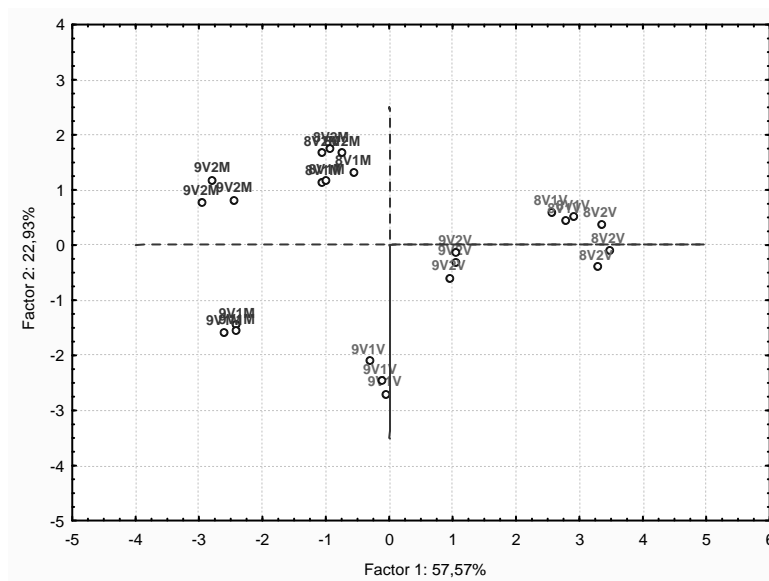


Figura 5.7. Puntuaciones del análisis de componentes principales de los extractos procedentes de semillas verdes (V- gris claro) y maduras (M- gris oscuro).

Atendiendo a los *loadings* del PCA, representados en la **Figura 5.8**, se observa un claro enfrentamiento entre el análisis sensorial de las semillas y las técnicas empleadas para valorar la interacción tanino-proteína. Asimismo, las puntuaciones de las muestras maduras estarían asociadas a valores altos de de fluorimetría y nefelometría y por tanto mayor afinidad por las proteínas. Por el contrario las puntuaciones de las muestras verdes estarían menos ligadas a estas técnicas y más unidas a fuertes sensaciones de astringencia e intensidad tánica. En la figura también se observa la proximidad de las variables IPT y HPLC, técnicas de determinación de flavanoles, que a su vez están opuestas a las variables nefelometría y fluorimetría. Este indica que un mayor contenido de compuestos fenólicos (tanto el obtenido por espectrofotometría o como por HPLC-DAD) no implica una mayor interacción con las proteínas α -amilasa y seroalbúmina.

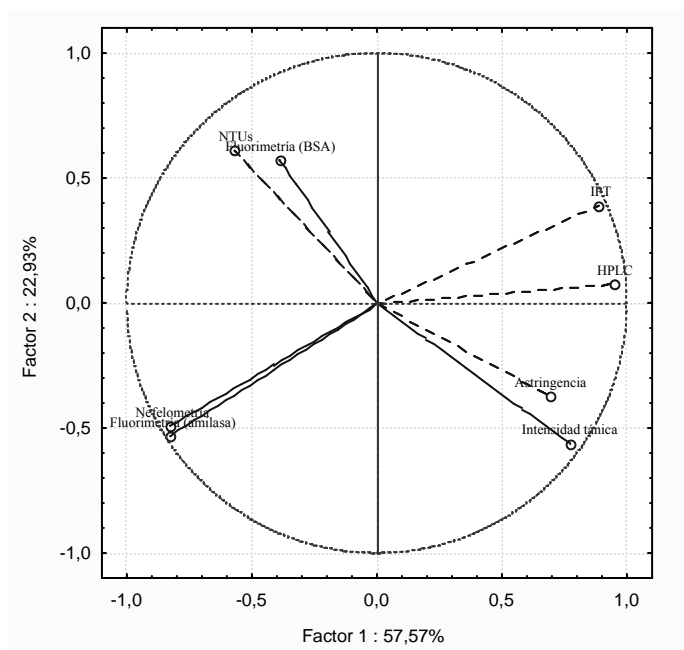


Figura 5.8. Loadings del análisis de componentes principales de los extractos procedentes de semillas verdes y maduras.

5.5) CONCLUSIONES

Los estudios llevados a cabo en este capítulo muestran que los extractos de semillas de uva tienen una alta capacidad para unirse a las proteínas α -amilasa y seroalbúmina. Asimismo, el grado de maduración de las semillas afecta a la afinidad de los compuestos fenólicos para unirse a las proteínas. Así, los extractos procedentes de semillas maduras presentan una mayor capacidad para formar agregados insolubles y producen una mayor disminución en la intensidad de fluorescencia de los residuos de triptófano que los extractos de semillas verdes. Esta tendencia está ligada a un descenso acusado de los flavanoles monómeros y de los compuestos galoilados. Este descenso, provoca una mayor abundancia relativa de los compuestos de mayor peso molecular en el momento de maduración. Según datos bibliográficos y en consonancia con los resultados obtenidos, los compuestos más polimerizados podrían tener una mayor capacidad para unirse a proteínas, lo que explicaría la mayor afinidad encontrada cuando las semillas son más maduras, incluso cuando su contenido en taninos es menor. Parece apuntarse, por tanto, que no es el descenso general de flavanoles, ocurrido a lo largo de la maduración, el responsable de una mayor facilidad para formar agregados insolubles sino la proporción relativa en la que estos compuestos se encuentran, lo cual está condicionado por el estado de maduración.

La mayor capacidad de formar complejos tanino-proteína insolubles y de disminuir la intensidad de fluorescencia de los extractos no se corresponde con una mayor sensación de astringencia. Cabe pensar, por tanto, que la sola precipitación de proteínas no es el único mecanismo para explicar esta compleja sensación oral.

BIBLIOGRAFÍA

1. Joslyn, M.A., J.L. Goldstein, and E.M.M.a.G.F.S. C.O. Chichester, *Astringency of Fruits and Fruit Products in Relation to Phenolic Content*, in *Advances in Food Research*. 1964, Academic Press. p. 179-217.
2. Valentová, H., et al., Time-intensity studies of astringent taste. *Food Chemistry*, **2002**. 78(1): p. 29-37.
3. Troxler, R.F., et al., Structural Relationship Between Human Salivary Histatins. *Journal of Dental Research*, **1990**. 69(1): p. 2-6.
4. Schipper, R.G., E. Silletti, and M.H. Vingerhoeds, Saliva as research material: Biochemical, physicochemical and practical aspects. *Archives of Oral Biology*, **2007**. 52(12): p. 1114-1135.
5. Haslam, E., *Practical Polyphenolics: From Structure to Molecular Recognition and Physiological Action*, ed. C.U. Press. 1998, Cambridge U.K: Cambridge University Press.
6. Soares, S.I., et al., Mechanistic Approach by Which Polysaccharides Inhibit α -Amylase/Procyanidin Aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**. 57(10): p. 4352-4358.
7. Bennick, A., Interaction of Plant Polyphenols with Salivary Proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, **2002**. 13(2): p. 184-196.
8. Lu, Y. and A. Bennick, Interaction of tannin with human salivary proline-rich proteins. *Archives of Oral Biology*, **1998**. 43(9): p. 717-728.
9. Di Egidio, V., et al., NIR and MIR spectroscopy as rapid methods to monitor red wine fermentation. *European Food Research and Technology*, **2010**. 230(6): p. 947-955.
10. Bacon, J.R. and M.J.C. Rhodes, Binding Affinity of Hydrolyzable Tannins to Parotid Saliva and to Proline-Rich Proteins Derived from It. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**. 48(3): p. 838-843.
11. Vidal, S., et al., The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2003**. 83(6): p. 564-573.
12. Canon, F., et al., Ability of a salivary intrinsically unstructured protein to bind different tannin targets revealed by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2010**. 398(2): p. 815-822.
13. Sun, B., et al., Evolution of Phenolic Composition of Red Wine during Vinification and Storage and Its Contribution to Wine Sensory Properties and Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2011**. 59(12): p. 6550-6557.
14. Lee, C.Y. and A.W. Jaworski, Identification of Some Phenolics in White Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1990**. 41(1): p. 87-89.

15. Mateus, N. and V. de Freitas, Evolution and Stability of Anthocyanin-Derived Pigments during Port Wine Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2001**. 49(11): p. 5217-5222.
16. Bacon, J.R. and M.J.C. Rhodes, Development of a Competition Assay for the Evaluation of the Binding of Human Parotid Salivary Proteins to Dietary Complex Phenols and Tannins Using a Peroxidase-Labeled Tannin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**. 46(12): p. 5083-5088.
17. Carvalho, E., et al., Influence of Wine Pectic Polysaccharides on the Interactions between Condensed Tannins and Salivary Proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(23): p. 8936-8944.
18. Peleg, H. and A.C. Noble, Effect of viscosity, temperature and pH on astringency in cranberry juice. *Food Quality and Preference*, **1999**. 10(4-5): p. 343-347.
19. Luck, G., et al., Polyphenols, astringency and proline-rich proteins. *Phytochemistry*, **1994**. 37(2): p. 357-371.
20. Fuster, A. and S. Escot, Élevage des vins rouges sur lies fines: choix de la levure fermentaire et ses conséquences sur les interactions polysaccharides/polyphénols. *Revue des Oenologues*, **2002**. 104: p. 20-22.
21. Preys, S., et al., Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*, **2006**. 563(1-2): p. 126-136.
22. Guinard, J.-X., et al., Relation Between Saliva Flow and Flavor Release From Chewing Gum. *Physiology & Behavior*, **1997**. 61(4): p. 591-596.
23. Monteleone, E., et al., Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*, **2004**. 15(7-8): p. 761-769.
24. Jackman, R.L. and J.L. Smith, *Anthocyanins and betalains*, in *Natural Food Colorants*, G.A.F. Hendry and H. J.D., Editors. 1996, Blackie Academic & Professional. p. 244-280.
25. Hartwig, P.A.M. and M.R. McDaniel, Flavor Characteristics of Lactic, Malic, Citric, and Acetic Acids at Various pH Levels. *Journal of Food Science*, **1995**. 60(2): p. 384-388.
26. Horne, J., J. Hayes, and H.T. Lawless, Turbidity as a Measure of Salivary Protein Reactions with Astringent Substances. *Chemical Senses*, **2002**. 27(6): p. 653-659.
27. Haslam, E., Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *Journal of Natural Products*, **1996**. 59(2): p. 205-215.
28. Jöbstl, E., et al., Molecular Model for Astringency Produced by Polyphenol/Protein Interactions. *Biomacromolecules*, **2004**. 5(3): p. 942-949.
29. Charlton, A.J., et al., Polyphenol/Peptide Binding and Precipitation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2002**. 50(6): p. 1593-1601.
30. Gawel, R., Red wine astringency: a review. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **1998**. 4(2): p. 74-95.

31. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **1976**. 72(1-2): p. 248-254.
32. McRae, J.M., R.J. Falconer, and J.A. Kennedy, Thermodynamics of Grape and Wine Tannin Interaction with Polyproline: Implications for Red Wine Astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**. 58(23): p. 12510-12518.
33. Frazier, R.A., et al., Probing Protein-Tannin Interactions by Isothermal Titration Microcalorimetry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(18): p. 5189-5195.
34. McManus, J.P., et al., The association of proteins with polyphenols. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, **1981**(7): p. 309b-311.
35. Dawra, R.K., H.P.S. Makkar, and B. Singh, Protein-binding capacity of microquantities of tannins. *Analytical Biochemistry*, **1988**. 170(1): p. 50-53.
36. Kallithraka, S., J. Bakker, and M.N. Clifford, Interaction of (+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin B2 and procyanidin C1 with pooled human saliva in vitro. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2001**. 81(2): p. 261-268.
37. Sáenz-Navajas, M.-P., et al., Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, **2010**. 673(2): p. 151-159.
38. Fickel, J., et al., A novel method to evaluate the relative tannin-binding capacities of salivary proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, **1999**. 122(2): p. 225-229.
39. Fia, G., et al., Prediction of grape polyphenol astringency by means of a fluorimetric microplate assay. *Food Chemistry*, **2009**. 113(1): p. 325-330.
40. Papadopoulou, A. and R.A. Frazier, Characterization of protein-polyphenol interactions. *Trends in Food Science & Technology*, **2004**. 15(3-4): p. 186-190.
41. Papadopoulou, A., R.J. Green, and R.A. Frazier, Interaction of Flavonoids with Bovine Serum Albumin: A Fluorescence Quenching Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2005**. 53(1): p. 158-163.
42. Soares, S.I., et al., Mechanistic Approach by Which Polysaccharides Inhibit α -Amylase/Procyanidin Aggregation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**. 57(10): p. 4352-4358.
43. Wu, L.-c. and Y.-w. Lu, Electrophoretic Method for the Identification of a Haze-Active Protein in Grape Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2004**. 52(10): p. 3130-3135.
44. Simon, C.c., et al., Three-Dimensional Structure and Dynamics of Wine Tannin Saliva Protein Complexes. A Multitechnique Approach. *Biochemistry*, **2003**. 42(35): p. 10385-10395.
45. De Freitas, V., E. Carvalho, and N. Mateus, Study of carbohydrate influence on protein-tannin aggregation by nephelometry. *Food Chemistry*, **2003**. 81(4): p. 503-509.

46. Canals, R., et al., 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(10): p. 4019-4025.
47. Ratnavathi, C.V. and R.B. Sashidhar, Microassay for the quantitation of protein precipitable polyphenols: use of bovine serum albumin-benzidine conjugate as a protein probe. *Food Chemistry*, **1998**. 61(3): p. 373-380.
48. Scampicchio, M., et al., Amperometric Electronic Tongue for the Evaluation of the Tea Astringency. *Electroanalysis*, **2006**. 18(17): p. 1643-1648.
49. Kallithraka, S., J. Bakker, and M.N. Clifford, Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *Journal of Sensory Studies*, **1998**. 13(1): p. 29-43.
50. Darias-Martín, J., D. Díaz-González, and C. Díaz-Romero, Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. *Journal of Food Engineering*, **2004**. 63(3): p. 335-340.
51. Darias-Martín, J., et al., Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chemistry*, **2000**. 71(4): p. 483-487.
52. Chira, K., et al., Grape Variety Effect on Proanthocyanidin Composition and Sensory Perception of Skin and Seed Tannin Extracts from Bordeaux Wine Grapes (Cabernet Sauvignon and Merlot) for Two Consecutive Vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**. 57(2): p. 545-553.
53. Hufnagel, J.C. and T. Hofmann, Orosensory-Directed Identification of Astringent Mouthfeel and Bitter-Tasting Compounds in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**. 56(4): p. 1376-1386.
54. Kobayashi, H., et al., Characterization of phenolic compounds biosynthesized in pink-colored skin of Japanese indigenous *Vitis vinifera* cv. Koshu grape. *Plant Biotechnology Reports*, **2011**. 5(1): p. 79-88.
55. Kallithraka, S., et al., Sensory assessment and chemical measurement of astringency of Greek wines: Correlations with analytical polyphenolic composition. *Food Chemistry*, **2011**. 126(4): p. 1953-1958.
56. Le Moigne, M., et al., Sensory and instrumental characterisation of Cabernet Franc grapes according to ripening stages and growing location. *Food Quality and Preference*, **2008**. 19(2): p. 220-231.
57. Rousseau, J., C. Pozzo di Borgo, and L. Duret, Análisis sensorial de la uva y caracterización de la madurez. *ACENOLOGÍA. Revista de enología científica y profesional*, **2005**. 60.
58. Rousseau, J. and D. Delteil, Présentation d'une méthode d'analyse sensorielle des raisins. Principe, méthode et grille d'interprétation. *Revue Française d'Oenologie*, **2000**. 183: p. 10-13.
59. Kennedy, J.A., et al., Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2000**. 6(3): p. 244-254.

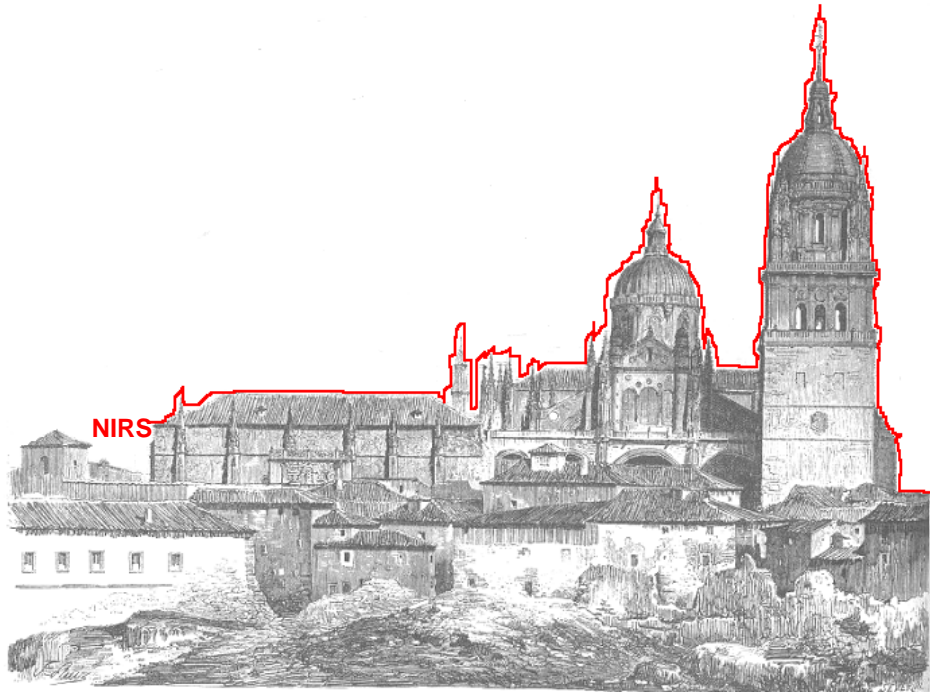
-
60. Cadot, Y., M.T. Minana-Castello, and M. Chevalier, Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during Fruit Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(24): p. 9206-9215.
 61. Andersen, O.M. and M. Jordheim, Flavanoids: chemistry, biochemistry and applications, ed. O.M. Andersen and K.R. Markham. 2006, Boca Ratón (Estados Unidos): CRC Press, Taylor and Francis Group.
 62. Ricardo Da Silva, J.M., et al., Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, **1991**. 30(4): p. 1259-1264.
 63. Kennedy, J.A., M.A. Matthews, and A.L. Waterhouse, Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, **2000**. 55(1): p. 77-85.
 64. Romeyer, F.M., J.-J. Macheix, and J.-C. Sapis, Changes and importance of oligomeric procyanidins during maturation of grape seeds. *Phytochemistry*, **1986**. 25(1): p. 219-221.
 65. Czochanska, Z., L.Y. Foo, and L.J. Porter, Compositional changes in lower molecular weight flavans during grape maturation. *Phytochemistry*, **1979**. 18(11): p. 1819-1822.
 66. Peleg, H., et al., Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1999**. 79(8): p. 1123-1128.
 67. Fernández-Zurbano, P., et al., Role of Hydroxycinnamic Acids and Flavanols in the Oxidation and Browning of White Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1998**. 46(12): p. 4937-4944.
 68. Belitz, H.D., W. Grosch, and P. Schieberle, Food chemistry. 4 ed, ed. Springer. 2009. 1166.
 69. Bourzeix, M., D. Weyland, and N. Heredia, Etude des catechines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres derives de la vigne. *Bulletin de l'OIV*, **1986**. 59: p. 1171-1254.
 70. Escribano-Bailón, M.T., et al., Proanthocyanidins in skins from different grape varieties. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*, **1995**. 200(3): p. 221-224.
 71. Jordao, A.M., J.M. Ricardo Da Silva, and O. Laureano, Evolution of Catechins and Oligomeric Procyanidins during Grape Maturation of Castelao Frances and Touriga Francesa. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2001**. 52(3): p. 230-234.
 72. Santos-Buelga, C., E.M. Francia-Aricha, and M.T. Escribano-Bailón, Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chemistry*, **1995**. 53(2): p. 197-201.
 73. Sun, B.S., et al., Transfer of Catechins and Proanthocyanidins From Solid Parts of the Grape Cluster Into Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**. 50(2): p. 179-184.
 74. Ricardo Da Silva, J.M., et al., Dimer and trimer procyanidins in Carignan and Mourvedre grapes and red wines. *Vitis* **1992**. 31: p. 55-63.
 75. Escribano-Bailón, T., et al., Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del Pais grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1992**. 40(10): p. 1794-1799.

76. De Freitas, V.A.P. and Y. Glories, 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(12): p. 1601-1606.
77. De Freitas, V.A.P., Y. Glories, and A. Monique, 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(4): p. 397-403.
78. Downey, M.O., J.S. Harvey, and S.P. Robinson, Analysis of tannins in seeds and skins of Shiraz grapes throughout berry development. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, **2003**. 9(1): p. 15-27.
79. Obreque Slier, E., *Caracterización fenólica de uvas del cultivar carménère y su relación con la sensación de astringencia*, in *Departamento de Bioquímica y biotecnología*. 2010, Universitat Rovira y Virgili: Tarragona.
80. Prigent, S.V.E., et al., Interactions between globular proteins and procyanidins of different degrees of polymerization. *Journal of Dairy Science*, **2009**. 92(12): p. 5843-5853.
81. Prinz, J.F. and P.W. Lucas, Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation*, **2000**. 27(11): p. 991-994.
82. Kallithraka, S., J. Bakker, and M. Clifford, Evidence that Salivary Proteins are involved in Astringency *Journal of Sensory Studies*, **1997**. 13(1): p. 29-43.
83. Kennedy, J.A., et al., Analysis of Tannins in Red Wine Using Multiple Methods: Correlation with Perceived Astringency. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2006**. 57(4): p. 481-485.
84. Obreque-Slier, E., A. Pena-Neira, and R. Lopez-Solis, Precipitation of low molecular weight phenolic compounds of grape seeds cv. Carmenera (*Vitis vinifera* L.) by whole saliva. *European Food Research and Technology*, **2011**. 232(1): p. 113-121.
85. Petrovic, S.C., Correlation of Perceived Wine Astringency to Cyclic Voltammetric Response. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2009**. 60(3): p. 373-378.
86. Buisson, G., et al., Three dimensional structure of porcine pancreatic α -amilase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *The EMBO Journal*, **1987**. 6: p. 3909-3916.
87. Pasero, L., et al., Complete amino acid sequence and location of the 5 disulphide bridges in porcine pancreas α -amilase. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1986**. 8869: p. 147-157.
88. Rawel, H.M., et al., Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Molecular Nutrition & Food Research*, **2006**. 50(8): p. 705-713.
89. Hofmann, T., et al., Protein Binding and Astringent Taste of a Polymeric Procyanidin, 1,2,3,4,6-Penta-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose, Castalagin, and Grandinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(25): p. 9503-9509.

-
90. Mateus, N., et al., Influence of the addition of grape seed procyanidins to Port wines in the resulting reactivity with human salivary proteins. *Food Chemistry*, **2004**. 84(2): p. 195-200.
 91. Jackson, R.S., *Taste and Mouth-Feel Sensations*, in *Wine Tasting (Second Edition)*. 2009, Academic Press: San Diego. p. 129-175.
 92. Obreque-Slier, E., et al., Tannin–protein interaction is more closely associated with astringency than tannin–protein precipitation: experience with two oenological tannins and a gelatin. *International Journal of Food Science & Technology*, **2010**. 45(12): p. 2629-2636.
 93. Schwarz, B. and T. Hofmann, Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology*, **2008**. 227(6): p. 1693-1698.
 94. Kallithraka, S., J. Bakker, and M. Clifford, Evaluation of Bitterness and Astringency of (+)-Catechin and (-)-Epicatechin in Red Wine and in Model Solution. *Journal of Sensory Studies*, **1997**. 12(1): p. 25-37.
 95. Payne, C., et al., Interaction of astringent grape seed procyanidins with oral epithelial cells. *Food Chemistry*, **2009**. 115(2): p. 551-557.
 96. Green, B.G., Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychologica*, **1993**. 84(1): p. 119-125.
 97. Nayak, A. and G.H. Carpenter, A physiological model of tea-induced astringency. *Physiology & Behavior*, **2008**. 95(3): p. 290-294.
 98. Tachibana, H., et al., A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Structural & Molecular Biology*, **2004**. 11(4): p. 380-381.
 99. Hakkinen, L., V.-J. Uitto, and H. Larjava, Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology 2000*, **2000**. 24: p. 127-152.
 100. Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, ed. n. ed. 1999, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 237-255.
 101. Prendergast, F.G., J. Lu, and P.J. Callahan, Oxygen quenching of sensitized terbium luminescence in complexes of terbium with small organic ligands and proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **1983**. 258(7): p. 4075-4078.
 102. Lima, S.A.C., et al., Sensitivity of P-glycoprotein tryptophan residues to benzodiazepines and ATP interaction. *Biophysical Chemistry*, **2007**. 125(1): p. 143-150.
 103. Ferrer-Gallego, R., et al., Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Analytica Chimica Acta*, **2010**. 660(1-2): p. 22-28.
 104. De Freitas, V.A.P., et al., Characterisation of oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds by liquid secondary ion mass spectrometry. *Phytochemistry*, **1998**. 49(5): p. 1435-1441.

105. Porter, L.J. and J. Woodruffe, Haemalysis: The relative astringency of proanthocyanidin polymers. *Phytochemistry*, **1984**. 23(6): p. 1255-1256.
106. Saito, N., et al., Acylated pelargonidin 3,7-glycosides from red flowers of *Delphinium hybridum*. *Phytochemistry*, **1998**. 49(3): p. 881-886.

BLOQUE III



III.1 OBJETIVOS GENERALES

En esta sección, dedicada a la espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS), se pretende obtener métodos rápidos para la determinación de compuestos fenólicos de uva tinta. Para ello se ha aplicado dicha tecnología con diferentes modalidades de medida junto con diversas herramientas quimiométricas. Se ha evaluado su viabilidad con fines cuantitativos y cualitativos tal y como se recoge en los siguientes capítulos.

Para una mejor comprensión de esta técnica y de las herramientas quimiométricas utilizadas se ha considerado oportuno incluir previamente dos apartados, uno dedicado a los fundamentos de la espectroscopía NIR y otro dedicado a las técnicas quimiométricas empleadas.

III.2 INTRODUCCIÓN

Aunque las primeras medidas realizadas en el infrarrojo cercano (NIR) datan de comienzos del siglo XIX (1), los primeros trabajos publicados con contenido analítico vieron la luz hacia 1960 (2). Sin embargo, no ha sido hasta hace un par de décadas, debido al desarrollo instrumental y de las técnicas quimiométricas para el tratamiento de datos (3-5), cuando su uso se ha extendido más ampliamente. Actualmente es un método rutinario en controles de calidad de diversos productos (6). La espectroscopía de infrarrojo se ha utilizado en diversas matrices en el campo de la alimentación. Se ha demostrado que es una herramienta con gran potencial en la determinación de compuestos fenólicos y otros compuestos bioactivos presentes en productos alimenticios (7). La determinación de procianidinas en cacao (8), de polifenoles totales en té verde (FT-NIR) (9) y la evaluación de la composición fenólica de aceitunas durante la maduración (ATR-FTIR) (10) son algunos ejemplos del uso de esta tecnología con esta finalidad.

En el campo de la enología, en cuestión de pocos años, su uso ha crecido considerablemente. Ha sido utilizada en vino para la determinación de malvidina, taninos y pigmentos poliméricos (11, 12), minerales (13), ácidos orgánicos (14), polisacáridos (15), azúcares reductores (16) y aromas (17). En mostos y pastas (homogeneizados de uva) se ha utilizado para la determinación de ácido glucónico,

glicerol, sólidos solubles, pH, taninos condensados, antocianos y materia seca. (13, 18, 19). Algunos estudios han sido realizados directamente en uvas para determinar el total de antocianos (20, 21). También se ha usado en uvas enteras para determinar la concentración de antocianos extraíbles a pH 1.0 y 3.2, la concentración de polifenoles totales, el contenido en azúcar y la densidad (22). Asimismo, se ha usado en extractos de semillas para predecir mediante FT-IR el grado medio de polimerización (23).

Por otro lado, la espectroscopía de infrarrojo también ha sido utilizada con fines cualitativos dentro del campo de la enología. Se ha aplicado para la identificación de variedades de uva (24), la discriminación entre vinos ecológicos y no ecológicos (25), la detección de problemas durante la fermentación (26), la autenticación de algunos vinos (27) así como la clasificación según la maduración y la localización geográfica (28-31).

Según nuestro conocimiento, es la primera vez que se utiliza tecnología NIRS para la determinación pormenorizada de los compuestos fenólicos de las semillas de uva. Tampoco había sido utilizada antes para determinar simultáneamente las principales familias de compuestos fenólicos por separado (flavanoles, antocianos, flavonoles y ácidos fenólicos) en uvas intactas y en hollejos. La mayoría de estudios que se encuentran en la bibliografía, han sido realizados en vino, mostos, homogeneizados de uva o extractos. Sin embargo, en el trabajo que se presenta a continuación los espectros NIR fueron registrados directamente en uvas, semillas y hollejos para intentar minimizar el pretratamiento de las muestras y proporcionar medidas más rápidas.

III.3 ESPECTROSCOPIA NIR

III.3.1 Fundamentos

La zona NIR es la región del espectro electromagnético comprendido entre 700 y 2500 nm. En la **Figura III.1** se muestra su situación dentro del espectro electromagnético. Cuando se utiliza una cubeta (*Transport quart cup*) para el registro de espectros, la zona de trabajo es (1100 a 2498 nm); pero cuando el registro se realiza con sonda de fibra óptica, la zona es (1100 a 2000 nm) como se explica más adelante.

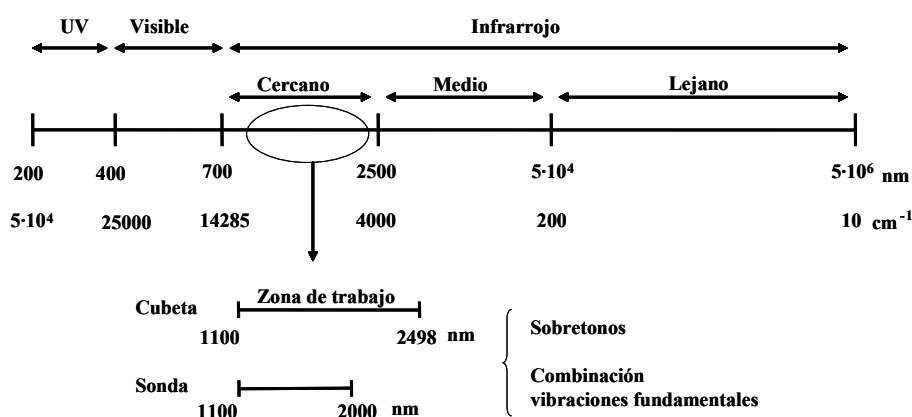


Figura III.1. Situación de la zona NIR y zona de trabajo de la cubeta en el espectro electromagnético.

La región IR del espectro electromagnético se extiende desde 10 cm^{-1} a 14285 cm^{-1} , se divide esta zona instrumental y funcionalmente en cercano, medio y lejano. La radiación electromagnética está formada por ondas que se propagan por el espacio a gran velocidad y está constituida por campos eléctricos y magnéticos perpendiculares entre sí. Cuando una radiación monocromática incide sobre una muestra, la interacción entre la radiación electromagnética y la muestra puede ser muy diversa (absorción, transmisión y reflexión). En la región NIR es de interés la espectroscopía de absorbancia/transmisión, reflectancia y transflectancia. Para la realización de este

trabajo se utiliza la radiación reflejada; por tanto nos referiremos a la espectroscopía de reflectancia.

III.3.2 Espectroscopía de reflectancia

Este tipo de espectroscopía estudia la luz reflejada por la superficie de la muestra y puede ser de dos tipos: *especular y difusa*. Las medidas de reflectancia en condiciones normales contienen ambas componentes; la componente especular posee una escasa información sobre la composición y por tanto las medidas se realizan intentando minimizar el efecto de esta componente, mientras que la componente difusa es la base de las medidas cuantitativas en NIR.

Reflectancia especular: predomina cuando el material sobre el que se produce la reflexión tiene altos valores de los coeficientes de absorción a la longitud de onda de la radiación incidente, cuando la penetración es muy pequeña en comparación con la longitud de onda y cuando las dimensiones de la superficie reflectante son mucho mayores que la longitud de onda.

La primera consecuencia de esto es que aunque la reflexión en cada superficie obedece a las leyes de Fresnel (32), el efecto del grosor difumina el componente especular de la reflectancia. Para la mayoría de los materiales, excepto metales, alrededor del 4% de la radiación incidente sufre reflectancia especular y este nivel de fondo se superpone sobre la reflectancia difusa a efectos internos.

Reflectancia difusa: es la base de las medidas cuantitativas que se realizan en la espectroscopía NIR y tiene lugar en todas las direcciones de la superficie como consecuencia de los procesos de absorción, dispersión (*scattering*), que además varían con la forma, tamaño, grado de compactación, etc., de la muestra. Este tipo de reflectancia predomina cuando los materiales de la superficie reflectante son débilmente absorbentes a la longitud de onda incidente y cuando la penetración de la radiación es grande en relación con la longitud de onda, como se puede observar en la **Figura III.2**.

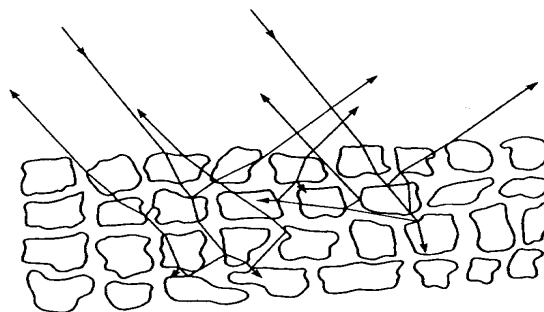


Figura III. 2. Representación del efecto de reflectancia difusa.

La teoría propuesta por Kubelka-Munk (33) explica la reflectancia difusa y tiene en cuenta una capa infinitamente gruesa de una muestra opaca, cuando la absorción es débil e ignora los efectos de la dispersión anómala. La reflectancia de una delgada capa homogénea viene dada por:

$$\frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{s} = f(R_{\infty})$$

donde, R_{∞} es la reflectancia absoluta de la muestra. Esta reflectancia absoluta se define como la fracción de radiación incidente que es reflejada, K es el coeficiente de absorción de la muestra, y s es el coeficiente de dispersión. La reflectancia, por tanto, es función únicamente de la relación de dos constantes, K y s y no de sus valores absolutos.

En el análisis cuantitativo la ecuación de Kubelka-Munk puede escribirse en función de la concentración del analito absorbente, siendo ϵ la absorptividad.

$$f(R_{\infty}) = \frac{(1 - R_{\infty})^2}{2R_{\infty}} = \frac{K}{s} = \frac{\ln 10 \cdot \epsilon \cdot c}{s}$$

Esta ecuación requiere medir la reflectancia absoluta R_{∞} , y en la práctica se mide la reflectancia relativa R , que es la relación entre la intensidad de luz reflejada por la muestra y la de un estándar, como sulfato de bario u óxido de magnesio finamente pulverizado.

$$\frac{R_{muestra}}{R_{estandar}} = R$$

Teniendo en cuenta esta consideración la ecuación de Kubelka-Munk puede escribirse de la siguiente manera:

$$f(R) = \frac{(1-R)^2}{2R} = \frac{c}{a}$$

donde a queda definida como:

$$a = \frac{s}{2.033\varepsilon}$$

Gráficamente la relación entre $f(R)$ y c , es lineal y con pendiente $1/a$. En el caso de que la matriz tenga una absorción débil y regular o el analito correspondiente tenga bandas de absorción intensas, la relación deja de ser lineal.

Se acepta que la ecuación de Kubelka-Munk, como la ley de Beer, es una ecuación que sólo se puede aplicar a bandas débilmente absorbentes, caso de NIR, pero como no puede aislarse la absorción del analito de la matriz, que frecuentemente absorbe fuertemente a la misma longitud de onda que el analito, se producen desviaciones de la ecuación de Kubelka-Munk. Por ello en la práctica se aplica una relación alternativa y análoga a la ley de Beer, donde, R es la reflectancia relativa, a' es una constante y A es la absorbancia aparente.

$$A = \log \frac{1}{R} = a'c$$

A pesar de que esta relación no tiene las bases teóricas de la ecuación de Kubelka-Munk, proporciona resultados muy satisfactorios en las condiciones utilizadas en muchas aplicaciones prácticas de la espectrofotometría de reflectancia difusa.

III.3.3 Interpretación de espectros en la región NIR

Para que se produzca absorción de la radiación infrarroja por la materia, la energía del fotón incidente debe tener la energía precisa para satisfacer los requerimientos energéticos de la sustancia material, ya que los niveles energéticos se encuentran cuantizados. Además debe producirse un acoplamiento entre la radiación y la materia; para ello, la molécula debe experimentar un cambio neto en el momento dipolar. Por ello, especies monoatómicas y homonucleares, como por ejemplo He, Ne, O₂, N₂, Cl₂, no absorben en el infrarrojo. Por otra parte, en los sólidos y en los líquidos, la rotación está muy restringida, por lo que en este tipo de muestras sólo tienen interés transiciones vibracionales. Al producirse un tránsito energético se dará la siguiente variación de energía:

$$\Delta E = h \nu$$

La frecuencia de vibración (ν) viene dada por la siguiente expresión:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

siendo k una constante de proporcionalidad que depende de las características de los enlaces químicos y μ la masa reducida de los átomos implicados en un determinado enlace, de masas m_1 y m_2 , definida como:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}$$

Según la mecánica cuántica los osciladores no pueden tener cualquier valor de energía potencial, sino los permitidos por la relación:

$$E = \left(\nu + \frac{1}{2} \right) \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

siendo h la constante de Plank y ν el número cuántico vibracional que puede tomar los valores: 0, 1, 2, 3,.....

Para cualquier pareja de valores adyacentes, y puesto que v solo puede tomar valores enteros, tendremos que: para $v = 0$; $E_0 = (1/2) h\nu$ y para $v = 1$; $E_1 = (3/2) h\nu$, podemos escribir la diferencia energética entre estos niveles como:

$$\Delta E = h\nu = \frac{h}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}}$$

Según las reglas de selección, las únicas transiciones que pueden tener lugar son aquellas en el que el número cuántico vibracional cambie en una unidad, $\Delta v = \pm 1$. Por ello, dado que los niveles vibracionales están igualmente espaciados, para una vibración molecular determinada sólo tendría que observarse un pico de absorción.

Sin embargo, los enlaces reales, aunque elásticos, no se comportan exactamente como un oscilador armónico. Al aproximarse dos átomos, la repulsión coulombiana entre los núcleos produce una fuerza que actúa en la misma dirección que la fuerza restauradora del enlace, por lo que la energía potencial se eleva rápidamente. Por otra parte, cuando los átomos están muy alejados se produce una disminución de la fuerza restauradora y de energía potencial, originándose la disociación.

Por todo ello se toma el modelo del oscilador anarmónico, cuya energía viene dada por la siguiente expresión:

$$E = (v + 0.5) h\nu - (v + 0.5)^2 h\nu x - (v + 0.5)^3 h\nu x' - \dots$$

donde x y x' ...son constantes de anarmonicidad, que tienen valores pequeños positivos y de magnitud decreciente. Al aumentar v , ΔE se hace más pequeño. Además, otra consecuencia de la anarmonicidad es que la regla de selección cambia, observándose transiciones de $\Delta v = \pm 2, \pm 3, \dots$ etc, lo que contribuye a los denominados sobretonos; además de la ya existente, $\Delta v = \pm 1$ correspondiente a la transición fundamental (**Figura III.3**).

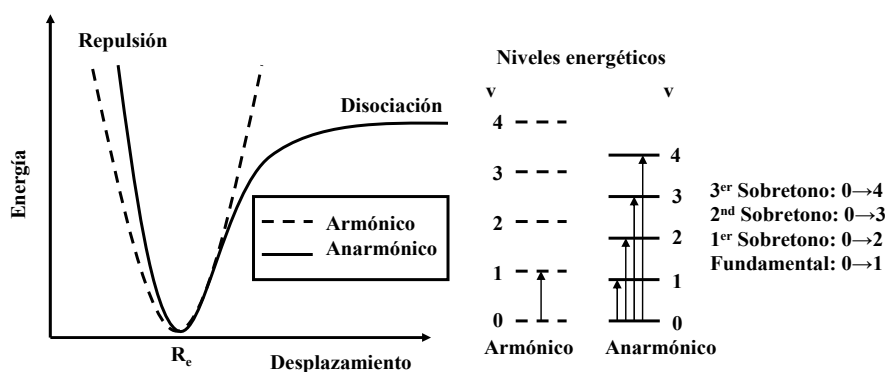


Figura III.3. Diagrama de energía potencial y niveles energéticos.
Oscilador armónico y anarmónico.

Las frecuencias de los sobretonos ocurren en la zona comprendida entre 4000 y 14285 cm^{-1} . Además de los sobretonos, son posibles bandas de combinación y diferencia, si dos o más vibraciones diferentes interactúan para originar bandas con frecuencias que son sumas o diferencias de las fundamentales.

$$\nu_{\text{comb}} = n_1\nu_1 + n_2\nu_2 + \dots, \text{ siendo } n_1, n_2 \dots \text{ números enteros.}$$

Los enlaces en los que están implicados los átomos de hidrógeno vibran con una gran amplitud cuando sufren tensión y por lo tanto, esto provoca una desviación apreciable de la armonicidad. En consecuencia, casi todas las bandas de absorción observadas en el NIR proceden de sobretonos y bandas de combinación de vibraciones fundamentales que se producen en el MIR (infrarrojo medio), donde están implicados grupos H-átomo, o combinaciones de vibraciones de tensión o flexión de tales grupos. Para el estudio de los espectros IR de muestras sólidas o líquidas sólo es necesario considerar los movimientos vibracionales debido a que la energía requerida para causar un cambio en estados rotacionales es mucho menor que para estados vibracionales y las bandas de absorción rotacional sólo son observables para el caso de los gases.

Las transiciones entre niveles energéticos vibracionales que originan bandas en el NIR, como en el MIR, deben de originar un cambio en el momento dipolar. Las intensidades de los sobretonos y de las bandas de combinación en el NIR, crecen con la magnitud del cambio de momento dipolar y con el grado de anarmonicidad en el enlace;

así, las vibraciones que implican átomos de hidrógeno son mas intensas que las de otros átomos; la baja masa y las elevadas constantes de fuerza para enlaces en los que está implicado el hidrógeno son las responsables de que las vibraciones fundamentales de hidrógeno aparezcan a altas frecuencias y en consecuencia los primeros sobretonos aparezcan en la región NIR. Las transiciones en las diferentes regiones del IR se muestran en la **Tabla III.1**. Un espectro típico correspondiente a la región NIR, es como el representado en la **Figura III.4**.

Tabla III.1. Regiones características del Infrarrojo.

Región	Transiciones	Longitud de onda (nm)	Nº de ondas (cm ⁻¹)
<i>NIR</i>	Sobretonos y Combinación	700-2500	14285-4000
<i>IR</i>	Vibraciones Fundamentales	2500-5·10 ⁴	4000-200
<i>FIR</i>	Rotaciones	5·10 ⁴ -10 ⁶	200-10

Se observa que las bandas de combinación presentan intensidades más elevadas que los sobretonos y que las intensidades de las bandas de los sobretonos disminuyen cuando crece el número de tono en un factor de aproximadamente 10.

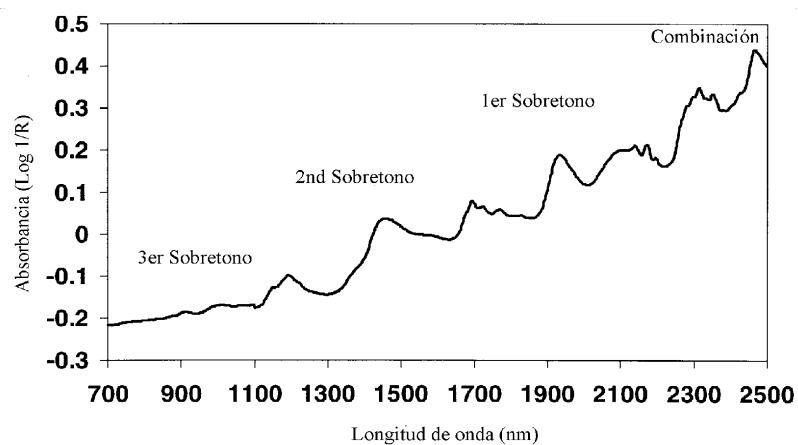


Figura III.4. Espectro NIR.

Los grupos funcionales más importantes que presentan absorciones en esta zona del espectro son:

- Las bandas de alargamiento de los grupos O-H, N-H, S-H, y P-H, tienen absorciones fuertes en el NIR, mientras que las bandas de los grupos C=O, C-C, C-F, y C-Cl están generalmente ausentes.
- La extensión de grupos R-H o tensión/flexión de estos mismos grupos, forma la mayoría de las bandas NIR.

Las bandas de NIR son muy anchas, con lo que los espectros se encontrarán muy solapados, por lo general no se suele utilizar la correlación de las longitudes de onda con el espectro de la molécula en cuestión. Las principales asignaciones químicas de estas bandas se muestran en la **Figura III.5**.

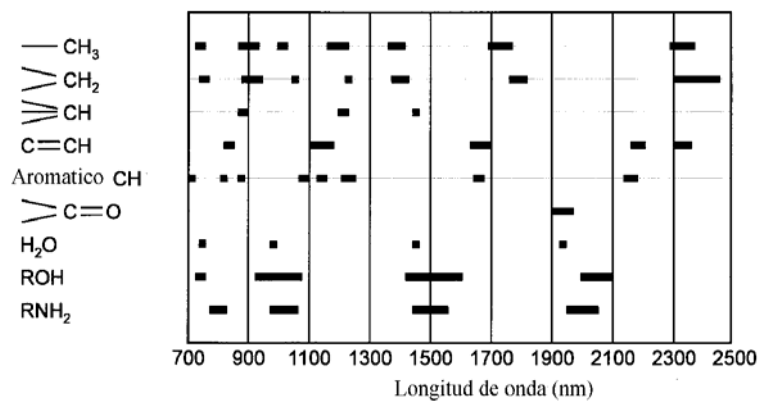


Figura III.5. Asignaciones químicas de las bandas NIR.

En el análisis de cualquier sustancia, y en especial de los alimentos frescos, hay que tener en cuenta las absorciones que produce la molécula de agua, ya que pueden interferir en la señal y por tanto, en la cuantificación del producto. Las longitudes de onda en las que el agua absorbe se conocen con gran exactitud y son las que se muestran en la **Tabla III.2** y en la **Figura III.6**.

Tabla III.2. Características de absorción NIR del agua.

λ (nm)	Absorción Molar	Banda
760	$4.69 \cdot 10^{-4}$	3 ^{er} Sobretono
970	$8.31 \cdot 10^{-3}$	2 ^o Sobretono
1190	$1.90 \cdot 10^{-2}$	Combinación
1450	0.469	1 ^{er} Sobretono
1940	2.06	Combinación

Se observa que las bandas a $\lambda = 1940$ nm y $\lambda = 1450$ nm presentan unas absorciones molares elevadas en la zona NIR, lo que indica que el agua es un mal disolvente para estudios en NIR, ya que estas bandas puede causar saturación en los detectores e interferir de forma considerable al poder enmascarar fuertemente las

absorciones debidas a otros analitos. Por otra parte, cuando el agua forma parte de la matriz, la modificación de estas bandas da oportunidad de medida a analitos que cambian la posición y la forma de las mismas, como pH y metales al poder formar acuocomplejos con la misma (34).

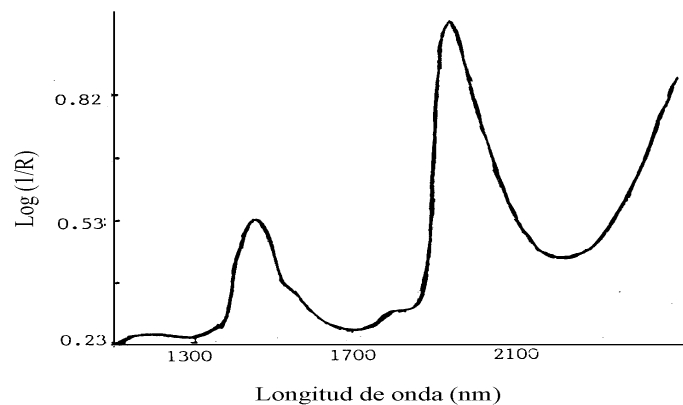


Figura III.6. Espectro NIR del agua.

III.3.4 Instrumentación

Los componentes básicos de un equipo NIRS son el sistema óptico y el módulo de muestra así como el software necesario para el procesado de los resultados y su posterior tratamiento. Dentro de las diferentes modalidades de medida, como pueden ser la reflectancia, transmitancia, transflectancia, nos centraremos en la reflectancia. En la **Figura III.7** se muestra un esquema del sistema en el que se pueden distinguir los componentes que lo integran:

Fuente de radiación: se trata de una fuente térmica, es dependiente de la temperatura, ya que la radiación se produce por el calentamiento de un filamento. Se emplea una lámpara de wolframio-halógeno de alta temperatura, el filamento de wolframio se encuentra en una célula de cuarzo que soporta altas temperaturas, la atmósfera de gas halógeno favorece que el wolframio vaporizado regrese al filamento alargando así la vida útil de la lámpara. Esta fuente, de elevada intensidad de emisión, proporciona una radiación continua en la zona NIR (35, 36).

Redes holográficas: la radiación generada en la lámpara se dirige mediante un espejo a una red holográfica cóncava que dispersa la luz blanca incoherente en longitudes de onda individuales transformándola en luz coherente. Es decir, tiene la misma frecuencia, amplitud y fase o una diferencia constante de esta; al mover esta red se cambia el ángulo de posición respecto al haz incidente recorriendo de esta manera todo el espectro NIR. Este tipo de sistema de selección de longitud de onda se encuadra dentro de los sistemas dispersivos (35, 36).

Filtros: la red holográfica proporciona un espectro disperso en que junto a las líneas de primer orden (las más intensas), aparecen líneas de órdenes superiores, estas deben eliminarse mediante filtros, los cuales están montados en un soporte cuyas posiciones están controladas por un motor y a la vez, perfectamente sincronizado con la red holográfica (37).

Referencia de longitudes de onda: la calibración de longitudes de onda se realiza respecto a un estándar interno, se utiliza el poliestireno, observándose picos a las siguientes longitudes de onda: $\lambda=1143.63$ nm, $\lambda=1680.90$ nm, $\lambda=2166.72$ nm, $\lambda=2306.10$ nm. En el caso de utilizar la sonda de fibra óptica para la zona de 1100-2000 nm, el pico $\lambda=2306.10$ nm no se utiliza, debido a la atenuación de la fibra óptica (37).

Detector de reflectancia: recibe la radiación de dispersión difusa de la superficie de la muestra. Los elementos del detector están colocados a 45° de la superficie de la muestra para intentar minimizar la reflectancia especular. Un detector típico de reflectancia consta de 4 detectores de PbS para la zona de 1100-2500 nm. El PbS es un material fotoeléctrico y semiconductor que a temperatura ambiente presenta una sensibilidad adecuada en esta región (35, 37).

Transport quartz cup: es una cubeta rectangular con una superficie de ventana de cuarzo de 4.7 cm x 5.7 cm, con un paso óptico de 1.7 cm. El uso de este tipo de cubeta permite registrar un rango espectral desde 1100-2498 nm.

Sonda de fibra óptica: se trata de una sonda de tipo Bundle (haz) regular 210/210, para la aplicación directa sobre las muestras; la sonda tiene una ventana de cuarzo de 5 cm x 5 cm. Consta de un detector de reflectancia que ha sido mencionado anteriormente y usa como referencia una placa cerámica. La sonda se une al equipo mediante una conexión de 1.5 metros de fibra óptica, como se muestra en la **Figura III.7**. El uso de

este tipo de sondas limita el rango espectral en el que se pueden realizar las medidas, en este caso la zona óptima se encuentra en 1100-2000 nm, ya que por encima 2000 nm se producen importantes atenuaciones de la señal debido principalmente a la fuerte absorción de grupos –OH que pueden estar presente en la fibra óptica (36, 37).

Software: el software utilizado por el NIRSystem 5000 es el programa WinISI® versión 1.50 (38). Este programa se utiliza en la adquisición de datos y en el tratamiento de los mismos.

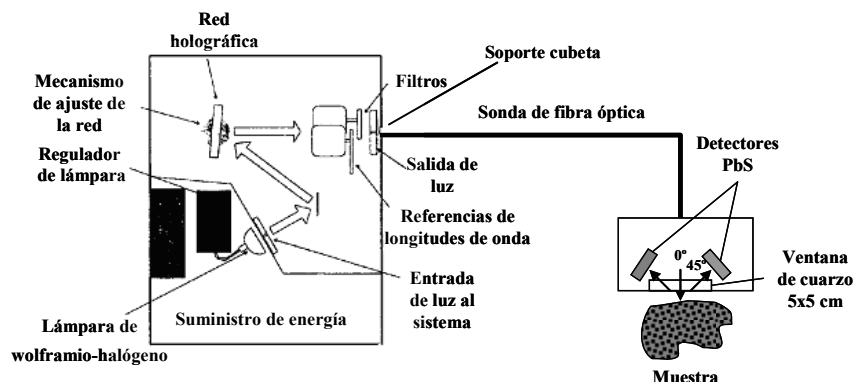


Figura III.7. Esquema de un equipo NIRS con sonda de fibra óptica.

III.3.5 Estandarización del equipo NIRS

Previamente al registro de las muestras, el equipo NIR debe ser estandarizado (37).

Test de diagnóstico: su objeto es evaluar la respuesta del instrumento, la precisión de la longitud de onda y el ruido.

- *Respuesta del instrumento:* el test se basa en una medida de reflectancia absoluta de un plato de cerámica, conocido como cerámica Coors y que es aproximadamente el 80% reflectiva, un test de lámpara y comprobación de la actuación de los detectores.
- *Precisión de la longitud de onda:* se basa en la medida de alineación de la longitud de onda del instrumento usando como referencia poliestireno, a

$\lambda=1143.63$ nm, $\lambda=1680.90$ nm y $\lambda=2166.72$ nm, en el caso de la sonda y una longitud de onda adicional ($\lambda=2306.10$ nm) en el caso de la cubeta (*transport quartz cup*), alineando el instrumento.

- *Ruido*: da una medida de la precisión del dato óptico a cada longitud de onda. Para obtener el test de ruido, se realizan 32 barridos de la cerámica constituyendo así el espectro de referencia. Otros 32 barridos constituyen el espectro de muestra. El valor de $\text{Log } I/R$ se calcula, restándose una de otro. La diferencia obtenida será el espectro de ruido. El espectro del ruido se utiliza para diagnosticar otras perturbaciones como: fallos en la lámpara, excesiva temperatura ambiente, variaciones en la humedad ambiente y problemas instrumentales mecánicos. El ruido fotométrico es medido por escaneado del material de referencia dos veces, primero como referencia y después como muestra. El test se repite 20 veces consecutivas y el resultado se da como media.

Una vez pasados los test se puede comenzar los registros de las diferentes muestras.

III.3.6 Ventajas e inconvenientes de la espectroscopía NIR

La espectroscopía NIR posee ciertas ventajas e inconvenientes que se muestran a continuación (35).

Ventajas:

- Se trata de una técnica analítica no destructiva.
- Rapidez de análisis, ya que se requiere escasa o nula preparación de la muestra, además no se generan subproductos y no es necesario utilizar disolventes contaminantes. La utilización de sondas de fibra óptica aumenta aún más la velocidad de medida.
- La muestra puede estar tanto en forma sólida como líquida o pastosa lo que incrementa las posibilidades de aplicación.
- Es multiparamétrica, es decir, permite la determinación de varios parámetros simultáneamente.

- Proporciona información sobre la naturaleza física y química de la muestra. Además puede determinar parámetros globales que no están relacionados con un único componente.
- En muchos casos, la exactitud de esta técnica es comparable a otras técnicas analíticas, y su precisión, en numerosas ocasiones, es mayor que en otras técnicas ya que no existe tratamiento de muestra.
- El coste de análisis por muestra es bajo, debido en gran parte a la poca necesidad de tratamiento de muestra, a la velocidad de medida y a la facilidad de uso en rutina.

Inconvenientes:

- Las bandas son muy anchas y se superponen, y normalmente no es posible la identificación por observación visual del espectro por falta de selectividad en la medida, esto se puede complicar aún más en el caso de los componentes minoritarios por la falta de sensibilidad.
- La señal obtenida es tan compleja que las bandas del espectro son de difícil interpretación, por lo que se hace necesario el uso de la quimiometría junto con diferentes pretratamientos espectrales.
- El desarrollo de los modelos para una posterior utilización sobre muestras desconocidas es lento, ya que se debe elaborar un grupo de calibración robusto, y obtener un valor de referencia mediante el empleo de métodos analíticos de referencia. En estos grupos de calibración se debe de recoger tanto la variabilidad física como la química que se pudiese dar en las muestras.
- Dificultad en la transferencia de calibraciones entre diferentes instrumentos.
- El coste de un equipo NIR es elevado, su puesta a punto es laboriosa y requiere de una inversión inicial considerable.

III.4 QUIMIOMETRÍA

La quimiometría es una disciplina que utiliza las matemáticas, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar los procedimientos óptimos de experimentación, proporcionar la máxima información analizando los datos y sistemas químicos (39).

En este sentido, este apartado resalta los aspectos de interés en el análisis cualitativo y cuantitativo empleado en esta memoria.

En la espectroscopía NIR se obtiene una señal de conjunto que contiene toda la información física y química de la muestra y para obtener la respuesta buscada es necesaria la aplicación de diversas técnicas quimiométricas que sean capaces de extraer dicha información.

Atendiendo al tipo de información que se necesita obtener, respuesta categórica o de escala, se dividen en métodos cualitativos o cuantitativos.

Los cualitativos, métodos de reconocimiento de pautas, se pueden dividir en métodos supervisados o no supervisados, dependiendo de si se conoce o no *a priori*, si el objeto pertenece a un clase determinada. Los métodos no supervisados buscan agrupamientos en un espacio n-dimensional sin conocer las clases a las que pertenece el objeto; sin embargo en los supervisados se tiene un conocimiento previo de la clases y se decide a cual de ellas pertenece un determinado objeto (40, 41).

En el caso de los métodos cuantitativos, podemos hacer una primera división entre métodos univariantes o multivariantes. En espectroscopía NIR se utilizan los métodos multivariantes debido al gran número de variables de las que se dispone. Dentro de estos métodos multivariantes se distinguen entre modelos lineales y no lineales dependiendo de la función matemática. Los modelos lineales han sido los más empleados. Si se opera con las variables originales se utiliza la regresión lineal múltiple, y cuando se trabaja con unas variables reducidas, se usa la regresión por componentes principales o la regresión por mínimos cuadrados parciales (42, 43). El procedimiento general de los estudios NIR implica una serie de etapas: toma de muestras, registro de los espectros, obtención de valores de referencia, pretratamiento de los espectros, desarrollo de los

modelos, validación interna y externa de los mismos. La estrategia a seguir variará dependiendo del tipo de respuesta buscada.

Se resaltan aquí los métodos utilizados en esta memoria comenzando con una serie de pretratamientos espectrales cuya finalidad es eliminar o reducir los efectos que enmascaran de alguna forma la señal apropiada para el propósito analítico.

III.4.1 Pretratamientos espectrales utilizados

Los principales problemas que presentan los espectros NIR se encuentran asociados a la dispersión de la luz (*scattering*), originada por las características físicas de la muestra (como puede ser el tamaño de partícula, forma o compactación) a factores externos como la temperatura o humedad, y aspectos relacionados con la medida instrumental, unido a la forma de los espectros NIR con bandas muy anchas que se solapan (43).

A continuación se describen los pretratamientos utilizados:

Promediado de espectros: con esta estrategia se pretende reducir el ruido aleatorio, y por tanto aumentar la relación señal/ruido.

Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión MSC (Multiplicative Scatter Correction): los efectos de la dispersión de la luz se asocian principalmente a factores físicos como puede ser el tamaño de partícula. Estos efectos pueden ser aditivos o multiplicativos, afectando a la relación del espectro con las propiedades químicas de la muestra. Mediante este tratamiento se pretende evitar que los efectos de la dispersión se impongan a las propiedades químicas de la muestra. La corrección se efectúa utilizando un espectro ideal, que suele ser el espectro medio del conjunto de muestras. Se realiza una regresión lineal por mínimos cuadrados entre los datos a cada longitud de onda del espectro original y los datos del espectro medio (o de referencia) para cada espectro a cada longitud de onda, $X_{\text{Log}(1/R),i}$ y $\bar{X}_{\text{Log}(1/R),i}$ respectivamente, obteniendo una recta para cada i-espectro.

$$X_{\text{Log}(1/R),i} = a_i + b_i \bar{X}_{\text{Log}(1/R),i} + e_i$$

Para cada espectro se obtiene el parámetro a_i , ordenada en el origen que representa los efectos aditivos y la pendiente b_i que representa los efectos multiplicativos, y un término residual, e_i .

La corrección de los efectos aditivos (visible si representamos la recta que define cada espectro en variaciones verticales de las mismas dentro del conjunto) se realiza mediante la sustracción del término a_i a cada valor del espectro original.

$$X_{\text{Log}(1/R),i \text{ aditivo}} = X_{\text{Log}(1/R),i} - a_i$$

La corrección de los efectos multiplicativos (visible si representamos la recta que define cada espectro en variaciones de pendiente de las mismas dentro del conjunto) se realiza dividiendo por la pendiente b_i cada valor del espectro original.

$$X_{\text{Log}(1/R),i \text{ multiplicativo}} = \frac{X_{\text{Log}(1/R),i}}{b_i}$$

Si queremos corregir los dos efectos (aditivos y multiplicativos) aplicaremos la corrección completa:

$$X_{\text{Log}(1/R),i \text{ MSC}} = \frac{X_{\text{Log}(1/R),i} - a_i}{b_i}$$

En general, esta corrección mejora la linealidad de los espectros y conserva la información química a la vez que se minimizan las diferencias entre los espectros (42, 44, 45), presenta el inconveniente de que es necesario realizar de nuevo los cálculos cuando se hace algún cambio en el conjunto de muestras; recalculando el espectro medio y por consiguiente todos los parámetros.

Tipificación de la absorbancia SNV (Standard Normal Variate): al igual que el anterior tratamiento, intenta minimizar la dispersión debida principalmente a factores físicos, como puede ser el tamaño de partícula. Este tratamiento se aplica individualmente a cada espectro y por tanto no necesita el cálculo de un espectro medio o de referencia, ni rehacer los cálculos si se elimina alguna muestra del conjunto inicial.

Existe una relación lineal entre este tratamiento y MSC, haciendo que los resultados ofrecidos por ambos métodos sean similares (44, 46).

En este método se realiza el cálculo del valor medio y la desviación estándar de los valores $\text{Log}(1/R)$ a todas las longitudes de onda de cada i-espectro, $\overline{X}_{\text{Log}(1/R),i}$ y $\sigma_{\text{Log}(1/R),i}$ respectivamente. Los nuevos datos para cada i-espectro se obtienen aplicando la siguiente transformación sobre cada dato a todas las longitudes de onda de cada i-espectro, $X_{\text{Log}(1/R),i}$:

$$X_{\text{Log}(1/R),i \text{ SNV}} = \frac{X_{\text{Log}(1/R),i} - \overline{X}_{\text{Log}(1/R),i}}{\sigma_{\text{Log}(1/R),i}}$$

Después de este tratamiento cada i-espectro tiene una desviación estándar igual a uno y una media igual a cero, siendo una distribución normal estandarizada, independiente de la escala original.

Una variante de este método, que es la utilizada en esta memoria, excluye el centrado de los datos, proporcionado por tanto unos i-espectros con una desviación estándar igual a uno y una media, que en este caso, no debe de ser cero, produciéndose así un autoescalado de cada i-espectro; obteniendo una distribución normal. La transformación realizada es la siguiente:

$$X_{\text{Log}(1/R),i \text{ SNV}} = \frac{X_{\text{Log}(1/R),i}}{\sigma_{\text{Log}(1/R),i}}$$

Corrección de la tendencia DT (Detrend): este tratamiento se aplica de forma individual a cada espectro e intenta minimizar la curvatura de la línea base que surge como consecuencia del diferente tamaño de partícula y del distinto grado de compactación en su empaquetamiento. El procedimiento consiste en ajustar cada espectro mediante mínimos cuadrados a una función cuadrática, donde la variable dependiente sea el dato a cada longitud de onda en cada i-espectro $X_{\text{Log}(1/R),i}$ y las independientes, las longitudes de onda W . De esta manera se obtienen los coeficientes

A , B y C , y un término residual, e_i , pudiendo calcular los valores a cada longitud de onda de cada i -espectro $\hat{X}_{\text{Log}(1/R),i}$ según la ecuación:

$$\hat{X}_{\text{Log}(1/R),i} = A + B \cdot W + C \cdot W^2 + e_i$$

La corrección se consigue sustrayendo este valor al dato original:

$$X_{\text{Log}(1/R),i \text{ DT}} = X_{\text{Log}(1/R),i} - \hat{X}_{\text{Log}(1/R),i}$$

Cada i -espectro después de esta corrección tiene una media igual a cero y una desviación estándar distinta a la unidad (44, 47).

A continuación y a modo de ejemplo se muestran los espectros originales de 5 muestras de semillas de uva y sus espectros NIR después de aplicar las correcciones a las que se ha hecho referencia.

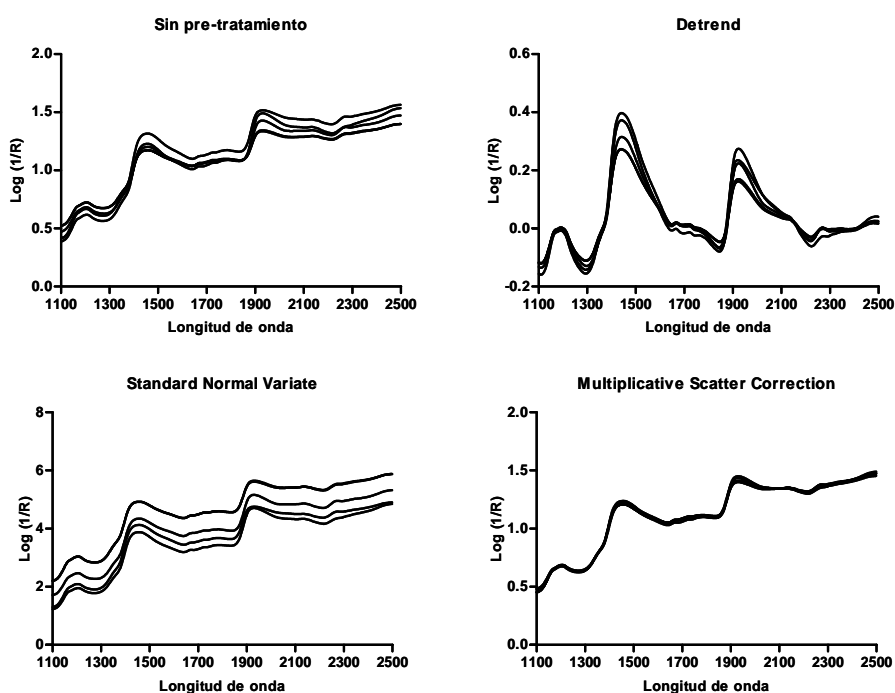


Figura III.8. Espectros de 5 muestras de semilla de uva y correcciones por diferentes pretratamientos.

La combinación de los pretratamientos Standard MSC, SNV y DT con posteriores suavizados y derivadas, ofrece un amplio abanico para intentar eliminar o reducir los efectos que enmascaran de alguna forma la señal apropiada para el propósito analítico (48).

Derivadas: son una herramienta muy utilizada en el procesado de los espectros NIR porque permiten disminuir sus problemas más característicos: bandas solapadas y variaciones en la línea base ocasionadas por características físicas de la muestras, como pueden ser el tamaño de partícula, empaquetamiento de muestras sólidas y otra serie de factores relacionados con las muestras y su presentación. Para el cálculo de las derivadas se emplea el método *gap* o segmento, utilizando la información de un segmento localizado en el espectro para calcular la derivada. Previamente se puede aplicar un suavizado sustituyendo los datos de un segmento por un valor promedio. La utilización de la primera derivada, pendiente de la curva espectral, elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, por lo que corrige desplazamientos de la línea base. La segunda derivada corrige el cambio de pendiente de la curva espectral, y además, corrige los términos que varían de forma lineal con la longitud de onda. No suelen utilizarse derivadas superiores a la segunda ya que suponen un aumento del ruido en las medidas espectrales (48). La notación utilizada son 4 dígitos (a, b, c, d), siendo a , el orden de derivada, b el número de puntos en los cuales se realiza la derivada, c el número de puntos en los cuales se realiza el primer suavizado y d , el número de puntos en los cuales se realiza el segundo suavizado. En este método de derivadas y suavizado se introduce una variable que es el segmento en el cual se realizan estas correcciones. Un segmento demasiado pequeño puede aumentar el ruido espectral, mientras que uno demasiado grande puede hacer que no se represente el comportamiento del espectro en el resultado o eliminar información importante (38).

En la **Figura III.9** se pueden observar diferentes derivadas y suavizados aplicados a un conjunto de 5 muestras de semillas de uva.

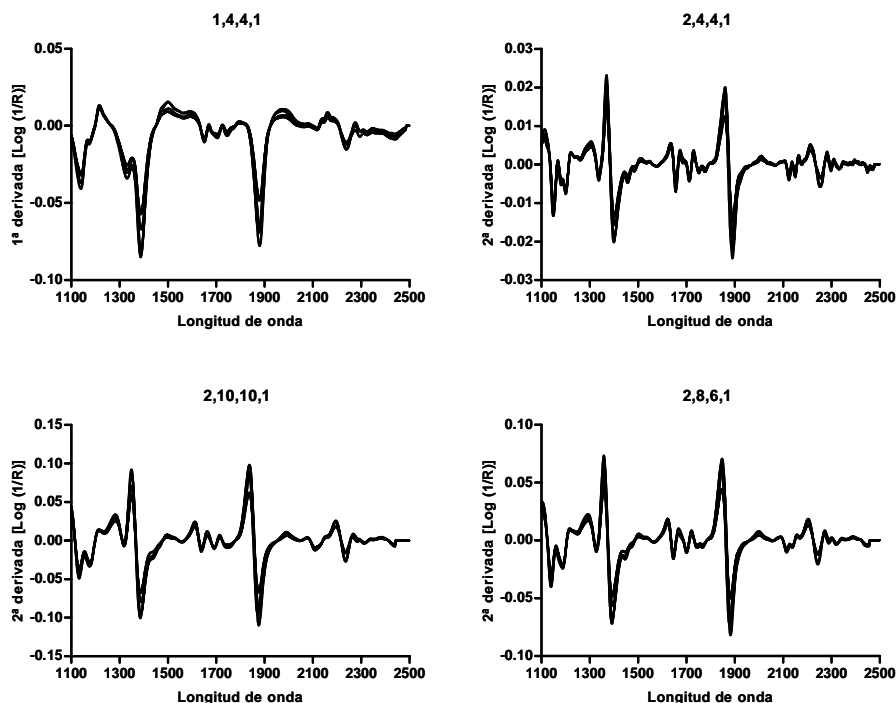


Figura III.9. Espectros de semillas de uva con diferentes suavizados y derivadas.

III.4.2 Análisis cualitativo

Análisis discriminante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales DPLS. Este método de reconocimiento de pautas prefijadas se fundamenta en la realización de una regresión por mínimos cuadrados parciales sobre unas variables categóricas denominadas *dummy*. El método de regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) se describirá más detalladamente en el apartado de métodos cuantitativos, si bien es necesario hacer una breve referencia (49).

Básicamente, un método PLS trata de concentrar la información relevante contenida en las variables medidas, en un número menor de variables sin pérdida de información relevante; en la construcción de estas nuevas variables se tiene en cuenta el dato de referencia. La regresión se realiza con estas nuevas variables, simplificando el modelo de calibración y la interpretación de los resultados. Dependiendo si el modelo se realiza para un sólo analito o dato de referencia o para varios a la vez, tendremos las

modalidades de PLS 1 y PLS 2 respectivamente (40, 41). En este caso en concreto se ha utilizado un PLS 1.

Como en el desarrollo del modelo se conoce *a priori* el grupo al cual pertenecen las muestras, se genera una matriz con las muestras de todas las clases y una nueva variable *dummy*, que indicará la pertenencia de una determinada muestra a una clase u otra mediante los diferentes valores (1 y 2), realizando una regresión PLS 1 con la matriz de esta nueva variable *dummy* y los datos espectrales de las muestras.

Para fijar el número de nuevas variables, factores PLS, y evaluar el modelo, se tiene en cuenta la validación cruzada. El número de factores PLS es siempre superior al que cabe esperar en un PLS con fines cuantitativos. Otros parámetros como el RSQ (coeficiente de correlación múltiple), SEC (error estándar de calibración) y SECV (error estándar de validación cruzada) proporcionan información a cerca de la bondad del modelo, todos estos términos se explican con mas detalle en la parte de análisis cuantitativo. En la **Figura III.10** se muestra esquemáticamente el proceso de obtención del modelo en el caso de 5 muestras y 2 clases diferentes (38, 40, 41).

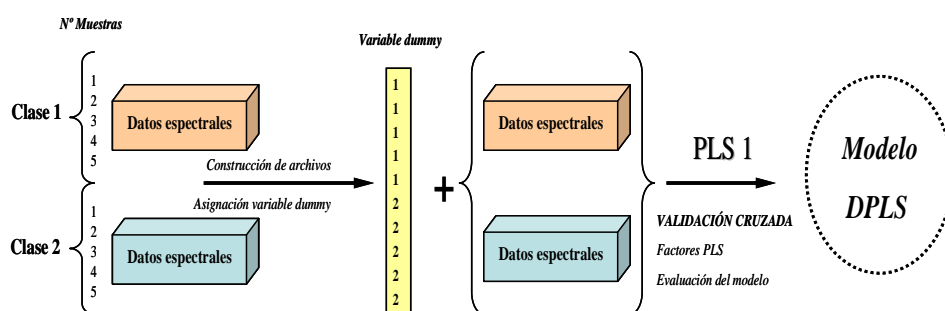


Figura III.10. Esquema de obtención del modelo DPLS utilizado.

Una vez obtenido el modelo se predice el valor de la variable *dummy* para cada muestra y después las muestras se distribuyen según su valor de predicción ± 0.5 siendo en este caso 1.5 el valor de corte de pertenencia a una u otra clase. El porcentaje de muestras correctamente clasificadas en la clase a la que pertenecen indica la bondad del modelo desarrollado (38). En la **Figura III.11** se puede apreciar de forma esquemática el proceso de validación interna y externa del modelo DPLS. Si la predicción se realiza

sobre las muestras que han servido para desarrollar el modelo estaremos realizando la validación interna del mismo. Por el contrario, si las muestras son distintas a las utilizadas en la obtención del modelo estaremos realizando una validación externa.

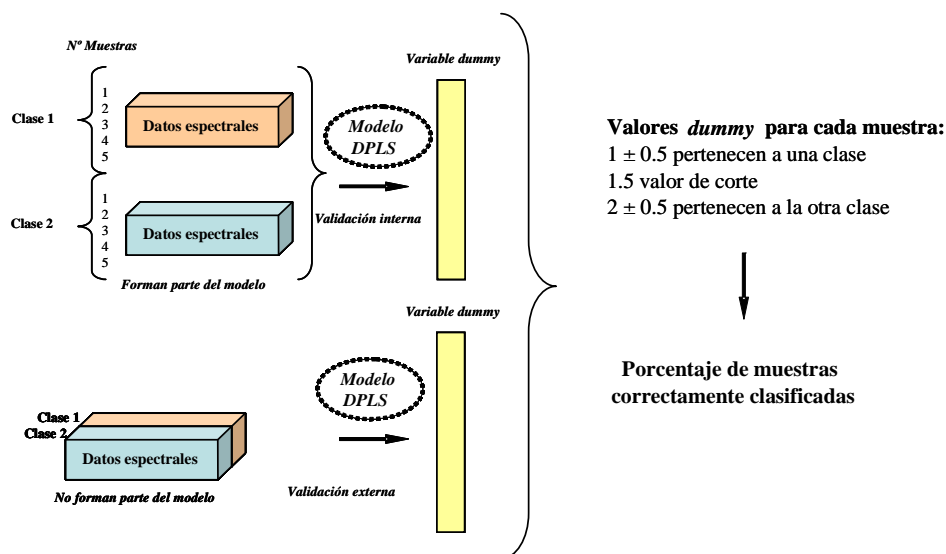


Figura III.11. Validación interna y externa de modelos DPLS.

Análisis de componentes principales PCA. El análisis de componentes principales es un método de reconocimiento de pautas no prefijadas, es habitual en análisis multivariante, cuyo objetivo es reducir el número de variables iniciales, sin perder información y así poder observar estructuras y tendencias en las muestras.

El PCA (50), de forma muy básica, consiste en:

- Estimar la dimensionalidad real de los datos de las muestras estudiadas; y reducir esta dimensionalidad manteniendo la información relevante del sistema.
- Calcular un nuevo sistema de coordenadas, para lo que se buscan las direcciones que expliquen la máxima variabilidad en los datos de las muestras. Estos nuevos ejes se denominan componentes principales (PCs). Así el primer

componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad de los datos de las muestras; el segundo, se escoge que sea perpendicular al primero, y que explique la máxima variabilidad de los datos de las muestras una vez restada la explicada por el primer componente principal y así sucesivamente. Para fijar el número de componentes principales se utilizan reglas o criterios. En nuestro caso, los criterios son: variabilidad espectral explicada superior a un 95%, variabilidad espectral explicada constante y desviación estándar de las puntuaciones o *scores* de las muestras constante.

- Definir estos nuevos ejes matemáticamente, mediante los *loadings*, cargas o pesos que son los cosenos de los ángulos que forman cada uno de estos nuevos ejes con los antiguos, y los *scores* o puntuaciones que son las coordenadas en estos nuevos ejes. De tal forma que:

$$\begin{aligned} \text{Espectro de la muestra} &= (\text{score}_1) (\text{loading}_1) + (\text{score}_2) (\text{loading}_2) \\ &+ \dots + \text{ruido espectral} (E \sim \text{residual}) \end{aligned}$$

Los componentes principales se pueden interpretar geoméricamente (51) de tal forma que el espectro medido a J longitudes de onda, constituye un conjunto de J variables que puede ser descrito como un vector. Se puede construir un espacio de J dimensiones de tal manera que cada dimensión corresponda a una de las longitudes de onda y se pueda representar el mismo objeto como un punto en ese nuevo espacio. Si tenemos M muestras, se pueden representar como M puntos en el espacio de J dimensiones. El objetivo del PCA es hallar las direcciones en que están agrupados los M puntos de los objetos en el espacio de J dimensiones y reducir el sistema inicial J dimensional a uno A dimensional, con $A < J$ manteniendo la información relevante del sistema. Geométricamente es un cambio de ejes, representando esas muestras en un sistema de coordenadas con un número inferior de ejes al utilizado inicialmente.

Otra propiedad muy importante de los PCs es la ortogonalidad. El método busca las direcciones ortogonales que expliquen la máxima variabilidad de los datos de las muestras, utilizando estas direcciones como nuevos ejes de coordenadas o PCs.

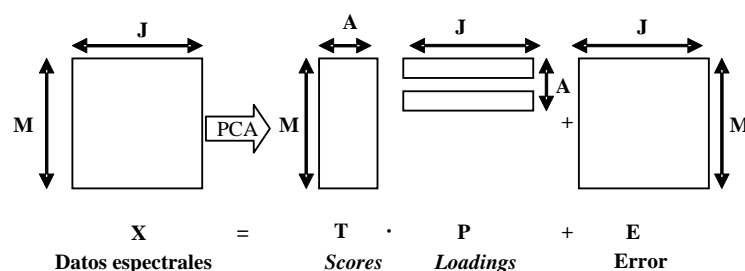


Figura III.12. Descomposición de un conjunto de espectros mediante análisis de componentes principales.

Resumiendo, el PCA se utiliza para reducir el número de variables originales correlacionadas, a un número de variables no correlacionadas en un nuevo sistema de ejes ortogonales denominados PCs.

El método para el procesado de datos o escalado será un centrado de datos, el valor medio corresponde al centro del modelo y los valores de todas las variables se refieren a ese centro.

La detección de espectros *outliers* o espectros fuera de la población se lleva a cabo utilizando la distancia de Mahalanobis (H). Se establece la diferencia espectral de una muestra respecto a la media espectral del conjunto de muestras (H), tomando como valor límite $H = 3$, de forma que aquellos espectros cuya distancia H sea superior a 3.0 se desechan (38). En la **Figura III.13** podemos observar de forma esquemática la forma de proceder al realizar un análisis de componentes principales previa realización de diferentes pretratamientos.

La elección del número de componentes principales, construcción del nuevo espacio espectral, detección de *outliers* y devolución del conjunto de datos espectrales originales sin los *outliers* es parte del proceso. En este nuevo archivo las muestras con los datos espectrales originales se ordenan de acuerdo con la distancia de Mahalanobis (H) obtenida anteriormente. Esto resulta muy útil en procesos posteriores a la hora de construir los grupos de validación cruzada, de manera que los subgrupos resulten homogéneos. También mediante este proceso de análisis de componentes principales se

puede observar qué muestras resultan espectralmente diferentes, sin rebasar el valor de $H = 3$, con objeto de decidir su inclusión en el conjunto de calibración.

Mediante este análisis de componentes principales se puede determinar si una nueva muestra está dentro del espacio determinado por el conjunto de calibración cuantitativa mediante la distancia de Mahalanobis (H) con valor límite de 3, antes de realizar la medida cuantitativa. Aquellas muestras que no pertenezcan al espacio espectral no deben ser predichas y se debe de realizar un análisis de referencia y guardar el espectro para una posible ampliación del modelo. Durante el análisis de muestras es importante registrar la distancia de Mahalanobis a la muestra vecina (NH), aquellas cuyo valor de NH sea superior a 0.6 pueden resultar interesantes con objeto de mejorar el modelo (38).

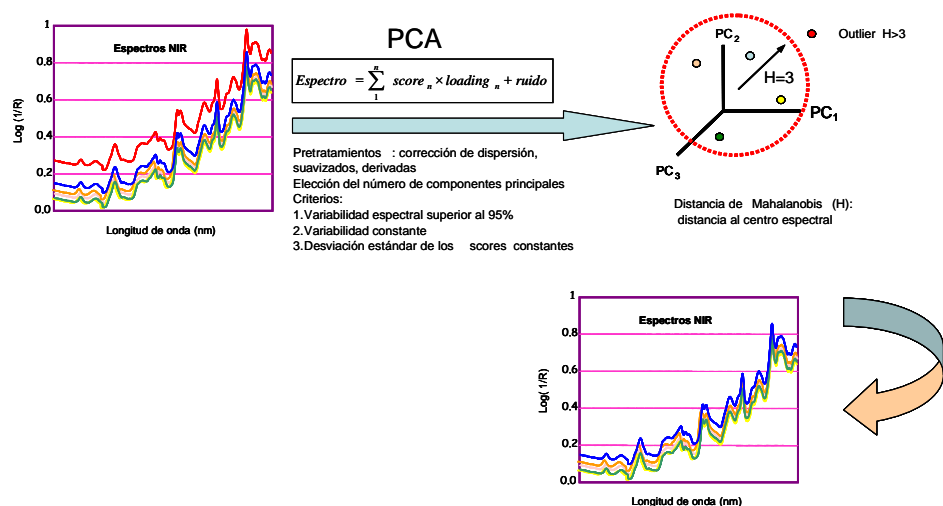


Figura III.13. Análisis de componentes principales.

III.4.3 Análisis cuantitativo

Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados MPLS. Se basa en que la información relevante contenida en las variables medidas se puede concentrar en un número menor de variables sin pérdida de información relevante. La regresión se realiza con estas nuevas variables, no con los datos originales, simplificando el modelo de calibración y la interpretación de los resultados (50).

Es útil para resolver problemas de calibración que contienen un número elevado de variables y relativamente pocas muestras, como es el caso de la espectroscopía NIR, basándose en una reducción de variables. Estas nuevas variables, denominadas variables latentes, factores o componentes, son combinación lineal de las variables originales.

Durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de los datos espectroscópicos (matriz X), como la información contenida en la matriz de datos de referencia (matriz Y); teniendo en cuenta ambas informaciones, el método reduce el impacto de grandes pero irrelevantes variaciones en la matriz X en el calibrado, se busca además la máxima variabilidad en la matriz X y la mayor correlación con la matriz Y (52). Además el PLS realiza la regresión en un espacio ortogonal, evitando los problemas derivados de la colinealidad entre las variables, el centrado de los datos se realiza en las matrices X e Y.

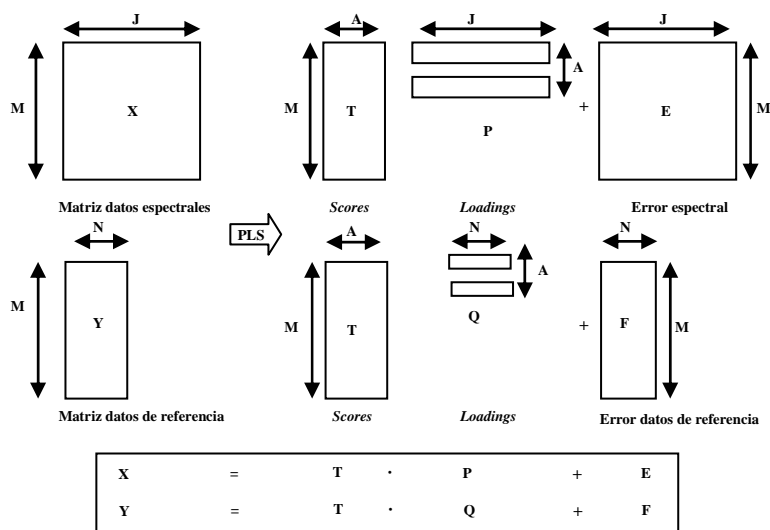


Figura III.14. Esquema general de obtención de modelos PLS.

En la **Figura III.14** se observa la descomposición de la matriz espectral y la que contiene los parámetros a modelar (X e Y) mediante PLS, siendo T, matriz de los *scores*, el nexo común entre ambas. Las matrices P y Q representan los *loadings*, mientras que las matrices E y F representan los errores o residuales de la

descomposición de las diferentes matrices. El número de muestras corresponde a M ; A es el número de variables latentes obtenidas y N indica el número de parámetros a modelar (40, 41).

En la matriz Y , el número de columnas (N) representa el número de parámetros a modelar. Si $N = 1$ se estaría modelando para un único parámetro, dando lugar al denominado PLS 1. Sin embargo si N toma un valor distinto a la unidad se estarían modelando varios parámetros de forma simultánea, dando lugar al denominado PLS 2.

En esta memoria se ha elegido el método MPLS, (*Modified Partial Least Squares*) un PLS modificado. La modificación reside en que los residuales NIR a cada longitud de onda (obtenidos después de que se calcula cada factor, variable latente o componente) se estandarizan (es decir se dividen por la desviación estándar de los residuales a cada longitud de onda) antes de calcular el siguiente factor o variable latente; lo que hace a este algoritmo más estable y preciso que un PLS normal (38). Al modelar uno a uno los parámetros se trata de una modificación de un algoritmo PLS 1.

El objetivo de la calibración es obtener unos parámetros que permitan calcular la concentración en futuras muestras, de forma que, el residual (diferencia entre el valor de referencia y el predicho) de los datos calculados sea el menor posible. Teniendo en cuenta esto se evaluará la capacidad de predicción del modelo. Se intenta que los primeros factores o variables latentes contengan la mayor información para la predicción de las muestras. La elección del número de factores o variables latentes se puede realizar de diversas formas; una de las más extendidas es mediante la validación cruzada, procedimiento por el que el conjunto original se divide en varios grupos de forma que se utiliza un grupo para comprobar los resultados (validar) y el resto para construir el modelo, de forma que cada vez se deje un grupo fuera, el proceso se repite tantas veces como subgrupos se formen. De esta manera se evitan los sobreajustes, atendiendo al valor del error estándar de validación cruzada (SECV) que de forma aproximada se puede decir que es equivalente al error estándar de predicción (SEP) de 10 muestras elegidas al azar (38, 40, 41).

En la **Figura III.15** se puede observar de forma esquemática el proceso de validación cruzada: generación de subgrupos y paso de todos ellos por los conjuntos de calibración y validación.

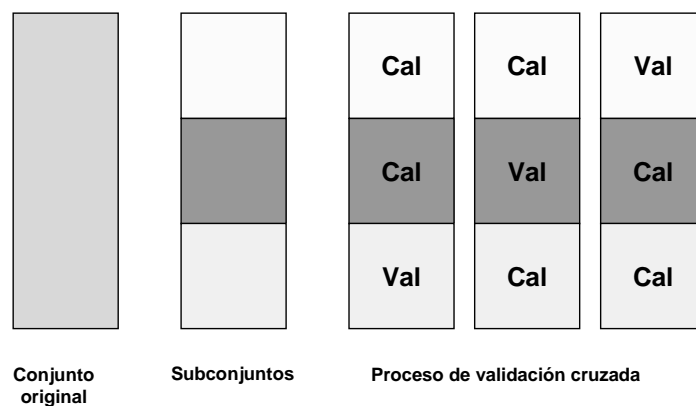


Figura III. 15. Esquema del proceso de validación cruzada.

En el proceso de elección del número de factores o variables latentes se comienza por establecer un SECV mínimo y a partir de este se calcula el máximo SECV aceptable (5% superior al mínimo). Se identificará el SECV que con el menor número de factores o variables latentes sea inferior al máximo SECV aceptable, eligiéndose ese número de factores o variables latentes para desarrollar el modelo.

Durante este proceso también son detectadas muestras con altos residuales, diferencias entre el valor de referencia y el predicho. Se utiliza el criterio T, de forma que aquellas muestras cuyo residual dividido por el SECV del proceso supere el valor de 2.5 serán eliminadas del conjunto de calibración.

$$T = \frac{\text{residual}}{\text{SECV}}$$

Este procedimiento se repite dos veces para obtener finalmente el modelo (38).

Algunos de los parámetros que se obtienen de la ecuación de calibración son:

- *RSQ*: coeficiente de correlación múltiple; se utiliza para medir el grado con el que el calibrado ajusta los datos.

$$RSQ = 1 - \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_{teo_i} - \bar{y})^2} \right)$$

- *SEC*: error estándar de calibración.

$$SEC = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N - p - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

- *BIAS*: se define como la media de los residuales, siendo éstos la diferencia entre el valor del laboratorio (y_{cal_i}) y el valor predicho (\hat{y}_{teo_i}).

$$residual_{,f_{ij}} = (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})$$

$$BIAS = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})$$

- *SECV*: error estándar de validación cruzada.

$$SECV = \left(\frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} - BIAS)^2}{N - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

- *Rango de aplicabilidad*: valores máximo y mínimo del parámetro de referencia para los cuales se puede utilizar la ecuación.

En estas ecuaciones y_{cal_i} e \hat{y}_{teo_i} son respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las i -muestras, \bar{y} es el valor medio de los datos calculados, N

es el número de muestras utilizadas en el calibrado, y p es el número de factores de la regresión.

Una vez obtenido el modelo se procede a la *validación interna* mediante la predicción de los valores del parámetro de referencia en las mismas muestras que finalmente forman parte del modelo. Algunos de los parámetros que se utilizan para estimar la bondad del modelo son:

- *RSQ*: obtenido al realizar una regresión entre los valores de referencia y los predichos mediante espectroscopía NIR.
- *SEP*: error estándar de predicción.

$$SEP = \left(\frac{\sum_{i=1}^N \left(y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} \right)^2}{N} \right)^{\frac{1}{2}}$$

- *SEP(C)*: error corregido por el BIAS.

$$SEP(C) = \left(\frac{\sum_{i=1}^N \left(y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} - BIAS \right)^2}{N - 1} \right)^{\frac{1}{2}}$$

En estas ecuaciones y_{cal_i} e \hat{y}_{teo_i} son respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las i -muestras y N es el número de muestras utilizadas para realizar la validación interna.

RPD: capacidad de predicción del modelo (*ratio performance deviation*).

$$RPD = \frac{SD_{ref}}{SEP}$$

Se trata de la relación entre la desviación estándar de los datos obtenido mediante el análisis de referencia y el error estándar de predicción de los mismos. Este valor

idealmente debe ser superior a 2.5, si bien en los casos en los que SD_{ref} es menor que la unidad puede no llegarse a ese valor ideal (53):

Además, para comprobar la robustez del modelo de calibración se realiza una *validación externa*, aplicando las ecuaciones a un conjunto de muestras que no pertenecen al colectivo de calibración. Algunos de los parámetros que se evalúan son:

- Porcentaje de error respecto al valor de referencia.
- *SEP validación externa* (error estándar de predicción en validación externa). La fórmula es la misma que se emplea en validación interna (para el SEP), pero aplicada a muestras que no pertenecen al colectivo de calibración.
- ANOVA de una vía: se utiliza para comprobar si los valores medios obtenidos por los diferentes métodos (método de referencia y espectroscopía NIR) proporcionan valores medios significativamente iguales o no, en nuestro caso se utiliza un nivel de confianza del 95% ($p = 0.05$).

Capítulo 6.

Determinación de la composición fenólica de hollejos de uva tinta mediante NIRS a lo largo de la maduración.

6.1) OBJETIVOS

La finalidad que se desea alcanzar en este apartado pretende dar respuesta a la demanda de métodos rápidos para determinar la composición fenólica de los hollejos de uva tinta durante la maduración. El objetivo principal es estudiar el potencial de la tecnología NIRS para determinar las principales familias de compuestos fenólicos. Se trata de evaluar la viabilidad de cuantificar simultáneamente el contenido en compuestos fenólicos totales, flavanoles, flavonoles, antocianos y ácidos fenólicos de una forma rápida a lo largo de la maduración (desde envero hasta sobremadurez). Además, debido a las ventajas que ello conlleva, se evalúa la posibilidad de la medida directa de las uvas enteras mediante fibra óptica, frente al registro de los hollejos (separados de la pulpa y de las semillas) registrados en cubeta.

6.2) JUSTIFICACIÓN

La composición fenólica de las uvas juega un importante papel en la definición de muchas de las propiedades organolépticas del vino. Los antocianos son los responsables del color de los vinos tintos y sus interacciones con otros compuestos determinan los cambios de color observados durante la maduración. Los flavanoles participan en la evolución del color del vino, además tienen una gran influencia en sensaciones organolépticas como la astringencia, sequedad y cuerpo. Los flavonoles tienen influencia en el amargor y la astringencia y al igual que algunos ácidos fenólicos se comportan como buenos copigmentos (54-58). La composición de las uvas y el proceso de vinificación determinan la cantidad de copigmentos en el vino y establece la extensión del fenómeno de la copigmentación así como su efecto en el color del vino.

A lo largo de la historia enológica se han utilizado y todavía se utilizan diversos métodos analíticos cuyo objetivo es obtener un conocimiento acerca de la composición fenólica, bien para conocer el estado del vino o bien para saber el potencial de las uvas.

Entre los más utilizados se encuentran; el índice de Glories, el índice de polifenoles totales, el índice de Folin-Ciocalteu, el método Cromoenos[®], el índice de PVP, el índice de etanol, etc (59-61). Sin duda todos ellos son de gran ayuda y ofrecen información de interés a los enólogos. Sin embargo ninguno de ellos permite distinguir entre las diferentes familias de compuestos fenólicos (flavanoles, flavonoles, antocianos y ácidos fenólicos). Para este fin es necesario, además de proceder a su extracción, el uso de técnicas de HPLC acopladas a un DAD y/o a un espectrómetro de masas (62-66). Es evidente que desde el punto de vista de su aplicación en bodega estas técnicas no son viables y quedan reservadas casi únicamente a la investigación ya que son técnicas caras y requieren de bastante tiempo de análisis. La espectroscopía NIR es una técnica no destructiva, precisa y rápida que podría emplearse para remplazar las técnicas analíticas mencionadas.

6.3) MATERIAL Y MÉTODOS

6.3.1 Análisis de referencia

Las muestras que se han utilizado para el análisis de referencia son las mismas que se han descrito en el *capítulo 1*. Lo mismo ocurre con el método HPLC-DAD-MS utilizado. 41 compuestos fenólicos determinados en hollejos se agrupan teniendo en cuenta sus estructuras básicas tal y como muestra la **Figura 6.1**.

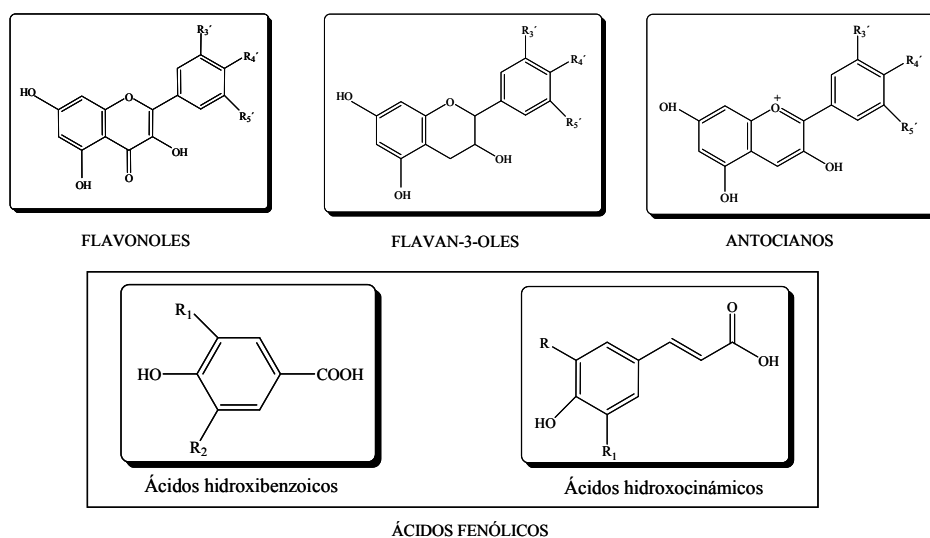


Figura 6. 1. Estructuras básicas de los fenoles determinados mediante NIRS.

6.3.2 Análisis NIRS hollejos y uvas

Con la intención de tener un amplio intervalo de concentraciones de los compuestos fenólicos, las muestras se recogieron en diferentes puntos del desarrollo de la baya, desde el envero (Septiembre) hasta la sobremaduración (Noviembre). El estudio se ha realizado en dos años y en dos parcelas. Se recogieron un total de 84 muestras, de las cuales 39 corresponden al viñedo 1 y 45 al viñedo 2. Para llevar a cabo el análisis en el infrarrojo se usan alcuotas de hollejos (previamente separados) y de bayas enteras. Las muestras que se encuentran congeladas a -20°C son descongeladas y atemperadas en una habitación con temperatura controlada.

En el caso de los hollejos, los espectros NIR se registran utilizando una cubeta de cuarzo (*transport quartz cup*). Se trata de una cubeta rectangular con una superficie de ventana de cuarzo de 4.7 cm x 5.7 cm, con un paso óptico de 1.7 cm. Se usó el modo full 1/2, que indica que la lectura se registra hasta la mitad de la ventana para no tener problemas de llenado o muestra suficiente. Los espectros se registran por reflectancia utilizando la zona del infrarrojo cercano de 1100-2498 nm. El intervalo de registro de los espectros es de 2 nm, realizando 32 lecturas (*scans*) tanto para la muestra como para la referencia. Para minimizar el error espectral, el equipo mide la muestra 3 veces y

muestra el espectro final después de calcular la media. Entre muestras se lava la cubeta con metanol/agua (50:50) para evitar una posible contaminación. Se miden tres alícuotas para cada punto de muestreo.

Para el registro de espectros en uvas enteras se utiliza una sonda de fibra óptica de reflectancia remota de tipo Bundle (haz) regular 210/210 utilizando la zona del infrarrojo cercano de 1100-2000 nm. La sonda utiliza una placa cerámica como referencia y dispone de una ventana de cuarzo de 5cm x 5cm con detector de reflectancia. La sonda se une al equipo mediante una conexión de 1.5 metros de fibra óptica que permite la aplicación directa de la sonda sobre las uvas. En la **Figura 6.2** se presenta una foto del equipo con la sonda de fibra óptica y un esquema con las dos herramientas de medida (la sonda en el caso de uvas enteras y la cubeta en hollejos).

El software que se utiliza para adquirir los datos con el equipo y para el tratamiento de los mismos es el programa Win ISI ® (v1.50) (Infrasoft International, LLC, Port. Matilda, PA, USA). Este software no sólo permite la adquisición espectral de los datos, también permite el desarrollo de los modelos cuantitativos. De las tres muestras obtenidas en cada fecha de muestreo dos de ellas se destinan de forma aleatoria al conjunto de calibración (66%) y la otra es destinada al conjunto de validación (33%). Por tanto, de las 84 muestras, 56 fueron destinadas al conjunto de calibración y 28 al de validación. Se hizo de la misma manera en uvas enteras y en hollejos.

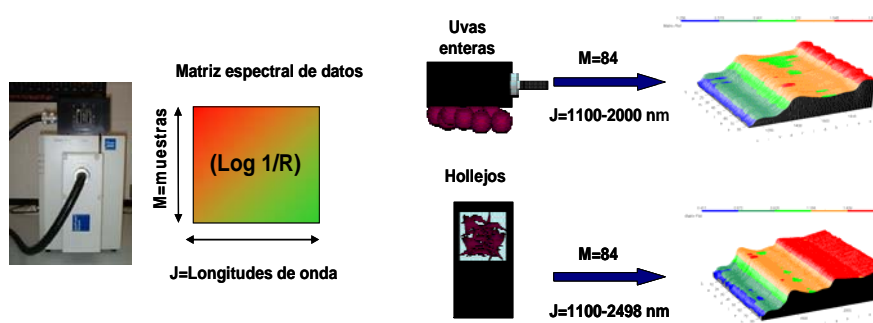


Figura 6.2. Foto del equipo NIRS y esquema de obtención de los espectros mediante la sonda de fibra óptica (uvas enteras) y la cubeta (hollejos).

6.3.3 Análisis quimiométrico

Antes de realizar el análisis cuantitativo se realiza un pretratamiento espectral (SNV 2,4,4,1) y después se aplica un PCA, método de reconocimiento de pautas no prefijadas. Esta técnica nos proporciona información acerca de la estructura latente de los espectros, además nos sirve para identificar *outliers* espectrales de acuerdo con la distancia de Mahalanobis ($H > 3$), crear los grupos de validación cruzada y posteriormente, una vez desarrollados los modelos, es útil para saber si una muestra desconocida pertenece o no al espacio creado. En esta etapa se eliminan este tipo de *outliers* y una vez eliminados (en caso de haberlos) se continúa con el desarrollo de los modelos cuantitativos. Con la finalidad de eliminar efectos debidos a dispersión de la luz (características físicas de la muestra) se utilizan los pretratamientos espectrales y matemáticos explicados anteriormente sobre los espectros sin pretratar (originales). De estos tratamientos se eligen los que proporcionan los modelos más adecuados (con mayor RSQ, SEC y SEV). Para la realización de los calibrados se usa un MPLS, se desarrolla una validación cruzada y se obtienen los T-*outliers*. Finalmente se realiza una validación interna y externa del modelo. En el apartado referente a la quimiometría están explicadas estas herramientas detalladamente. En la **Figura 6.3** se muestra un esquema de cómo se generan estos modelos cuantitativos.

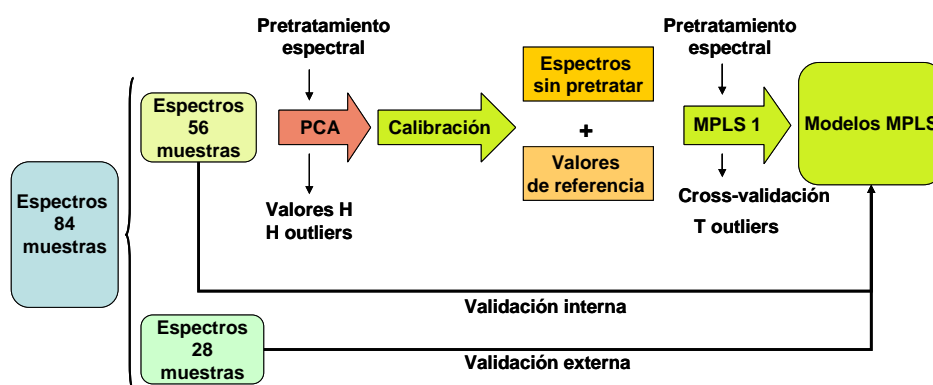


Figura 6.3. Esquema de generación de modelos cuantitativos MPLS.

6.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.4.1 Análisis de referencia

La **Tabla 6.1** muestra el valor medio, la desviación estándar del conjunto y el intervalo de la cantidad de flavanoles, flavonoles, ácidos fenólicos, antocianos y compuestos fenólicos totales.

Tabla 6.1. Contenido en compuestos fenólicos en mg/g de hollejo.

	Mínimo	Máximo	Promedio	SD
Antocianos	0.24	11.14	4.41	2.56
Flavonoles	0.54	1.75	1.24	0.34
Flavanoles	0.41	6.92	3.14	2.08
Ácidos Fenólicos	0.10	0.76	0.43	0.17
Total	1.95	18.35	9.23	4.61

SD (desviación estándar n=84).

6.4.2 Análisis NIRS hollejos y uvas

El PCA de las uvas requiere de 9 componentes principales para explicar una variabilidad espectral del 97.9%. En el análisis de los hollejos se necesita un total de 14 componentes principales para explicar un 97.1% de la variabilidad espectral. Por tanto, en el caso de los hollejos se necesitan más componentes principales para explicar una variabilidad espectral similar. Esto podría ser debido a que la matriz de datos espectrales en hollejos presenta una estructura más compleja (región espectral más amplia, de 1100-2000 nm en uvas y de 1100 a 2498 nm en hollejos). Bajo el criterio $H>3$ no se encuentra ningún *outlier* ni en los hollejos ni en las uvas. Las puntuaciones en el espacio definido por las tres primeras componentes principales se muestran en la **Figura 6.4**.

En el caso de los hollejos la primera componente principal (PC1) explica el 63.4% de la variabilidad espectral, la segunda (PC2) el 16.5% y la tercera (PC3) el 6.3%. En el caso de las uvas enteras la variabilidad espectral explicada es de 75.6%, 11.0% y 4.9% respectivamente. En ambos casos, la dispersión de las muestras en el espacio construido por estas componentes principales (**Figura 6.4**) refleja la amplia variabilidad espectral

tenida en cuenta en el estudio. Los diferentes factores considerados en el ensayo (parcelas, período de maduración, añadas) proporcionan así un amplio rango de variabilidad. En esta figura, además se pueden visualizar claramente las diferencias entre años, sin embargo la distinción entre parcelas resulta más difícil de ver.

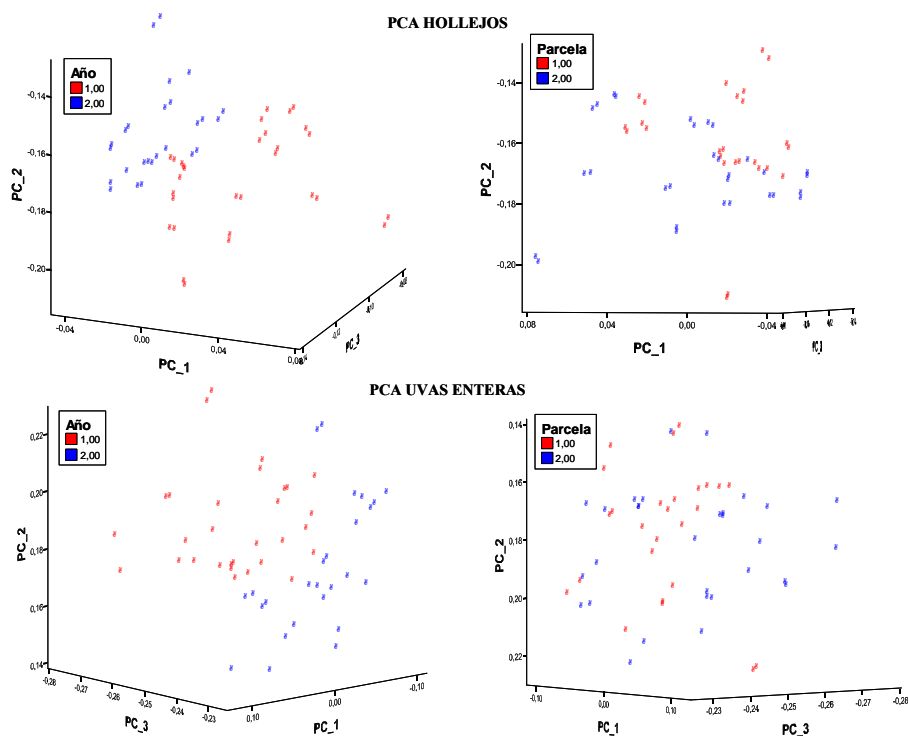


Figura 6.4. Espacios definidos por las tres primeras componentes principales PC1, PC2 y PC3.

La calibración se lleva a cabo mediante una regresión de mínimos cuadrados parciales (MPLS) probando diferentes pretratamientos. El número óptimo de términos PLS usados para la calibración se determina mediante la validación cruzada. En las **Tablas 6.2** y **6.3** se muestran los parámetros estadísticos obtenidos de las ecuaciones finales de calibración tanto para uvas enteras como para hollejos. Estas tablas presentan el número de muestras usadas (N) para obtener los modelos de calibración después de haber eliminado los *outliers* basados en el criterio $T > 2.5$. También se muestra el tratamiento espectral más adecuado para cada una de las familias de compuestos, el

intervalo de concentraciones y la desviación estándar. El error estándar de validación cruzada nos muestra la bondad del modelo.

Tabla 6.2. Descriptores estadísticos para los modelos NIR desarrollados en uvas enteras (mg/g de hollejo).

Compuestos	Antocianos	Ac. fenólicos	Flavanoles	Flavonoles	Total
Pre-tratamientos	MSC 2,4,4,1	SNV 2,8,6,1	SNV 2,8,6,1	None 2,4,4,1	SNV 2,4,4,1
Nº muestras	56	54	52	56	54
Factores PLS	6	5	7	6	6
Promedio (mg/g)	4.41	0.42	3.11	1.24	9.17
SD (mg/g)	2.56	0.17	2.04	0.34	4.69
Mínimo (mg/g)	0.00	0.00	0.00	0.23	0.00
Máximo (mg/g)	12.10	0.93	9.23	2.26	23.23
SEC (mg/g)	0.56	0.08	0.38	0.09	0.63
RSQ	0.952	0.747	0.966	0.933	0.982
SECV (mg/g)	1.10	0.11	0.59	0.16	1.33
CV (%)	12.76	20.25	12.08	7.01	6.87

SD: desviación estándar; SEC: error estándar de calibración; RSQ: coeficiente de determinación; SECV: error estándar de validación cruzada; CV (%): coeficiente de variación (SEC/Promedio) x 100.

Tabla 6.3. Descriptores estadísticos para los modelos NIR desarrollados en hollejos (mg/g de hollejo).

Compuestos	Antocianos	Ac. fenólicos	Flavanoles	Flavonoles	Total
Pre-tratamientos	None 1,4,4,1	Detrend 2,4,4,1	MSC 2,4,4,1	SNV 2,4,4,1	SNV 2,4,4,1
Nº muestras	54	55	54	53	56
Factores PLS	7	6	7	7	5
Promedio (mg/g)	4.17	0.42	3.14	1.28	9.23
SD (mg/g)	2.24	0.16	2.12	0.31	4.61
Mínimo (mg/g)	0.00	0.00	0.00	0.36	0.00
Máximo (mg/g)	10.90	0.91	9.50	2.20	23.06
SEC (mg/g)	0.39	0.04	0.17	0.03	0.65
RSQ	0.970	0.941	0.994	0.993	0.980
SECV (mg/g)	0.66	0.12	0.68	0.11	1.34
CV (%)	9.33	9.55	5.38	2.07	7.07

SD: desviación estándar; SEC: error estándar de calibración; RSQ: coeficiente de determinación SECV: error estándar de validación cruzada; CV (%): coeficiente de variación (SEC/Promedio) x 100.

La **Figura 6.5.A** muestra el espectro medio del conjunto de uvas enteras y su desviación estándar multiplicada por 10. La **Figura 6.5.B** muestra el espectro medio de

hollejos y su desviación estándar multiplicada por 10. En la **Figura 6.5.C** se representa la diferencia absoluta entre el espectro medio del conjunto de uvas y de hollejos. Se observan diferencias espectrales en las bandas O-H según la presentación de la muestra. La mayor diferencia se encuentra entre 1100-1300 nm, esta zona era la más importante en el desarrollo de los modelos PLS. Estos resultados están en consonancia con los estudio de Cozzolino *et al.*, que mostraron diferencias en la misma zona usando uvas enteras, homogeneizados de uva y una sola baya (20).

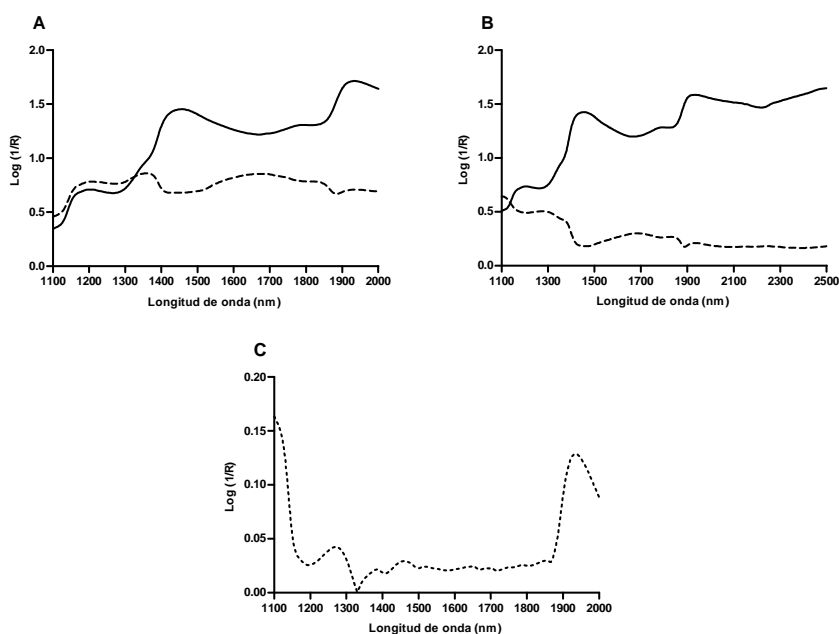


Figura 6.5. (A) Espectro medio (—) desviación estándar $\times 10$ (--) en uvas y (B) espectro medio (—) y desviación estándar $\times 10$ (--) en hollejos. (C) Diferencia absoluta entre ambos espectros medios.

En la **Figura 6.6** se muestran, a modo de ejemplo, los *loadings* correspondientes a los compuestos fenólicos totales de las uvas y de los hollejos. Las regiones espectrales cercanas a 1140 y 1320 nm muestran importantes contribuciones a los *loadings* del modelo y están principalmente relacionadas con las bandas de los grupos funcionales O-H, tensiones simétricas y no simétricas. Estas regiones espectrales también están relacionadas con el segundo sobretono de los enlaces C-H aromáticos y los terceros

sobretonos de los grupos O-H (67, 68). Esto podría atribuirse, por tanto, a la estructura química de los compuestos analizados.

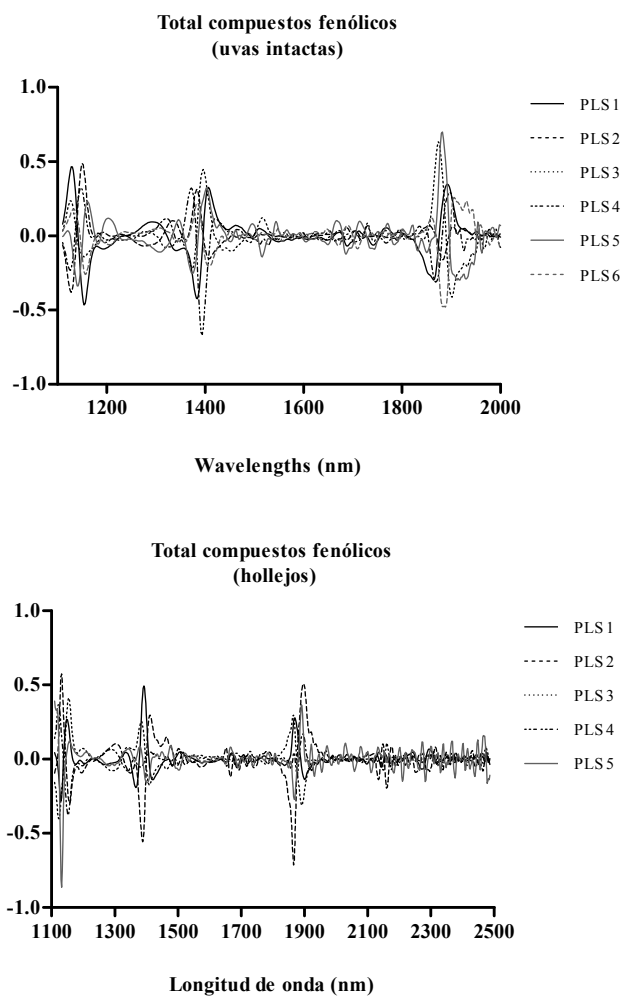


Figura 6.6. Loadings de los compuestos fenólicos totales en uvas y hollejos.

Con la finalidad de evaluar los modelos obtenidos se llevaron a cabo una validación interna y una validación externa. Las **Tablas 6.4 y 6.5** muestran los descriptores estadísticos para la validación interna y externa en uvas enteras y en hollejos. La validación interna se llevó a cabo utilizando las muestras que pertenecían al grupo de calibración después de eliminar los outliers (en este caso sólo se dieron bajo el criterio T, ya que no existían outliers para la distancia de Mahalanobis ni en uvas ni en hollejos). La capacidad de predicción de los modelos (RPD) mostró que en ambos casos las calibraciones eran adecuadas (ver apartado quimiometría, valores superiores a 2.5), indicando que los modelos desarrollados podían ser aplicados a muestras desconocidas. La validación externa permitió comprobar la robustez de los modelos, en este caso se utilizaron 28 muestras que no pertenecían al grupo de calibración.

En la **Figura 6.7** se presentan los valores predichos mediante NIRS frente a los valores obtenidos con HPLC. Se muestra también los valores de algunos parámetros estadísticos que se utilizan para estimar la bondad del modelo como son el coeficiente de correlación múltiple (RSQ), el error estándar de predicción (SEP) y el error estándar de predicción corregido (SEP(C)) (ver apartado Quimiometría).

Los valores predichos se comparan con los valores de referencia mediante un ANOVA de una vía (SPSS 13.0, Inc., Chicago, IL). La metodología NIRS proporciona valores medios significativamente iguales que los valores de referencia (p -valor siempre mayor de 0.05). Las diferencias entre los valores obtenidos mediante HPLC y los obtenidos con la técnica NIRS en validación externa generalmente son más pequeños en el caso de las uvas enteras que en hollejos, a excepción de los antocianos. La obtención de mejores resultados en el caso de uvas enteras podría atribuirse a una ausencia en la manipulación de la muestra.

En ambos casos, el contenido total de fenoles muestra buenos resultados y la determinación de flavonoles obtiene siempre las menores diferencias entre métodos.

Aunque se han llevado a cabo estudios en uvas enteras con la intención de determinar el contenido total de antocianos (20, 21), la concentración de antocianos extraíbles a pH 1 y 3.2 y los polifenoles totales mediante NIRS ninguno de ellos había realizado la determinación de las principales familias de compuestos fenólicos (flavanoles, flavonoles, ácidos fenólicos y antocianos). En el caso de los polifenoles

totales, Kemps *et al.*, no encontraron resultados satisfactorios (22). En lo que se refiere a los estudios realizados para antocianos en diferentes regiones y cultivares, los valores de SEP varían desde 0.05 hasta 0.18 mg/g de baya (20, 21). Considerando la relación hollejo/baya aproximadamente entre 0.2-0.25 podemos decir que en este caso los resultados son comparables con los obtenidos en estos estudios.

Tabla 6.4. Validación interna y externa de los modelos cuantitativos desarrollados mediante la tecnología NIRS en uvas enteras (mg/g de hollejo).

INTERNA	Compuestos	Antocianos	Ac. fenólicos	Flavanoles	Flavonoles	Total
	RPD	4.8	2.1	5.8	4.2	7.9
	RSQ	0.957	0.766	0.971	0.941	0.984
	SEP (mg/g)	0.53	0.08	0.35	0.08	0.59
EXTERNA	SEP(C) (mg/g)	0.53	0.08	0.35	0.08	0.59
	(%) Diferencia	43.9	27.3	27.8	7.8	11.7
	ANOVA (p-valor)	0.74	0.85	0.82	0.63	0.84
	SEP (mg/g)	1.09	0.13	0.72	0.12	1.26

RPD, capacidad de predicción del modelo; SEP, error estándar de predicción; SEP (C) error estándar de predicción corregido.

Tabla 6.5. Validación interna y externa de los modelos cuantitativos desarrollados mediante la tecnología NIRS en hollejos (mg/g de hollejo).

INTERNA	Compuestos	Antocianos	Ac. fenólicos	Flavanoles	Flavonoles	Total
	RPD	4.4	6.3	13.6	12.7	7.5
	RSQ	0.974	0.947	0.995	0.993	0.982
	SEP (mg/g)	0.36	0.04	0.16	0.02	0.62
EXTERNA	SEP(C) (mg/g)	0.36	0.04	0.16	0.03	0.62
	(%) Diferencia	17.5	29.5	31.9	10.7	14.7
	ANOVA (p-valor)	0.96	0.82	0.82	0.62	0.88
	SEP (mg/g)	0.81	0.11	0.68	0.15	1.3

RPD, capacidad de predicción del modelo; SEP, error estándar de predicción; SEP (C) error estándar de predicción corregido

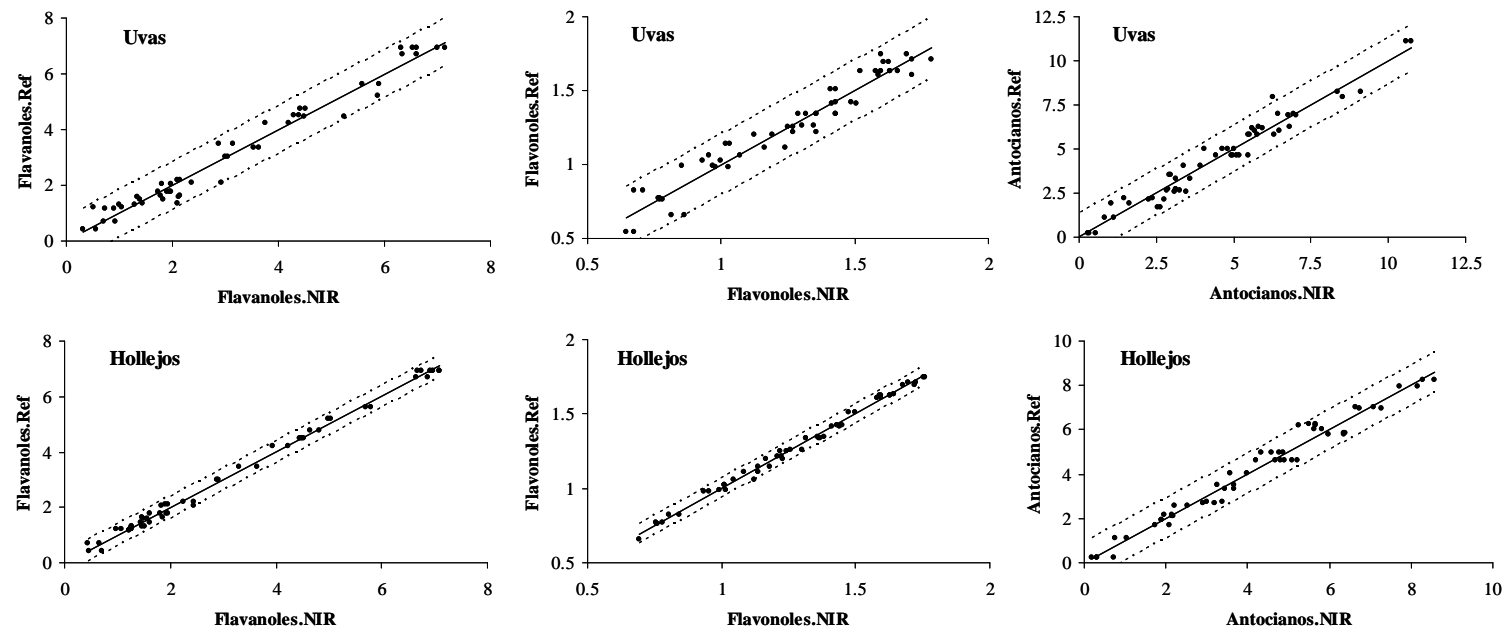


Figura 6.7. Comparación NIRS frente HPLC. Validación interna (mg/g de hollejo). *RSQ*: coeficiente de determinación; *SEP*, error estándar de predicción; *SEP (C)* error estándar de predicción corregido.

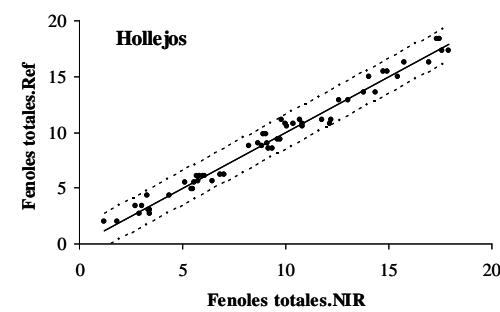
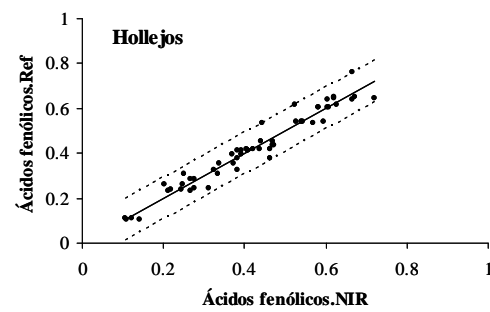
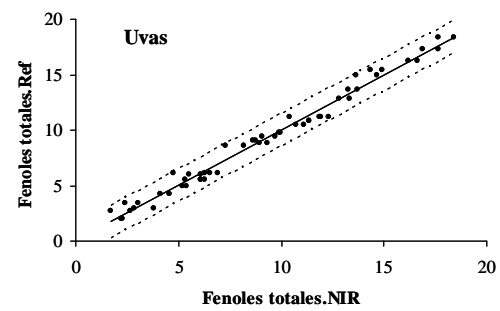
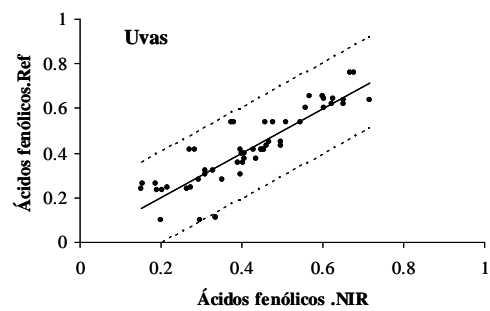


Figura 6.7. Validación interna (Continuación).

6.5) CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que los modelos desarrollados utilizando la tecnología NIRS junto con las herramientas quimiométricas adecuadas permiten la determinación de las principales familias de compuestos fenólicos y del contenido total de fenoles en uvas tintas. Hay que resaltar que dicha determinación se obtiene mediante una medida directa de las uvas enteras o de los hollejos. De forma general, los mejores resultados se obtienen utilizando la sonda de fibra óptica. Esta técnica es una buena opción para una determinación rápida, además es comparable con los métodos de análisis habituales utilizados con estos fines que precisan de mayor tiempo y son más caros. El desarrollo y aplicación de esta técnica podría llegar a ser una herramienta precisa y eficiente para dar soporte a decisiones en el momento de la cosecha de la uva.

No debemos olvidar que este estudio trata de una aproximación metodológica. En el desarrollo de este tipo de modelos debe hacerse un estudio completo con el fin de evaluar los factores implicados (áreas de producción, cultivares, etc.). Estas consideraciones dependerán del tipo de modelo a desarrollar, pueden realizarse desde modelos más sencillos a modelos más globales. En cualquiera de los casos, una vez desarrollados los modelos pueden ser ampliados.

Capítulo 7.

Determinación de procianidinas de semillas de uva mediante NIRS a lo largo de la maduración.

7.1) OBJETIVOS

El objetivo de este apartado es evaluar el potencial de la tecnología NIRS para la determinación de los principales compuestos fenólicos de las semillas. De ser posible, ello permitiría monitorizar los cambios en los principales compuestos fenólicos de las semillas durante la maduración de la uva.

7.2) JUSTIFICACIÓN

A pesar de representar solamente entre un 0-6% del peso de la uva, las semillas pueden ser una fuente importante de compuestos fenólicos en el vino tinto (69, 70). La composición fenólica de las semillas de uva depende de muchos factores, la variedad, las prácticas culturales, las condiciones ambientales, el grado de maduración y la insolación son algunos de los más importantes (71-74). La presencia y distribución de los flavanoles en la semilla de uva ha sido estudiada por varios autores (70, 75-79) coincidiendo en que normalmente los monómeros son los compuestos más abundantes. La (+)-catequina es a menudo el compuesto individual más cuantioso que se encuentra en las semillas, sin embargo, en algunas variedades existe un mayor contenido en (-)-epicatequina y en otras se pueden encontrar contenidos similares (80, 81).

Los oligómeros de proantocianidinas son principalmente dímeros y trímeros en los cuales las unidades elementales están habitualmente enlazadas mediante uniones interflavánicas tipo C4→C8. Dentro de dichos oligómeros, el dímero B2 y el trímero EEC son los compuestos que normalmente se encuentran en mayor concentración. Otra característica dentro de los flavanoles de las semillas es la presencia de esterificados con ácido gálico (77). La presencia de flavan-3-oles galoilados en las semillas de uva es evidente, aunque normalmente se encuentran en menor concentración que los no galoilados (78, 82). Los cambios en la composición flavánica de la semilla de uva que ocurren durante la maduración afectan a su intensidad tánica y su astringencia (83). El

seguimiento de estos cambios podría ser una herramienta muy útil e importante para tomar decisiones a cerca del momento óptimo de vendimia en cuanto a maduración fenólica se refiere. Para ello se requiere de métodos rápidos de análisis con una mínima o nula preparación de la muestra.

La espectroscopía del infrarrojo cercano es una técnica rápida, precisa, directa y no destructiva que permite análisis cuantitativos y cualitativos. Además reduce costes y no genera residuos. Por tanto esta herramienta junto con el análisis quimiométrico de los datos podría proporcionar una metodología alternativa para realizar el análisis de proantocianidinas en semillas de uva.

7.3) MATERIAL Y MÉTODOS

7.3.1 Análisis de referencia

Las muestras utilizadas han sido descritas anteriormente así como el método HPLC-DAD-MS utilizado (ver *capítulo 1*). Se determinan un total de 36 compuestos fenólicos de las semillas de uva. Los compuestos se agrupan teniendo en cuenta su grado de polimerización (desde monómeros hasta tetrámeros) y su galoilación. También se consideran para el desarrollo de los modelos algunos compuestos individuales.

7.3.2 Análisis NIRS semillas

Como ya se explicó en el capítulo anterior, las muestras se recogieron a lo largo de la maduración: desde envero (Septiembre) hasta sobremaduración (Noviembre). El estudio se ha realizado en dos años y en dos parcelas. Se recogieron un total de 84 muestras, de la cuales 39 corresponden al viñedo 1 y 45 al viñedo 2. Para llevar a cabo el análisis en el infrarrojo se usan alícuotas de semillas. Las muestras que se encuentran congeladas a -20°C son descongeladas y atemperadas en una habitación de temperatura controlada. Los espectros NIR se registraron utilizando un equipo Foss NIRSystem 5000 mediante una cubeta de cuarzo (*transport quartz cup*) descrita anteriormente.

Análisis quimiométrico. Aunque las técnicas quimiométricas utilizadas en este estudio han sido explicadas anteriormente con mayor detalle, para un mejor seguimiento

del trabajo se vuelve a explicar de forma muy resumida. Se trata de las mismas técnicas que fueron utilizadas para el estudio de hollejos y uvas enteras. Antes de realizar el análisis cuantitativo se realiza un pretratamiento espectral (SNV 2,4,4,1) y después se aplica un PCA. Este análisis no sólo nos proporciona información a cerca de los *outliers* espectrales y la distribución de las muestras en el espacio que crea sino que es una fuente importante de información para crear los grupos de validación cruzada en el proceso de calibración. Esta herramienta sirve también para saber qué muestras pertenecen o no al espacio espectral creado.

En este análisis cuantitativo, se usan algunos de los pretratamientos espectrales habituales en el desarrollo de estos modelos. Los efectos de dispersión de la luz o *scattering* son eliminados usando MSC, SNV y Detrend. También se ensayan varios tratamientos matemáticos para el desarrollo de los modelos de calibración. La notación utilizada es de 4 dígitos (a, b, c, d), siendo a , el orden de derivada, b , el número de puntos en los cuales se realiza la derivada, c el número de puntos en los cuales se realiza el primer suavizado y d , el número de puntos en los cuales se realiza el segundo suavizado.

Las calibraciones se llevan a cabo mediante un MPLS que normalmente resulta más estable y preciso que un PLS estándar. En todos los casos el PLS utilizado se trata de un PLS1 modificado. Para la validación cruzada, el conjunto de calibración se divide en varios grupos, entonces cada grupo es validado usando una calibración desarrollada con el resto de muestras. En este proceso se identifica otro tipo de *outlier*, los que presentan unos residuales altos cuando son predichos por el modelo (criterio T). Finalmente se obtienen los diferentes modelos (ver **Figura 6.3** esquema de obtención de modelos cuantitativos MPLS).

7.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.4.1 Análisis de referencia

En la **Tabla 7.1** se muestra el intervalo, la desviación estándar y el promedio de los contenidos de proantocianidinas de las semillas. Además, aparecen los compuestos individuales y los grupos de compuestos utilizados en el desarrollo de los modelos de NIRS.

Tabla 7.1. Contenido de flavanoles en mg/g de semilla seca.

	Mínimo	Máximo	Promedio	SD
Catequina C	1.46	12.27	5.07	3.17
Epicatequina EC	2.27	18.92	7.06	4.78
Dímero B1	0.64	1.30	0.84	0.15
Dímero B2	1.13	2.49	2.01	0.30
Dímero B3	0.50	1.27	0.79	0.18
Trímero EEC	0.98	2.26	1.49	0.36
Monómeros M	4.03	31.20	12.12	7.86
Dímeros D	4.12	5.30	4.76	0.31
Dímeros galoilados DG	2.35	9.11	4.51	1.86
Trímeros T	3.93	9.28	5.75	1.52
Trímeros galoilados TG	1.68	5.37	2.94	0.85
Tetrámeros TE	1.77	3.44	2.43	0.48
Total galoilados TTG	7.17	27.55	12.67	5.26
Totales TT	25.46	74.33	39.77	13.14

SD: Desviación estándar (n=84).

7.4.2 Análisis cuantitativo

En el marco del análisis cuantitativo se aplica un pretratamiento espectral (SNV 2,4,4,1) al conjunto de los datos espectrales registrados y se lleva a cabo un PCA. La variabilidad espectral explicada es de un 98.8% requiriendo 6 componentes principales para explicar dicha variabilidad. La detección de *outliers* espectrales o espectros fuera de la población se lleva a cabo utilizando la distancia de Mahalanobis (H), mediante la

cual se establece la diferencia espectral de una muestra respecto a la media espectral del conjunto de muestras. Indica cuán diferente es el espectro de la muestra desconocida con respecto al espectro de la media del conjunto de calibración. Se toma como valor límite $H = 3.0$, de forma que aquellos espectros cuya distancia H es superior a 3.0 se desechan, ya que aquellas que no cumplan dicho criterio se considera que no pertenecen al conjunto y por tanto no se usan para la generación del modelo (84). En este caso y bajo este criterio se eliminan 3 muestras. Al igual que se indicó en el caso de hollejos y uvas, las muestras restantes sirven para generar grupos de validación cruzada homogéneos que se utilizan en la fase de validación cruzada al generar los modelos cuantitativos. El riesgo de errores en las ecuaciones es muy bajo o casi nulo cuando se emplea este estándar (H-estadística) en el análisis rutinario de muestras desconocidas.

En la **Figura 7.1** se muestra el espectro medio y la desviación estándar espectral en la zona del infrarrojo cercano utilizando una cubeta de cuarzo.

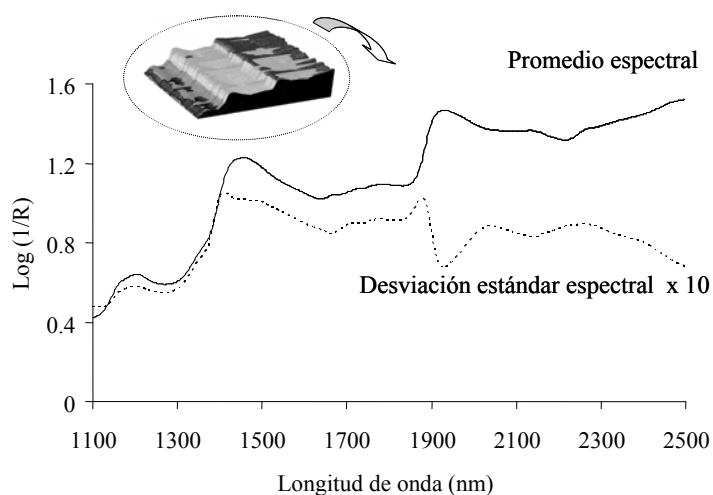


Figura 7.1. Promedio y desviación estándar de los espectros registrados en la zona del infrarrojo cercano (1100-2498 nm).

En la **Figura 7.2** se observan las puntuaciones de las semillas de uva en el espacio definido por las tres primeras componentes principales (PC 1, PC 2 y PC 3). Este gráfico permite la diferenciación entre los años 2008 y 2009. Sin embargo, visualizar estas diferencias cuando se trata de distinguir entre los viñedos es más complicado. Además, el gráfico muestra que se ha tenido en cuenta una amplia variabilidad espectral en el desarrollo de los modelos NIR, ya que ocupan una parte importante del espacio espectral. Obviamente, las diferencias entre los viñedos elegidos, los diferentes años estudiados y el período de maduración son una importante fuente de dicha variabilidad.

Después de haber eliminado las muestras bajo el criterio H, se prueban diferentes pretratamientos espectrales (20 para cada compuesto) y se utilizan los correspondientes valores de flavanoles (HPLC) de cada muestra para realizar la calibración mediante MPLS. En este análisis, el conjunto de muestras de calibración se divide en una serie de subgrupos para realizar la validación cruzada, establecer el número de factores PLS y eliminar los *outliers* químicos. En el procedimiento de generación de los modelos se utiliza el criterio T, de forma que aquellas muestras cuyo residual (diferencia entre el valor de referencia y el predicho) dividido por el SECV (error estándar de validación cruzada) del proceso supera el valor de 2.5 es eliminada del conjunto de calibración.

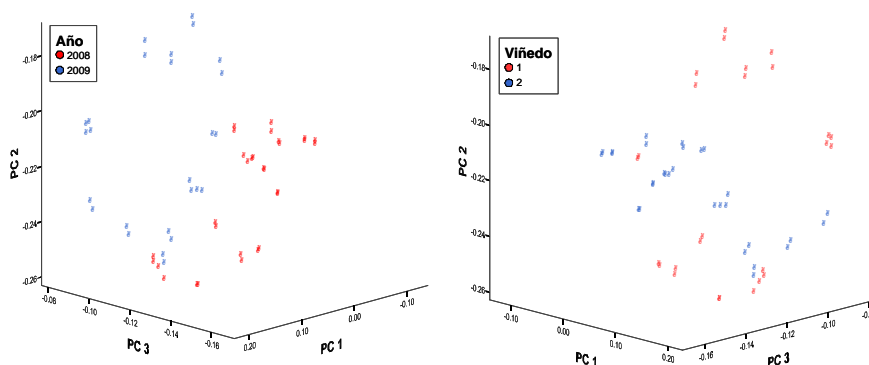


Figura 7.2. Puntuaciones de las semillas de uva en el espacio definido por PC1 (87.6%), PC2 (6.0%) y PC3 (3.5%).

En la **Tabla 7.2** se muestran los descriptores estadísticos de calibración para los modelos NIR. Siendo N el número de muestras utilizadas en cada caso, previa eliminación de los *outliers* espectrales (criterio H) y de los *outliers* con altos residuales (criterio T). También se muestra el pretratamiento espectral más adecuado para cada compuesto o familia de compuestos, así como la desviación estándar y el intervalo de concentraciones.

En la **Figura 7.3** se muestran, a modo de ejemplo, los *loadings* correspondientes a los compuestos fenólicos totales de las semillas. Las regiones cercanas a 1150 nm, 1400 nm, 1650 nm 1920 nm y 2280 nm muestran importantes contribuciones en los *loadings*. Estas podrían estar relacionadas con el primer y segundo sobretono de los enlaces aromáticos C-H (1650 y 1150 nm respectivamente), con el primer y segundo sobretono de los grupos funcionales alcohol O-H (2280 y 1400 nm respectivamente) y con el segundo sobretono de los enlaces C=O presentes en los ácidos carboxílicos COOH y en los grupos funcionales éster COOR (1920 nm) (67, 68).

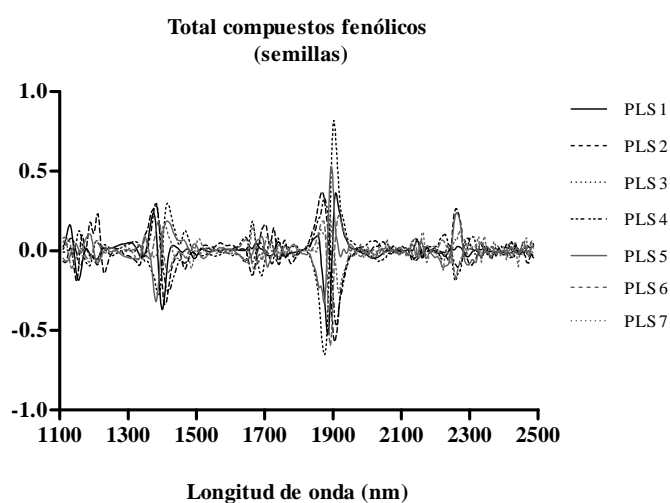


Figura 7.3. Loadings de los compuestos fenólicos totales de las semillas.

Tabla 7.2. Descriptores estadísticos para los modelos NIR desarrollados para las semillas.

Pre-tratamiento	Compuestos	N	Factores	Promedio	SD	Mínimo	Máximo	SEC	RSQ	SECV	CV
espectral			PLS	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)	(mg/g)		(mg/g)	(%)
None 2,8,6,1	C	50	7	4.83	2.86	0.00	13.40	0.40	0.980	0.66	8.3
Standard MSC 2,8,6,1	EC	49	7	6.49	4.05	0.00	18.65	0.41	0.990	0.73	6.4
Detrend 2,8,6,1	B1	51	7	0.84	0.15	0.40	1.28	0.03	0.960	0.05	3.5
SNV 2,10,10,1	B2	50	7	2.04	0.28	1.21	2.88	0.11	0.853	0.17	5.2
Standard MSC 2,8,6,1	B3	50	7	0.76	0.14	0.33	1.19	0.06	0.853	0.09	7.3
Detrend 1,4,4,1	EEC	53	7	1.48	0.35	0.44	2.52	0.08	0.947	0.18	5.4
Detrend 2,8,6,1	M	51	7	11.84	7.33	0.00	33.82	0.86	0.986	1.28	7.2
None 1,4,4,1	D	51	7	4.76	0.30	3.87	5.65	0.13	0.823	0.18	2.6
Detrend 2,8,6,1	DG	50	7	4.34	1.59	0.00	9.12	0.18	0.988	0.29	4.1
SNV 2,4,4,1	T	52	7	5.75	1.52	1.20	10.30	0.32	0.956	0.79	5.5
Standard MSC 2,8,6,1	TG	48	7	2.93	0.72	0.77	5.09	0.13	0.966	0.23	4.5
SNV 2,4,4,1	TE	52	6	2.45	0.48	1.02	3.89	0.11	0.947	0.27	4.5
Detrend 1,4,4,1	TTG	49	5	12.04	4.53	0.00	25.63	1.16	0.935	1.78	9.6
Detrend 1,4,4,1	TT	51	7	39.84	12.62	1.99	77.69	1.42	0.987	3.27	3.6

SD: desviación estándar; SEC: error estándar de calibración; RSQ: coeficiente de determinación SECV: error estándar de validación cruzada; CV (%): coeficiente de variación (SEC/Promedio) x 100.

Con el objetivo de evaluar los modelos desarrollados se llevó a cabo una validación interna (**Tabla 7.3**) usando muestras que pertenecían al conjunto de calibración después de haber eliminado los *outliers*. Mediante el parámetro RPD se evaluó la capacidad de predicción del modelo que se define como la relación entre la desviación estándar de los datos obtenidos con el método de referencia y el error estándar de predicción de los mismos. Este parámetro debe ser idealmente superior a 2.5 y en todos los modelos desarrollados se da valores mayores a 2.5 por lo que estos modelos presentan una adecuada capacidad de predicción (53).

Para comprobar la robustez del modelo de calibración se realizó una validación externa (**Tabla 7.3** y **Figura 7.4**), aplicando las ecuaciones a un conjunto de muestras que no pertenecen al colectivo de calibración. Los valores predichos mediante las ecuaciones de calibración obtenidas fueron comparados con los del método de referencia. Los datos de los contenidos en flavanoles obtenidos por ambos métodos se compararon mediante un análisis ANOVA de una vía. Así, se pudo determinar que el método de referencia (HPLC) y la espectroscopía NIR proporcionan, con un nivel de confianza del 95%, datos medios significativamente iguales.

De forma general, las diferencias obtenidas en validación externa entre el método de referencia y la tecnología NIR son bastante pequeñas. Las menores diferencias se obtuvieron para las procianidinas dímeras (3.5%). Los compuestos dímeros galoilados, de relevancia desde el punto de vista de la astringencia de las semillas de uva (83), también presentaron buenos resultados (7.4%). En cuanto al valor que se obtiene para los flavanoles totales (9.4%), es bastante satisfactorio. Hay que destacar la importancia de este dato puesto que el contenido de flavanoles totales da una idea fenólica global del estado de la semilla.

Tabla 7.3. Validación interna y externa de los modelos cuantitativos desarrollados mediante la tecnología NIRS.

Compuestos	Validación Interna				Validación Externa		
	RPD	RSQ	SEP (mg/g)	SEP (C) (mg/g)	(%) Diferencia	ANOVA (p-valor)	SEP (mg/g)
C	7.7	0.983	0.37	0.37	12.8	0.91	0.66
EC	10.7	0.991	0.38	0.38	11.4	0.84	1.04
B1	5.4	0.966	0.03	0.03	4.8	0.92	0.06
B2	2.8	0.874	0.10	0.10	7.4	0.61	0.20
B3	2.8	0.874	0.05	0.05	8.3	0.48	0.12
EEC	4.7	0.988	0.79	0.79	9.9	0.11	0.21
M	9.3	0.954	0.07	0.08	12.6	0.95	1.37
D	2.6	0.848	0.12	0.12	3.5	0.63	0.28
DG	9.9	0.99	0.16	0.16	7.4	0.94	0.51
T	5.2	0.962	0.29	0.29	10.6	0.21	0.82
TG	6.0	0.971	0.12	0.12	11.2	0.87	0.51
TE	4.7	0.953	0.10	0.10	10.2	0.88	0.37
TTG	4.2	0.941	1.09	1.10	14.3	0.68	2.43
TT	9.6	0.989	1.31	1.32	9.4	0.94	4.86

RPD, capacidad de predicción del modelo; SEP, error estándar de predicción; SEP (C) error estándar de predicción corregido.

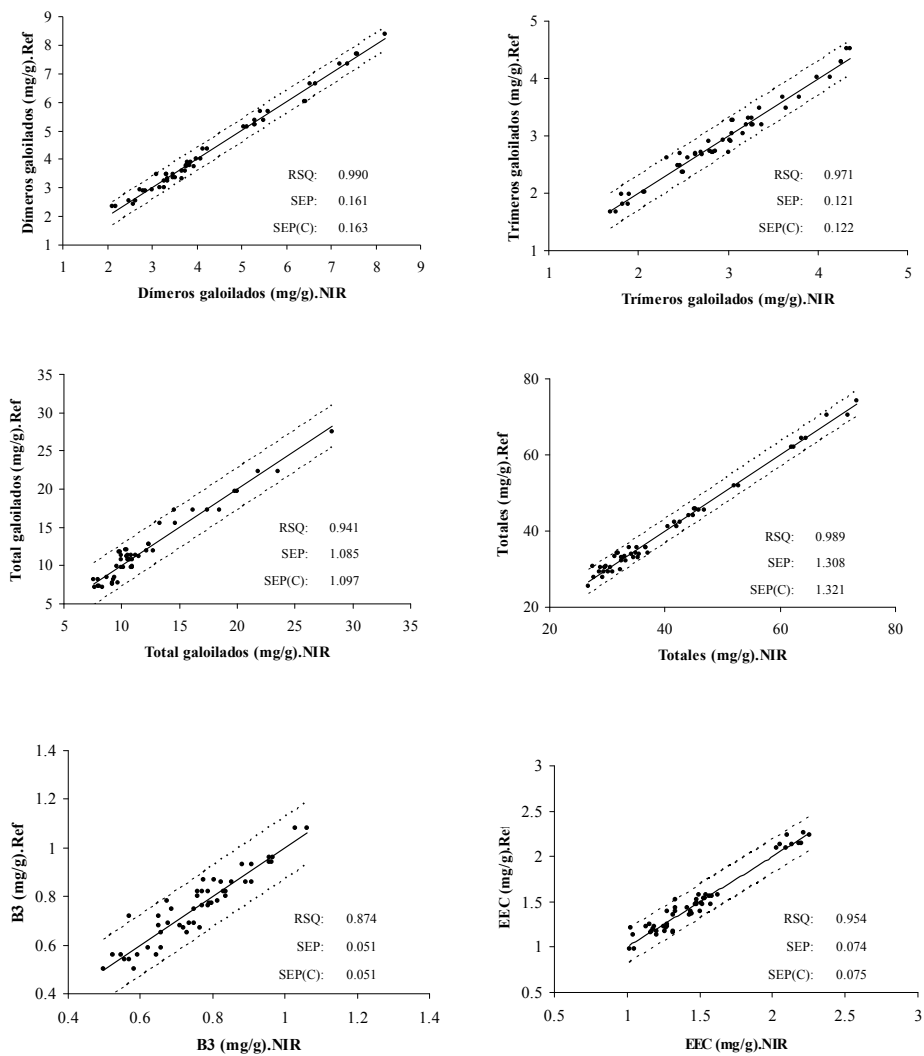


Figura 7.4. Comparación de los valores de referencia con los valores predichos por el modelo MPLS en NIR para la determinación de proantocianidinas en semillas de uva. Validación interna.

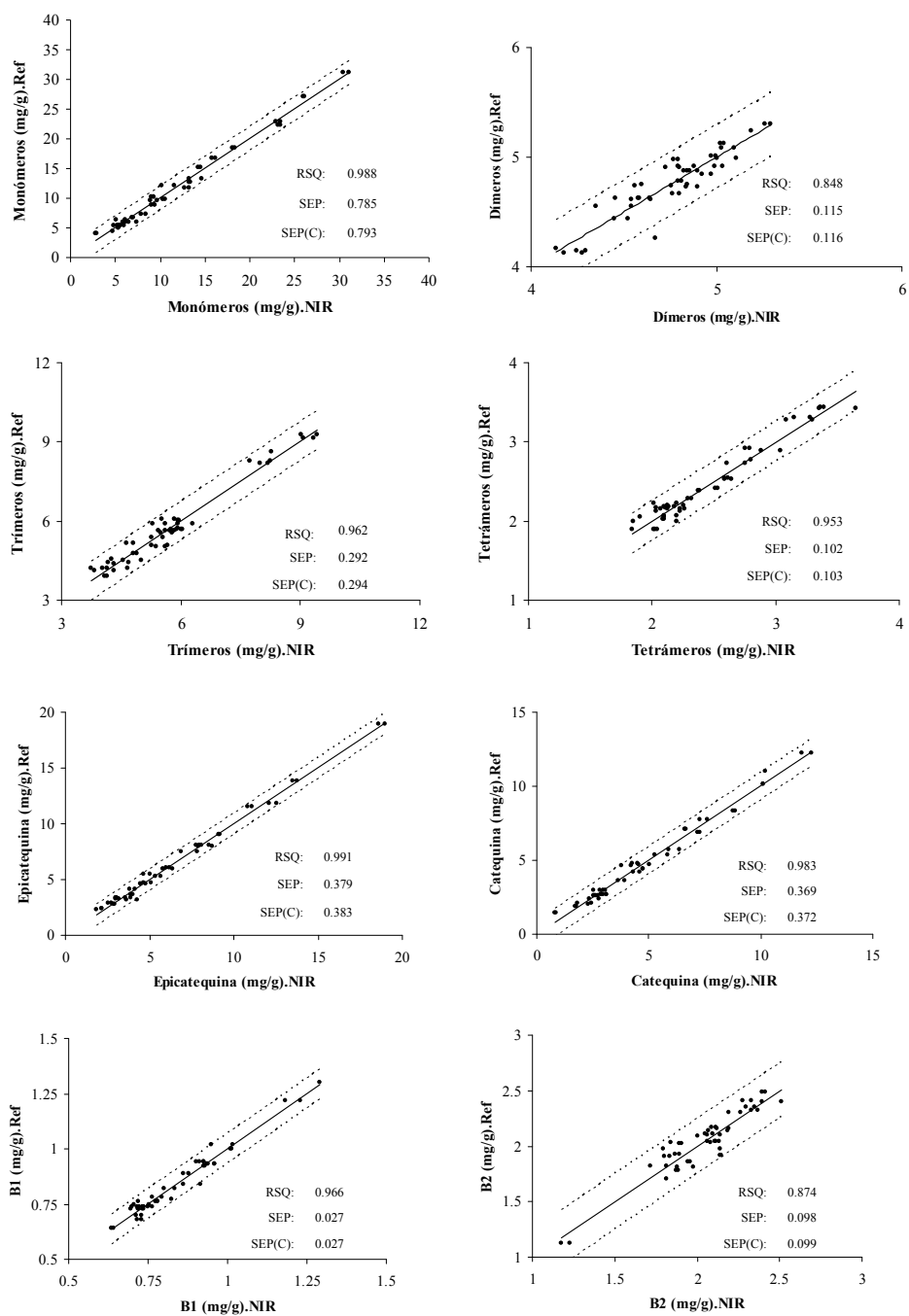


Figura 7.4. Validación interna (Continuación).

7.5) CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que los modelos desarrollados mediante la tecnología NIRS junto con las herramientas quimiométricas adecuadas permiten determinar el contenido de los principales flavanoles de las semillas así como sus familias más representativas (monómeros, oligómeros, galoilados). Hay que resaltar que esta determinación se puede realizar midiendo directamente las semillas de uva y en cualquier momento del período de maduración. La espectroscopía NIR puede llegar a ser una alternativa a los métodos tradicionales para la cuantificación de estos compuestos. Cabe resaltar que habitualmente en bodega no se realiza un análisis específico para la determinación detallada de las procianidinas de las semillas. Sin embargo puede resultar una herramienta útil en la toma de decisiones. En este trabajo se pone de manifiesto el excelente potencial que tiene esta tecnología para dicho fin, siendo un método, rápido y preciso.

Hay que señalar, que los modelos desarrollados son aproximaciones metodológicas. Para la aplicación de rutina en bodega se necesitaría recoger la casuística de la misma. Por último, también señalar que en este tipo de estudios de aplicabilidad de una técnica a una determinada matriz y analitos, es frecuente que el número de muestras empleadas no sea muy elevado, sobre todo la primera vez que se describe.

Capítulo 8.

Estudio comparativo de la tecnología NIRS para localizar el viñedo de origen utilizando uvas enteras, semillas y hollejos.

8.1) OBJETIVOS

Se desea comprobar el potencial de la espectroscopía de infrarrojo cercano para llevar a cabo un análisis cualitativo y que esta técnica además de utilizarse con fines cuantitativos puede ser aprovechada para realizar clasificaciones. En este caso en concreto, se quiere utilizar para determinar la parcela de procedencia de las uvas. Además, se desea llevar a cabo la comparación de los resultados cuando el registro de los espectros se realiza en tres matrices distintas (uvas enteras, hollejos y semillas).

8.2) JUSTIFICACIÓN

La trazabilidad de los alimentos proporciona una información precisa y específica sobre sus procesos de elaboración, mitigando riesgos y facilitando la toma de decisiones. En un sector como el del vino, en el que existen diferentes clasificaciones territoriales (indicaciones geográficas, denominaciones de origen, etc.) puede resultar de gran interés conocer el origen de las uvas con las que se elaboran los vinos amparados bajo dichas denominaciones. Consideramos que la identificación del viñedo es uno de los pasos primordiales dentro del proceso de trazabilidad del vino. La premura con la que en ocasiones deben de tomarse decisiones en la bodega crea la necesidad de disponer de métodos rápidos y con una mínima preparación de la muestra que den información sobre la procedencia de la materia prima. La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIRS) asociada a los modelos de calibración y clasificación multivariante es comúnmente utilizada para llevar a cabo análisis cualitativos y por tanto podría ser una buena herramienta para este fin.

8.3) MATERIAL Y MÉTODOS

8.3.1 Análisis NIRS

Se realiza el registro de espectros para semillas y hollejos con una cubeta (*Transport quartz cup*) y con una sonda de fibra óptica en el caso de las uvas enteras. Las muestras registradas están explicadas con detalle en el apartado de análisis cuantitativo y son las mismas que se han utilizado en los capítulos anteriores.

8.3.2 Análisis quimiométrico

En este análisis cualitativo se aplica el método de reconocimiento de pautas prefijadas DPLS. Se trata de una técnica lineal y paramétrica que permite el modelado y la discriminación de clases. La calibración se realiza mediante una regresión de la información espectral de todos los valores del grupo, en este caso definidos como 1 ó 2. El método de regresión aplicado en este procedimiento es un MPLS, más concretamente un PLS1 modificado ya que la regresión sólo se realiza sobre una variable *dummy* con dos posibles valores, como se ha indicado anteriormente.

8.4) RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.4.1 Análisis cualitativo

Para llevar a cabo modelados de grupos, es frecuente utilizar el modelo algebraico DPLS. Para su diseño se utilizan los datos espectrales del NIR sin ningún y una variable *dummy*, cuyos valores son 1 y 2. En nuestro estudio, para obtener los modelos se utiliza la información espectral NIR de todas las muestras que constituyen el conjunto de entrenamiento, sin pretratamiento. En este caso no se realiza ningún pretratamiento (ver apartado III.4.1) debido a que la dispersión de la luz (*scattering*) asociada a las características físicas de las muestras (morfología, tamaño, aspecto, redondez, longitud) puede aportar información de interés para realizar la clasificación de las mismas. Para una mejor comprensión, en la **Figura 8.1** se presenta de forma esquemática la construcción del modelo de discriminación DPLS. De las tres muestras recogidas en

cada punto de vendimia, una es destinada para el conjunto de validación (33%) y las otras dos para el conjunto de calibración (66%).

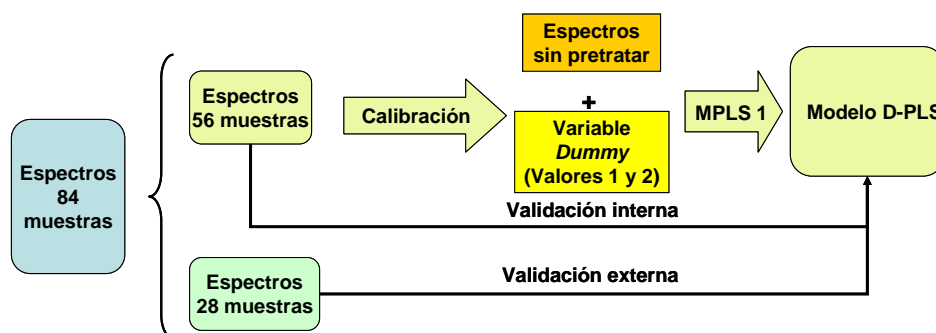


Figura 8.1. Construcción del modelo DPLS utilizado.

En la **Tabla 8.1** se muestran los descriptores de mayor interés de los modelos desarrollados en cada caso (semillas, uvas y hollejos).

Tabla 8.1. Descriptores de los modelos cualitativos.

	Factores PLS	Grupos de validación cruzada	RSQ	SEC	SECV
Semillas	11	6	0.718	0.27	0.33
Uvas	9	6	0.647	0.30	0.33
Hollejos	2	6	0.217	0.45	0.44

Las regiones espectrales comprendidas entre 1100-1358 nm y 1800-2100 nm mostraron una contribución importante en los *loadings* del modelo desarrollado para las semillas, estas bandas están principalmente relacionadas con el segundo sobretono de los enlaces C-H y con el segundo sobretono de las uniones presentes en los grupos COOH, respectivamente. En el caso de las uvas, las regiones espectrales comprendidas entre 1100-1552 nm, 1274-1600 nm y 1856-2000 nm fueron las que presentaron mayores contribuciones al modelo. Para los ensayos con hollejos, las regiones

espectrales más importantes fueron las comprendidas entre 1140-1250 nm, 1370-1500 nm, 1800-1955 nm. La primera región espectral y la tercera de las uvas y los hollejos coinciden con las regiones espectrales mencionadas para el caso de las semillas. La segunda región espectral en uvas y hollejos son cercanas entre ellas y corresponden a bandas de combinación de los enlaces C-H aromáticos y a su primer sobretono (67, 68).

Para la validación interna se emplean las mismas muestras que se han utilizado para generar el modelo. Con los modelos DPLS desarrollados se predice el valor de cada variable *dummy* en cada caso y para cada una de las muestras. Después las muestras se distribuyen según su valor de predicción ± 0.5 siendo en este caso 1.5 el valor de corte de pertenencia a una u otra clase.

En la **Tabla 8.2** se muestran los porcentajes de las muestras que son correctamente clasificadas para cada viñedo, tanto en validación interna como en validación externa. Los peores resultados se obtienen cuando la medición es realizada sobre los hollejos, si además se tiene en cuenta que esta matriz requiere de una mayor preparación de la muestra (separación de los hollejos de la pulpa) podemos concluir que se trata de la peor opción. Los datos obtenidos para uvas presentan un 93% de muestras clasificadas correctamente en validación interna y un 83% en externa. Estos resultados son todavía más importantes si recordamos que la medición se realiza directamente en las uvas. Sin embargo hay que resaltar los elevados porcentajes obtenidos en el modelo desarrollado para las semillas (95% validación interna y 97% en externa). Por lo tanto esta matriz podría ser la más adecuada para realizar un análisis NIR clasificatorio de la parcela de procedencia. La separación de las semillas de las uvas es un pequeño inconveniente pero hay que tener en cuenta que el número de semillas que se necesita para llevar a cabo la medición es pequeño. Además su separación de la pulpa es mucho menos tediosa que en el caso de los hollejos. Los mejores resultados obtenidos en el caso de las semillas posiblemente estén condicionados por una mayor homogeneidad de la matriz y un menor efecto de dispersión de la luz.

Tabla 8.2. Muestras correctamente clasificadas en cada modelo.

	Uvas (9 factores)		Hollejos (2 factores)		Semillas (11 factores)	
	Viñedo 1	Viñedo 2	Viñedo 1	Viñedo 2	Viñedo 1	Viñedo 2
Interna	24/26	28/30	16/26	21/30	24/26	29/30
%	92	93	62	70	92	97
Total interna	93 %		66 %		95 %	
Externa	11/13	12/15	8/13	11/15	13/13	14/15
%	85	80	62	73	100	93
Total externa	83 %		68 %		97 %	

En la **Figura 8.2** se puede apreciar de forma visual la distribución de las muestras en validación interna y externa. Se observa que la mayoría de las muestras correspondientes al viñedo 1 están situadas en valores *dummy* por debajo del valor de corte 1.5, mientras que la mayor parte de las pertenecientes al viñedo 2 se sitúan por encima del valor de corte. En el caso de los hollejos un alto número de muestras que no están correctamente clasificadas se encuentran en valores muy cercanos a 1.5.

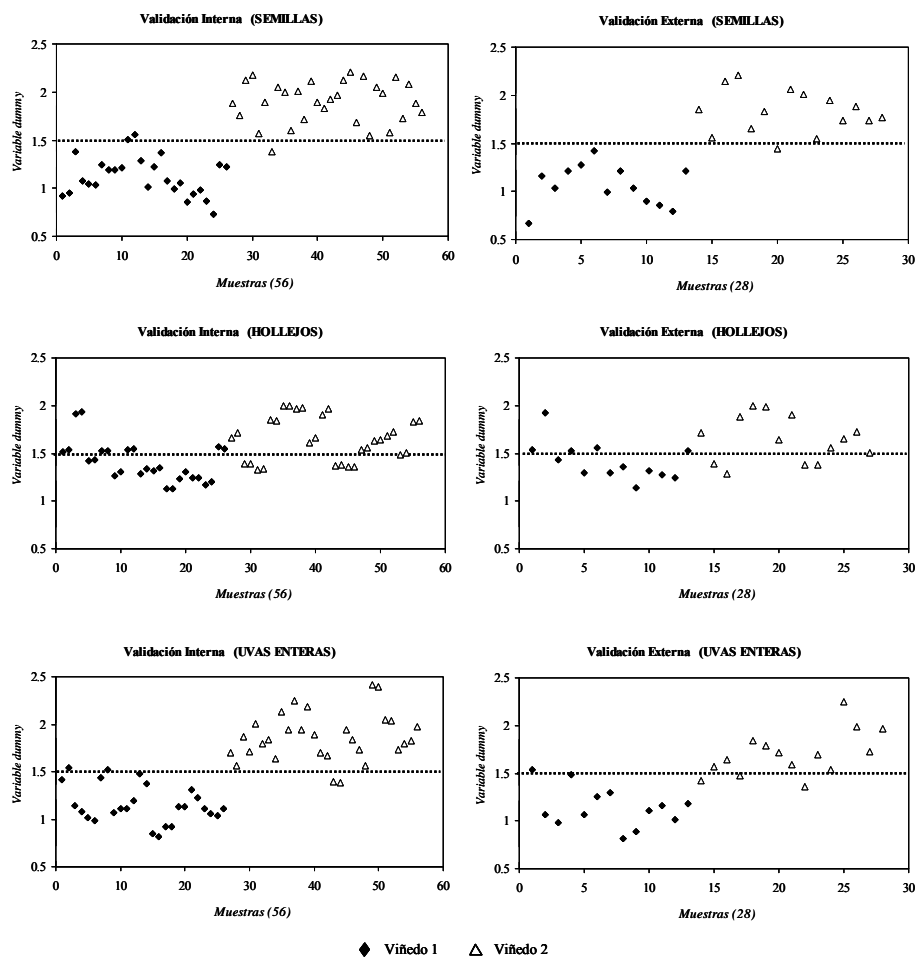
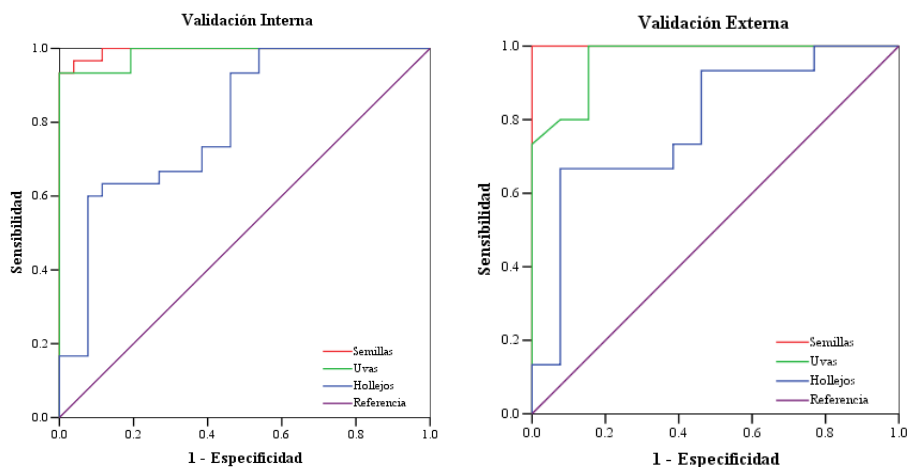


Figura 8.2. Representación de los valores de la variable dummy en semillas, hollejos y uvas enteras. Validación interna y externa mediante el modelo DPLS.

En la **Figura 8.3** se representa la curva de ROC (Receiver Operating Characteristic). Se trata de una representación gráfica para un sistema clasificador binario que ayuda a seleccionar modelos óptimos. El indicador más utilizado en esta representación es el área bajo la curva. En ambos casos, validación interna y externa, el área más grande bajo la curva corresponde a las semillas indicando nuevamente que se trata de la matriz más adecuada con estos fines clasificatorios.



ÁREAS BAJO LA CURVA

	VALIDACIÓN INTERNA	VALIDACIÓN EXTERNA
Semillas	0.995	1.000
Uvas	0.987	0.967
Hollejos	0.800	0.790

Figura 8.3. Representación gráfica de la curva de ROC y áreas bajo la curva en los tres casos estudiados.

Por otro lado se ha realizado un análisis de componentes principales (PCA), en este caso sin pretratamiento, así se utilizan los datos espectrales tal y como se han utilizado en el modelo DPLS. Con objeto de estudiar qué parte de la variabilidad espectral, está relacionada con los contenidos de los compuestos fenólicos de las uvas, hollejos y semillas se realiza un estudio de correlaciones entre las puntuaciones de la primera componente principal de dicho análisis (la cual explica la mayor variabilidad espectral) y los compuestos o familias de compuestos fenólicos, según cada caso. En la **Figura 8.4** se representa de manera esquemática la construcción del análisis de componentes principales y la correlación de la primera componente principal con los compuestos fenólicos.

En el caso de las semillas las puntuaciones del PC1 que explica un 92.4 % de la variabilidad espectral muestra una correlación significativa (0.01, 2-colas) con el 88%

de los compuestos estudiados. Además los *loadings* de esta componente principal muestran una alta contribución en la región espectral comprendida entre 1406-1874 nm atribuida a enlaces presentes en estos compuestos.

En el caso de los hollejos un 75.3 % de la variabilidad espectral queda explicada bajo la primera componente principal. Las puntuaciones de este PC1 muestran correlaciones significativas al 99% con los antocianos y los compuestos fenólicos totales (0.01, 2-colas) y al 95% con los flavonoles y los ácidos fenólicos (0.05, 2-colas). En el PCA del ensayo de uvas enteras la primera componente explica un 86.5 % de la variabilidad espectral y sus puntuaciones están correlacionadas al 99% con los antocianos, los flavanoles y los polifenoles totales (0.01, 2-colas) y al 95% con los flavonoles (0.05, 2-colas).

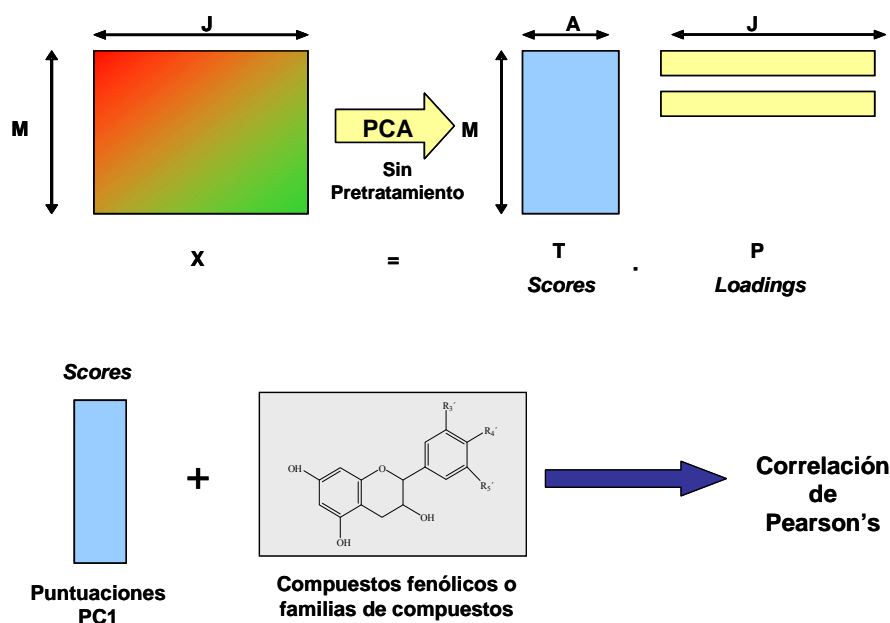


Figura 8.4. Esquema de la construcción del PCA y de las correlaciones entre las puntuaciones de la primera componente principal y los compuestos estudiados.

En uvas y hollejos, los *loadings* de la primera componente principal muestran una alta contribución en las regiones espectrales comprendidas entre 1100-1300, 1380-1540, 1850-2110 nm atribuidas a grupos funcionales presentes en estos compuestos. Estas regiones espectrales mencionadas para los *loadings* de la primera componente principal también resultan ser muy importantes en el primer factor usado en los modelos DPLS.

8.5) CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio indican que la tecnología NIRS tiene un excelente potencial para dar información a cerca de la procedencia de las uvas de manera rápida y a un coste razonable.

El estudio comparativo entre uvas enteras, hollejos y semillas muestra que estas últimas son la mejor matriz para llevar a cabo la clasificación de una muestra entre un viñedo u otro. Es importante resaltar que la clasificación puede realizarse en cualquier momento de la maduración de la uva.

No obstante se trata de un estudio de viabilidad y para su aplicabilidad debe recogerse la casuística necesaria (áreas de producción, cultivares, añadas, etc).

BIBLIOGRAFÍA

1. Herschel, W., Experiments on the refrangibility of the invisible rays of the sun. *Philosophical Transactions of the Royal Society.*, **1800**. 90: p. 284
2. Ben-Gera, I. and K.H. Norris, Direct Spectrophotometric Determination of Fat and Moisture in Meat Products. *Journal of Food Science*, **1968**. 33(1): p. 64-67.
3. Draper, N. and H. Smith, Applied regression analysis. 1966, New York, USA. : John Wiley.
4. Savitzky, A. and M.J.E. Golay, Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Analytical Chemistry*, **1964**. 36(8): p. 1627-1639.
5. Snedecor, G.W. and W.G. Cochran, Statistical methods. 6th ed. Validation of regression models: Methods and examples. *Technometrics*, **1968**. 19: p. 415
6. Osborne, B.G. and T. Fearn, Near infrared spectroscopy in food analysis; (2^a Ed.). 1986, Harlow, England: Longman Scientific & Technical.
7. McGoverin, C.M., et al., Review: The application of near infrared spectroscopy to the measurement of bioactive compounds in food commodities. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **2010**. 18(2): p. 87-111.
8. Whitacre, E., et al., Predictive analysis of cocoa procyanidins using near-infrared spectroscopy techniques. *Journal of Food Science*, **2003**. 68(9): p. 2618-2622.
9. Chen, Q., et al., Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2008**. 46(3): p. 568-573.
10. Lopez-Sánchez, M., M.J. Ayora-Cañada, and A. Molina-Díaz, Olive Fruit Growth and Ripening as Seen by Vibrational Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**. 58(1): p. 82-87.
11. Cozzolino, D., et al., Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, **2004**. 513(1): p. 73-80.
12. Jensen, J.S., M. Egebo, and A.S. Meyer, Identification of Spectral Regions for the Quantification of Red Wine Tannins with Fourier Transform Mid-Infrared Spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**. 56(10): p. 3493-3499.
13. Cozzolino, D., et al., Analysis of elements in wine using near infrared spectroscopy and partial least squares regression. *Talanta*, **2008**. 74(4): p. 711-716.
14. Moreira, J.L. and L. Santos, Analysis of organic acids in wines by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2005**. 382(2): p. 421-425.
15. Boulet, J.C., P. Williams, and T. Doco, A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, **2007**. 69(1): p. 79-85.

16. Fernandez-Novales, J., et al., Shortwave-near infrared spectroscopy for determination of reducing sugar content during grape ripening, winemaking, and aging of white and red wines. *Food Research International*, **2009**. 42(2): p. 285-291.
17. Smyth, H.E., et al., Near infrared spectroscopy as a rapid tool to measure volatile aroma compounds in Riesling wine: possibilities and limits. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2008**. 390(7): p. 1911-1916.
18. Cozzolino, D., et al., Measurement of condensed tannins and dry matter in red grape homogenates using near infrared spectroscopy and partial least squares. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2008**. 56(17): p. 7631-7636.
19. Versari, A., et al., Determination of grape quality at harvest using Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2008**. 59(3): p. 317-322.
20. Cozzolino, D., et al., Review: Analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **2006**. 14(5): p. 279-289.
21. Cozzolino, D., et al., Prediction of colour and pH in grapes using a diode array spectrophotometer (400-1100 nm). *Journal of near Infrared Spectroscopy*, **2004**. 12(2): p. 105-111.
22. Kemps, B., et al., Assessment of the quality parameters in grapes using VIS/NIR spectroscopy. *Biosystems Engineering*, **2010**. 105(4): p. 507-513.
23. Passos, C.P., et al., 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(2): p. 143-149.
24. Tarantilis, P.A., et al., Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food Chemistry*, **2008**. 111(1): p. 192-196.
25. Cozzolino, D., et al., Mid infrared spectroscopy and multivariate analysis: A tool to discriminate between organic and non-organic wines grown in Australia. *Food Chemistry*, **2009**. 116(3): p. 761-765.
26. Urtubia, A., et al., Exploring the applicability of MIR spectroscopy to detect early indications of wine fermentation problems. *Food Control*, **2008**. 19(4): p. 382-388.
27. Bevin, C.J., et al., Varietal discrimination of Australian wines by means of mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*, **2008**. 621(1): p. 19-23.
28. Herrera, J., A. Guesalaga, and E. Agosin, Shortwave-near infrared spectroscopy for non-destructive determination of maturity of wine grapes. *Measurement Science & Technology*, **2003**. 14(5): p. 689-697.
29. Le Moigne, M., et al., Sensory and instrumental characterisation of Cabernet Franc grapes according to ripening stages and growing location. *Food Quality and Preference*, **2008**. 19(2): p. 220-231.

-
30. Cozzolino, D., H.E. Smyth, and M. Gishen, Feasibility study on the use of visible and near-infrared Spectroscopy together with chemometrics to discriminate between commercial white wines of different varietal origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(26): p. 7703-7708.
 31. Liu, L., et al., Geographic classification of Spanish and Australian tempranillo red wines by visible and near-infrared spectroscopy combined with multivariate analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(18): p. 6754-6759.
 32. Beynon, J., *Waves and optics*, ed. M.C. Work. 1990, Basingstoke, England
 33. Kulbelka, P. and F. Munk, Ein beitrage zur optik der furbanstride. *Zeitschrift für Technische Physik*, **1931**. 12: p. 593.
 34. Murray, I., *Scattered information: philosophy and practice of near infrared spectroscopy*. 2004, Chichester, England: Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference. NIR Publications.
 35. Blanco, M. and I. Villarroya, NIR spectroscopy: a rapid-response analytical tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **2002**. 21(4): p. 240-250.
 36. Stark, E. and K. Luchter, Diversity in NIR instrumentation. 2004, Chichester, England.: Near Infrared Spectroscopy: Proceedings of the 11th International Conference.
 37. Your NIRSystems instruments performance test guide. . Foss NIRSystems ed. S.S. Inc. 1999, MD,USA.
 38. WinISI, I., *Infrasoft International, LLC*, P. Matilda, Editor. 2000: PA, USA.
 39. Massart, D.L., et al., *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A*. Amsterdam, The Netherlands ed. Elsevier. 1997.
 40. Brereton, R.G., *Chemometrics : data analysis for the laboratory and chemical plant*. 2003, Chichester, West Sussex, England: J. Wiley. 489.
 41. Vandeginste, B.G.M., et al., *Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part B*. Amsterdam, The Netherlands ed. Elsevier. 1998.
 42. Martens, H., S.A. Jensen, and P. Geladi, Multivariate linearity transformation for near infrared reflectance spectra of meat. *Nordic Symposium on Applied Statistics*. 1983, Stavanger, Norway
 43. Williams, P.C., *Variables affecting near infrared reflectance spectroscopic analysis*, in *Near infrared technology in the agricultural and food industries*, A.A.o.C. Chemists, Editor. 1987: Minnesota, USA.
 44. Fernández-Cabanás, V.M., et al., Optimisation of the spectral pre-treatments used for Iberian pig fat NIR calibrations. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2007**. 87(1): p. 104-112.

45. Geladi, P., D. MacDougall, and H. Martens, Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat. *Applied Spectroscopy*, **1985**. 39(3): p. 491-500.
46. Helland, I.S., T. Næs, and T. Isaksson, Related versions of the multiplicative scatter correction method for preprocessing spectroscopic data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **1995**. 29(2): p. 233-241.
47. Barnes, R.J., M.S. Dhanoa, and S.J. Lister, Standard normal variate transformation and detrending in diffuse reflectance spectra. *Applied Spectroscopy*, **1989**. 43: p. 772-777.
48. Norris, K.H. and P.C. Williams, Optimization of Mathematical Treatments of Raw Near-Infrared Signal in the Measurement of Protein in Hard Red Spring Wheat. I. Influence of Particle Size. *Cereal Chemistry*, **1984**. 61: p. 158 - 165.
49. Ståhle, L. and S. Wold, Partial least squares analysis with cross-validation for the two-class problem: A Monte Carlo study. *Journal of Chemometrics*, **1987**. 1(3): p. 185-196.
50. Brereton, R.G., Chemometrics: applications of mathematics and chemometrics, illustrated by case studies, ed. Elsevier. 1992, Amsterdam, Netherlands.
51. Brereton, R.G., Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry. *Analyst*, **2000**. 125: p. 2125-2154.
52. Höskuldsson, A., Prediction methods in science and technology, ed. T. Publishing. 1996, København, Denmark.
53. Williams, P.C. and D.C. Sobering, Comparison of commercial near infrared transmittance and reflectance instruments for analysis of whole grains and seeds. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, **1993**. 1(1): p. 25-32.
54. 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(2): p. 67-87.
55. Gómez-Míguez, M., et al., Influence of Different Phenolic Copigments on the Color of Malvidin 3-Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(15): p. 5422-5429.
56. Kallithraka, S., J. Bakker, and M.N. Clifford, Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *Journal of Sensory Studies*, **1998**. 13(1): p. 29-43.
57. Preys, S., et al., Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*, **2006**. 563(1-2): p. 126-136.
58. Robichaud, J.L. and A.C. Noble, Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **1990**. 53(3): p. 343-353.
59. Kontoudakis, N., et al., Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes: Correlation between predicted and obtained parameters. *Analytica Chimica Acta*, **2009**. 660(1-2): p. 127-133.
60. OIV, Recueil de methods internationales d'Analyse des vins. Caracteristiques chromatiques. 1990, Paris: OIV. 29-39, 269-270.

61. Fragoso, S., et al., Comparison of Three Extraction Methods Used To Evaluate Phenolic Ripening in Red Grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**. 58(7): p. 4071-4076.
62. Wulf, L.W. and C.W. Nagel, High-Pressure Liquid Chromatographic Separation of Anthocyanins of *Vitis Vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1978**. 29(1): p. 42-49.
63. Cheynier, V. and J. Rigaud, HPLC Separation and Characterization of Flavonols in the Skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1986**. 37(4): p. 248-252.
64. Hong, V. and R.E. Wrolstad, Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1990**. 38(3): p. 708-715.
65. Goldberg, D.M., et al., Catechin and Epicatechin Concentrations of Red Wines: Regional and Cultivar-Related Differences. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1998**. 49(1): p. 23-34.
66. Monagas, M., et al., Simultaneous Determination of Nonanthocyanin Phenolic Compounds in Red Wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2005**. 56(2): p. 139-147.
67. Osborne, B.G., T. Fearn, and P.T. Hindle, Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis. Longman food technology. 1993, Harlow: Longman Scientific & Technical ; Wiley. 224.
68. Siesler, H.W., et al., Near infrared spectroscopy: principles, instruments, applications. 2002, Weinheim, Germany: Wiley-VCH. 348.
69. Sun, B.S., et al., Transfer of Catechins and Proanthocyanidins From Solid Parts of the Grape Cluster Into Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1999**. 50(2): p. 179-184.
70. Cadot, Y., M.T. Minana-Castello, and M. Chevalier, Anatomical, Histological, and Histochemical Changes in Grape Seeds from *Vitis vinifera* L. cv Cabernet franc during Fruit Development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2006**. 54(24): p. 9206-9215.
71. Kennedy, J.A., M.A. Matthews, and A.L. Waterhouse, Changes in grape seed polyphenols during fruit ripening. *Phytochemistry*, **2000**. 55(1): p. 77-85.
72. Verónica, N., et al., Non-galloylated and galloylated proanthocyanidin oligomers in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006**. 86(6): p. 915-921.
73. Rodríguez Montealegre, R., et al., Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2006**. 19(6-7): p. 687-693.
74. Obreque-Slier, E., et al., Comparative Study of the Phenolic Composition of Seeds and Skins from Carménère and Cabernet Sauvignon Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2010**. 58(6): p. 3591-3599.

75. Lea, A.G.H., et al., The Procyanidins of White Grapes and Wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, **1979**. 30(4): p. 289-300.
76. Bourzeix, M., D. Weyland, and N. Heredia, Etude des catechines et des procyanidols de la grappe de raisin, du vin et d'autres derives de la vigne. *Bulletin de l'OIV*, **1986**. 59: p. 1171-1254.
77. Ricardo Da Silva, J.M., et al., Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. *Phytochemistry*, **1991**. 30(4): p. 1259-1264.
78. Santos-Buelga, C., E.M. Francia-Aricha, and M.T. Escribano-Bailón, Comparative flavan-3-ol composition of seeds from different grape varieties. *Food Chemistry*, **1995**. 53(2): p. 197-201.
79. Jordao, A.M., J.M. Ricardo Da Silva, and O. Laureano, Evolution of Catechins and Oligomeric Procyanidins during Grape Maturation of Castelao Frances and Touriga Francesa. *American Journal of Enology and Viticulture*, **2001**. 52(3): p. 230-234.
80. Monagas, M., et al., Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2003**. 51(22): p. 6475-6481.
81. Núñez, V., et al., Non-galloylated and galloylated proanthocyanidin oligomers in grape seeds from *Vitis vinifera* L. cv. Graciano, Tempranillo and Cabernet Sauvignon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006**. 86(6): p. 915-921.
82. Escribano-Bailón, T., et al., Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del País grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1992**. 40(10): p. 1794-1799.
83. Ferrer-Gallego, R., et al., Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Analytica Chimica Acta*, **2010**. 660(1-2): p. 22-28.
84. Shenk, J.S. and M.O. Westerhaus, Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual, NIRSystems. 1995, MD, USA: Silver Spring. 239.

**COMENTARIOS GENERALES
Y CONCLUSIONES**

COMENTARIOS GENERALES Y CONCLUSIONES

1. El estudio de la composición fenólica de uvas de *Vitis vinifera* L. Graciano, recogidas a lo largo de la maduración y en diferentes condiciones climatológicas, ha permitido poner de manifiesto que:

- La acumulación de antocianos se favorece cuando las condiciones son más cálidas (caso del año 2009). Asimismo, en estas condiciones el contenido de procianidinas en las semillas es menor, lo que a priori estaría asociado a una buena madurez fenólica.

- Cuando las condiciones climatológicas son desfavorables (primaveras lluviosas y veranos poco calurosos, como en el año 2008), la acumulación de compuestos fenólicos del hollejo es menor y el contenido de los compuestos fenólicos de las semillas es mayor. Estas condiciones podrían estar asociadas a una merma de la calidad fenólica.

- En las condiciones climatológicas habituales de las regiones estudiadas, se produce una menor variación de los compuestos fenólicos de las semillas que de los compuestos fenólicos del hollejo, a lo largo de la maduración. Sin embargo, en los años de condiciones irregulares, las variaciones en las semillas pueden ser incluso mayores que en los hollejos.

- El diferente comportamiento fenólico encontrado en semillas y hollejos sugiere la necesidad de realizar una evaluación independiente de ambas partes de la uva para determinar el momento óptimo de calidad fenólica.

2. La aplicación de técnicas quimiométricas a los datos de composición fenólica y del análisis sensorial de las muestras de semillas y de hollejos ha permitido determinar la existencia de relaciones entre algunos de los factores estudiados. Se destacan, las siguientes:

- En los hollejos, el aumento del contenido de procianidinas dímeras, flavonoles y principalmente de antocianos está relacionado con buenas sensaciones orales (mejor dilaceración del hollejo, mayor intensidad aromática y aromas más maduros). Por el

contrario, la intensidad tánica, la astringencia, la sequedad y la acidez presentan una pauta opuesta, obteniéndose una disminución de sus puntuaciones sensoriales a lo largo de la maduración. La sequedad y la acidez son sensaciones muy relacionadas entre sí, al igual que la astringencia y la intensidad tánica, aunque éstas en menor medida.

- Se establece una clara separación entre el año 2008 y 2009. Las variables más importantes para ello son, entre los compuestos fenólicos, las prodelfinidinas, los ácidos hidroxibenzoicos y en menor medida los flavanoles y entre los parámetros sensoriales, la intensidad de aroma.

- En las semillas, el contenido total de flavanoles no es el único factor que afecta a estas sensaciones orales, ya que semillas con contenidos mayores presentan menor astringencia e intensidad tánica que muestras con contenidos más bajos. El perfil cualitativo de las semillas puede jugar un papel importante en este aspecto. Así, los contenidos de catequinas y procianidinas oligómeras y particularmente del dímero galoilado B2-3-*O*-galato y de epicatequina-3-*O*-galato (ECG) podrían estar muy ligados a los cambios en la intensidad tánica y la astringencia, que tienen lugar a medida que progresa la maduración.

- La facilidad de molido presenta una relación directa con la maduración. La sensación de aspereza y sequedad muestran una pauta contraria. Así, cuando las semillas se rompen con facilidad, la sensación de aspereza y sequedad en boca se reduce.

- Los parámetros de color del espacio CIELAB estudiados en las semillas tienen coeficientes de correlación altos con algunos de los compuestos fenólicos estudiados, siendo ECG el más importante. Teniendo en cuenta que los flavanoles son flavonoides no coloreados, esta relación podría estar ligada a procesos de oxidación.

3. Se llevaron a cabo estudios con extractos de semillas, de interacción tanino-proteína mediante quenching de fluorescencia y nefelometría. Estos resultados se correlacionaron con los obtenidos en el análisis sensorial. Se ha podido concluir lo siguiente:

- Los extractos de semillas de uva tienen una alta capacidad para unirse a las proteínas α -amilasa y seroalbúmina. Asimismo, el grado de maduración de las semillas afecta a la afinidad de los compuestos fenólicos para unirse a las proteínas. Así, los extractos procedentes de semillas maduras presentan una mayor capacidad para formar agregados insolubles y producen una mayor disminución en la intensidad de fluorescencia que los extractos de semillas verdes. Esta tendencia está ligada a un descenso acusado de los flavanoles monómeros y de los compuestos galoilados, asociada a su vez, a una mayor abundancia relativa de los compuestos de mayor peso molecular en el momento de maduración. En consonancia con los resultados obtenidos, los compuestos más polimerizados podrían tener una mayor capacidad para unirse a proteínas, lo que explicaría la mayor afinidad encontrada cuando las semillas son más maduras, incluso cuando su contenido en taninos es menor. Parece apuntarse, por tanto, que no es el descenso general en flavanoles, ocurrido a lo largo de la maduración, el responsable de una mayor facilidad para formar agregados insolubles sino el tipo de flavanoles y su proporción relativa, lo cual está condicionado por el estado de maduración.

- La mayor capacidad de formar complejos insolubles tanino-proteína y de disminuir la intensidad de fluorescencia de la proteína no se corresponde con una mayor sensación de astringencia. Cabe pensar, por tanto, que la precipitación de proteínas no es el único mecanismo implicado en esta compleja sensación oral.

4. Se llevó a cabo el análisis sensorial y de composición fenólica de los vinos obtenidos a partir de las uvas objeto de estudio. La correlación de estos datos con los obtenidos en las uvas ha puesto de manifiesto que el contenido de los compuestos fenólicos de las uvas afecta claramente a las características del vino. Si bien la fecha de vendimia ejerce una evidente influencia en los vinos, las condiciones climatológicas del año son fundamentales para la definición de la calidad global del mismo. Otras conclusiones destacadas han sido:

- La facilidad de extracción de los compuestos fenólicos de las uvas al vino no está relacionada con su contenido total y tampoco tiene una relación directa con su madurez glucosídica. Además, la extracción de algunos compuestos fenólicos puede estar

favorecida frente a la de otros. En este sentido, parece apuntarse que en los años en los que se alcanza una buena madurez fenólica, la extracción de antocianos y procianidinas es mejor que la del resto de compuestos fenólicos.

- Un alto contenido en prodelfinidinas podría estar asociado a una buena madurez fenólica, ya que las uvas que tienen mayor acumulación de estos compuestos, conducen a vinos tintos de mayor calidad (uvas correspondientes al año 2009).

- Los vinos monovarietales de Graciano presentan mejores características organolépticas cuando su contenido en compuestos fenólicos es mayor.

5. El estudio del color de los vinos de Graciano mediante colorimetría triestímulo ha permitido determinar que:

- Los vinos elaborados a partir de uvas Graciano de composición fenólica diferente presentan claras diferencias de color, si bien, sus tonalidades son parecidas.

- Los parámetros cuantitativos y cualitativos del color están correlacionados con la copigmentación, de tal forma que, una mayor copigmentación implica variaciones significativas en el tono, más cantidad de color en el vino y menos luminosidad.

- En relación a la evaluación de las formas de estimar el porcentaje de copigmentación, se pone de manifiesto que la medida según Boulton (520 nm) parece estar ligeramente sobrestimada frente a una medida en la que se considera el espectro visible completo (380 -770 nm). No obstante, las dos medidas presentan pocas diferencias cuando los porcentajes de copigmentación del vino son bajos.

6. La espectroscopía NIR puede llegar a ser una alternativa a los métodos tradicionales para la cuantificación de compuestos fenólicos en las uvas de forma rápida y puede resultar una herramienta precisa y eficiente que ayude a la toma de decisiones en el momento de la cosecha.

- Los modelos desarrollados utilizando esta técnica junto con las herramientas quimiométricas adecuadas permiten la determinación de las principales familias de compuestos fenólicos y del contenido total de fenoles en uvas tintas. De forma general,

los mejores resultados se obtienen utilizando la sonda de fibra óptica. Asimismo, permiten determinar el contenido de los flavanoles mayoritarios de la semilla así como sus familias más representativas (monómeros, oligómeros, galoilados). Esta determinación se puede realizar midiendo directamente las semillas de uva. En ambas matrices, la determinación se puede llevar a cabo en cualquier momento del período de maduración.

-Por último, hay que mencionar que la espectroscopía NIR tiene también un excelente potencial para dar información a cerca de la procedencia de las uvas de manera rápida y a un coste razonable, siendo las semillas la mejor matriz para llevar a cabo la clasificación de las muestra entre los viñedos estudiados. Es importante resaltar que la clasificación puede realizarse en cualquier momento de la maduración de la uva.

**GENERAL COMMENTS
AND CONCLUSIONS**

GENERAL COMMENTS AND CONCLUSIONS

1. Study of the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes, obtained during ripening and under different climatological conditions allows the following conclusions to be drawn:

- Hot climatological conditions elicit an early accumulation of anthocyanins and this early accumulation promotes higher amounts of these compounds at the end of the ripening period (case of 2009 vintage). Furthermore, under these conditions the content of procyanidins in seeds is low. These features could be associated with optimal phenolic maturity.

- When meteorological conditions are unfavourable (rainy springs and warm summers, as in the 2008 vintage), the accumulation of phenolic compounds in the grape skins is low but they are present in high amounts in seeds. A loss of phenolic quality could be related to such weather conditions.

- In the climate zones considered, the usual weather conditions are propitious for lower variations in phenolic compounds in seeds than in skins during ripening. In contrast, irregular weather conditions lead to broad variations in the seed contents of phenolics, which may be even more pronounced than in skins.

- The differences found in the phenolic behaviour of seeds and skins suggest that it may be important to evaluate the phenolic maturity of seeds and skins separately in order to decide on the optimal harvest time.

2. The application of chemometric tools to the data resulting from the calculation of the phenolic composition and sensory analyses of seed and skin samples has allowed us to determine the existence of relationships between some of the variables studied. We emphasize the following:

- In grape skins, the increase in the content of dimeric procyanidins, flavonols and most of all anthocyanins, are related to good oral sensations (better dilacerations of the skin, aroma intensity, and mature flavours). Nevertheless, tannic intensity, astringency, dryness and acidity follow the opposite trend. Decreases in the scores of these sensory parameters were observed during ripening. It is noteworthy that dryness and acidity are

highly related to each other, and also to astringency and tannic intensity, although to a lesser extent.

- Clear differences between the 2008 and 2009 vintages were obtained. The variables that best contribute to establishing these differences are the contents in phenolic compounds, prodelphinidins, hydroxybenzoic acids and, to a lesser extent, in flavanols and, among the sensory parameters, the intensity of the aroma.

- In seeds, the total content of flavanols is not the only factor affecting these sensory attributes, since in our studies seeds with higher contents showed a lower astringency than others with lower contents. Therefore, the qualitative profile of the seeds is also responsible for the sensations elicited in the mouth. The contents of catechins and oligomer procyanidins, and specifically those of the dimer B2 3-*O*-gallate and epicatechin 3-*O*-gallate, could be closely related to the changes in tannic intensity and astringency that take place during ripening.

- Changes in the phenolic composition accompany changes in tannic intensity and astringency, which tend to diminish as the degree of maturity increases, while seed hardness shows the opposite trend. When seeds are easily crushed, the dryness and the asperity felt on the lips and palate are reduced.

- The CIELAB parameters of seeds have high correlation coefficients with many flavanolic compounds. Epicatechin 3-*O*-gallate is the compound most related to the aforementioned parameters. Taking into account that flavanols are non-coloured flavonoids, this relationship could be linked to oxidative processes.

3. Studies addressing tannin-protein interactions using grape seed extracts were carried out by fluorescence quenching and nephelometry. The results were correlated with those obtained in the sensory analysis. It may be concluded that:

- Grape seed extracts have a high affinity for binding α -amylase and bovine serum albumin. The strength of tannin-protein interactions varies with the degree of ripeness, which can be associated with changes in the tannin structure. Seed extracts from grapes at maturity show a greater affinity for binding proteins than those at the post-veraison time. This tendency could be linked to a decrease in flavanol monomers and in

post-veraison time. This tendency could be linked to a decrease in flavanol monomers and in galloylated compounds, with a relative increase in higher-molecular weight compounds at maturity. In keeping with the results obtained, the oligomers could have a better capacity to bind proteins, which could explain the higher binding affinity of ripe seed extracts as compared to unripe seed extracts, even though the tannin content is lower. It therefore seems that it is not the decrease in flavanols taking place during ripening that is responsible for the increase in the binding affinity for proteins, but the type of flavanols and their relative proportion, which is conditioned by the stage of maturation.

- The greater ability of the extracts from ripe seeds than from unripe seeds to form tannin-protein complexes and to reduce the intensity of protein fluorescence is not in accordance with the lower astringency sensations elicited. Thus, the precipitation of proteins may not be the only mechanism responsible for this complex oral perception.

4. Sensory and phenolic composition analyses were carried out in wines obtained from the grapes previously studied. The correlation between the results obtained with those obtained in the analysis of grapes reveals that the phenolic composition of grapes clearly affects wine characteristics. Even though the date of harvest has an important influence on the wines, the climatological conditions to which the vintages are subjected are essential for defining their overall quality. Other outstanding conclusions are:

- The extractability of different phenolic compounds is not related to the total content of these compounds in grapes nor to the sugar content. Thus, some phenolic compounds may be more readily extracted than others. It seems that a better extraction of anthocyanins and procyanidins than other phenolic compounds can be achieved in vintages with good phenolic maturity.

- High contents of skin prodelphinidins could be related to good phenolic maturity, since grapes containing higher amounts of these compounds afford high-quality red wines (grapes corresponding to the 2009 vintage).

- Generally, Graciano wines have better organoleptic properties when the content in phenolic compounds is high.

- Graciano red wines obtained from grapes with different phenolic compositions show clear differences in colour, although the hue is similar.

- The quantitative and qualitative parameters of colour are correlated with the copigmentation phenomenon, such that a greater effect of copigmentation elicits a greater amount of colour in the wine, less luminosity, and significant changes in the hue.

- Regarding the evaluation of the different methods for estimating the percentage of copigmentation, it was observed that measurements carried out with Boulton's method (520 nm) seemed to be slightly overestimated as compared to those performed using the entire visible spectrum (380-770 nm). However, the data provided by both estimations are very close when the percentages of copigmentation are low.

6. Near infrared spectroscopy (NIRS) technology may offer a highly feasible alternative to traditional methods for the rapid quantification of phenolic compounds in grapes and could prove to be an accurate and efficient tool to aid decision-making at harvest time.

- The models developed using NIRS, together with chemometric tools, allow the determination of the content of total phenolic compounds and of the main families of phenolic compounds in red grapes. The best results were generally obtained using a fibre-optic probe and recording the spectra of intact grapes directly; this can be attributed to the almost complete absence of sample manipulation. Furthermore, the models permit the determination of the flavanol contents in seeds and the main groups of flavanols (monomers, oligomers, galloylated flavanols). In both matrices, the determination can be done by direct measurement.

- Finally, NIRS has an excellent potential for providing information about the vineyard of origin. Comparative studies using entire grapes, skins and seeds show that seeds are a better matrix for carrying out sample classification. It is also noteworthy that classification can be performed at any time during the ripening period.

ANEXOS

ANEXO I

EVALUACIÓN GUSTATIVA DEL HOLLEJO

FACILIDAD DE DILACERACIÓN: Evaluar la dificultad de dilaceración del hollejo masticando entre los molares de 10 a 15 veces examinando la textura de la masa obtenida con la ayuda de la siguiente escala:

- 1: hollejo duro, presencia de fragmentos groseros en fin de masticado
- 2: hollejo duro, presencia de fragmentos finos en fin de masticado
- 3: hollejo dilacerable, formación de una pasta casi homogénea
- 4: hollejo muy dilacerable, rápida formación de una pasta muy homogénea

INTENSIDAD TÁNICA: Evaluar la impresión de rugosidad (paso más o menos dificultoso) después de pasar la lengua dos veces por el paladar.

- 1: la lengua resbala sin esfuerzo por el paladar
- 2: la lengua que da ligeramente enganchada
- 3: la lengua resbala con dificultad
- 4: la lengua resbala con gran dificultad

ACIDEZ: Evaluar el nivel de acidez después de pasar la pasta por el paladar y el resto de la boca. Este criterio se puntúa de manera inversa al resto de los criterios (de 1, poco ácido y maduro a 4 muy ácido y poco maduro) de forma que la escala de puntuación corresponda a la sensación percibida en la boca.

- 1: película poco ácida
- 2: película medianamente ácida
- 3: película ácida
- 4: película muy ácida

ASTRINGENCIA: Puntuar según la siguiente escala la dificultad mecánica al pasar el labio superior por los incisivos después de haber pasado la pasta masticada entre la mucosa del labio superior y la parte exterior de los incisivos superiores.

- 1: el labio resbala fácilmente por la encía
- 2: el labio queda ligeramente enganchado
- 3: el labio resbala con dificultad
- 4: el labio resbala con gran dificultad

SEQUEDAD: Notar la facilidad de volver a salivar y la sensación de suavidad y de fineza de grano al pasar la lengua por el paladar, evaluando la sensación percibida en la boca.

- 1: la lengua resbala sin esfuerzo por el paladar, ninguna dificultad de volver a salivar, sensación de grano fino y sedoso
- 2: la lengua queda ligeramente enganchada en el paladar, breve dificultad para volver a salivar, sensación de grano medio
- 3: la lengua resbala con dificultad, dificultad de volver a salivar durante unos segundos; sensación de grano grueso
- 4: la lengua parece casi pegada al paladar, dificultad de volver a salivar durante más de 5 segundos, sensación agresiva en el paladar

TIPO DE AROMA: Notar los aromas dominantes que se desprenden en la degustación de los hollejos.

- 1: herbáceo
- 2: neutro
- 3: afrutado
- 4: confitura
- 5: uva pasificada (sobremaduración)

INTENSIDAD DE AROMA:

- 1: poco intenso
- 2: intensidad media
- 3: intenso
- 4: muy intenso

EVALUACIÓN GUSTATIVA DE LA SEMILLA

COLOR: Puntuar el color de las semillas externo con ayuda de la siguiente escala:

- 1: blanco o amarillo verdoso
- 2: marrón - verde
- 3: castaño - gris
- 4: marrón oscuro

FACILIDAD DE MOLIDO. Evaluar la sensación percibida entre las encías cuando se aplastan las semillas.

- 1: Presencia de una zona blanda, después se necesita una fuerte presión de los incisivos para romper la semilla.
- 2: Presencia de una zona blanda únicamente periférica; la semilla está húmeda y se rompe con fuerte presión.
- 3: Casi ausencia de zona periférica, semilla dura, ligeramente crujiente.
- 4: Ausencia de una zona periférica; la semilla cruje y se rompe fácilmente

INTENSIDAD TÁNICA. Evaluar la intensidad tánica después de pasar la masa de semillas masticadas por el paladar y luego por la lengua.

- 1: La lengua resbala sin esfuerzo por el paladar.
- 2: La lengua queda ligeramente agarrada.
- 3: La lengua resbala con dificultad.
- 4: La lengua resbala con gran dificultad

ASTRINGENCIA. Evaluar la sensación percibida tras el paso de la punta de la lengua por la masa de semillas masticadas, y después pasando la masa entre las encías y los labios.

- 1: El labio resbala fácilmente sobre las encías.
- 2: El labio queda ligeramente agarrado.
- 3: El labio resbala con dificultad.
- 4: El labio resbala con mucha dificultad

ANEXO II (Publicaciones)

ANEXO II

TRABAJOS PUBLICADOS Y ENVIADOS PARA SU PUBLICACIÓN

- *Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening.* Raúl Ferrer-Gallego, Matilde García Marino, José M. Hernández Hiero, María Teresa Escribano Bailón, Julián Rivas Gonzalo. *Analytica Chimica Acta* 660 (2010) 22-28.
- *Feasibility study on the use of Near Infrared Spectroscopy to determine flavanols in grape seeds.* Raúl Ferrer-Gallego, José M. Hernández Hiero, Julián Rivas Gonzalo, María Teresa Escribano Bailón. *Talanta* 82 (2010) 1778-1783.
- *Determination of phenolic compounds of grape skins using near infrared spectroscopy.* Raúl Ferrer-Gallego, José M. Hernández Hiero, Julián Rivas Gonzalo, María Teresa Escribano Bailón. *LWT-Food Science and Technology* 44 (2011) 847-853.
- *Multivariate analysis of sensory data of Vitis vinifera L. cv. Graciano during ripening. Correlation with the phenolic composition of the grape skins.* Raúl Ferrer-Gallego, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo and M.T. Escribano-Bailón. *CyTA-Journal of Food* 9 (2011) 291-295.
- *Influence of climatic conditions on the phenolic composition of Graciano grapes harvested in Rioja.* Raúl Ferrer-Gallego, José Miguel Hernández-Hierro, Julián Carlos Rivas-Gonzalo, María Teresa Escribano-Bailón. *Analytica Chimica Acta* (enviada).
- *Interaction of grape seeds phenolic compounds with Bovine Serum Albumin (BSA) and α -amilase and their relationship on the astringency perception.* Raúl Ferrer-Gallego, Rui Gonçaves, Julián Carlos Rivas-Gonzalo, María Teresa Escribano-Bailón, Victor de Freitas. *Analytica Chimica Acta* (enviada).

- *A comparative study to distinguish the vineyard of origin by NIRS using entire grapes, skins or seeds.* Raúl Ferrer-Gallego, José M. Hernández Hiero, Julián Rivas Gonzalo, María Teresa Escribano Bailón. *European Food Research and Technology* (enviada).



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening

Raúl Ferrer-Gallego, Matilde García-Marino, José Miguel Hernández-Hierro, Julián C. Rivas-Gonzalo, M. Teresa Escribano-Bailón*

Grupo de Investigación en Polifenoles, Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 July 2009

Received in revised form

22 September 2009

Accepted 26 September 2009

Available online 1 October 2009

Keywords:

Astringency
Tannic intensity
Proanthocyanidins
Ripening
Grape seeds

ABSTRACT

The aim of this work has been to determine the correlations between sensory analysis, colour and content of main flavanols present in seeds. For this, the flavanic composition of grape seeds with different degrees of maturity was analysed by HPLC–DAD–MS and the obtained results were correlated with CIELab colour parameters, perceived colour (C), hardness of the seed (HS), tannic intensity (TI) and astringency (A). Multiple linear regression analysis (MLR) with the variables showing significant correlations ($p < 0.05$) was also performed. Grape seeds undergo important decreases in the content of catechins and procyanidin oligomers during ripening. Epicatechin-(4-8)-epicatechin-3-O-gallate (B2G) and (–)-epicatechin-3-O-gallate (ECG) are the flavanolic compounds whose contents decrease most. The changes in the phenolic composition accompany changes in TI, A and HS. The total content of flavanols in the seed is not the only factor affecting these attributes, since samples containing higher contents in flavanols can exhibit less astringency and tannic intensity than others with lower ones. The qualitative profile of the seeds is, therefore, also responsible for the sensations elicited in the mouth. A and HS parameters are more affected by the presence of galloylated dimeric procyanidins in the molecule than TI. CIELab colour parameters of seeds have high correlation coefficients with many flavanolic compounds. ECG was the compound most related to these parameters.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Qualitative and quantitative phenolic composition of grapes depends on multiple factors, including climate, variety, soil, and degree of ripeness [1–3], the phenolic maturity of grapes being decisive for the production of quality red wines. During the first period of berry growth, phenolic compounds are accumulated [4,5] while a softening and a colouring of the berry characterise the second period or fruit ripening [6,7]. Changes occurring in the berries during maturation can also be observed in the seeds [8]. It is commonly accepted that during grape maturation, the seeds undergo modifications in their phenolic composition [9–11] affecting the sensations perceived in the mouth. Moreover, changes in seed coat colour have been related to developmental changes in berry anthocyanins and total skin phenolics indicating that the external appearance and colour of the seed may be used as an additional indicator of overall berry ripeness [8].

Among the phenolic compounds, the catechins and the proanthocyanidins contribute directly to the astringency and, indirectly,

through the interaction with anthocyanins, to the colour of red wines. In the berry, these compounds are mainly located in skin and seeds from which they are extracted to the wine. Although seeds represent only 0–6% of berry weight, they are an important source of flavanols for wines [12]. Grape seed composition is characterised by the presence of catechins and procyanidins which are composed of (+)-catechin, (–)-epicatechin and (–)-epicatechin-3-O-gallate units. Among the oligomers, dimers are usually the most abundant compounds, the dimer B2 being the major component in seeds [7,13–21]. Trimers C1 (epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-epicatechin) and EEC (epicatechin-(4 β →8)-epicatechin-(4 β →8)-catechin) are also well represented [7,14,22]. Another characteristic of the flavanol composition of grape seeds is that galloylation always appears to occur on an epicatechin unit; no compound with catechin-O-gallate has been found [14,15,20].

It has been accepted that astringency is not a taste, but a tactile sensation [23–26] that results from the interaction with proteins, causing a loss in the lubricating power of saliva, or with the glycoproteins of the mouth epithelium [27]. The affinity of polyphenols for proteins depends on the number of phenolic moieties [28]. Interaction between polyphenols and proteins increases with the degree of polymerisation and the number of galloyl units in the

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294 537; fax: +34 923 294 515.
E-mail address: escriban@usal.es (M. Teresa Escribano-Bailón).

polyphenol structure [29–33], but it is not necessarily related to astringency as conformational changes in the protein structure provoked by the interaction with the polyphenol also seem to be implicated [34]. Different authors have indicated that extractable flavan-3-ol monomers and low molecular weight seed procyanidins decrease during fruit ripening [9,11,35], which might affect the astringency of the seeds.

Several methods have been developed in order to obtain an objective evaluation of the astringency [36–41], but most of the methods are indirect, which makes it difficult to draw conclusions. For that reason sensory analysis continues to be a useful tool [42–44].

The aim of this work has been to determine the correlations between sensory analysis, colour and content of main flavanols present in seeds and to determine which flavanolic compounds or family of flavanolic compounds better explain the variations occurring within these parameters. With this objective, the flavanic composition of grape seeds with different degrees of maturity was analysed by HPLC–DAD–MS and the obtained results were correlated with CIELab colour parameters, perceived colour (C), hardness of the seed (HS), tannic intensity (TI) and astringency (A). Multiple linear regression analysis (MLR) with the variables showing significant correlations ($p < 0.05$) was also performed.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Vitis vinifera L. cv. “Graciano” red grapes were collected in 2008 at eight different developmental stages: from veraison (September 3rd) until over-ripeness (November 5th). Also, in order to compare the features of the seeds picked in different years at technological maturity, samples were collected at harvest in 2005–2008. The sampling was carried out as follows: 300 berries were collected from both sides of vines located in different rows within the vineyard. Edge rows and the first two vines in a row were avoided. Berries were collected from the top, middle and bottom of the cluster and were immediately frozen and stored at -20°C until analyses were performed.

2.2. Extraction

Extraction was carried out as described in García-Marino et al. [45]. Grape seeds were separated manually and freeze-dried. Samples were ground to obtain a homogeneous powder for extraction. The grape seed powder was extracted with 75% methanol (Merck, LiChrosolv®, Darmstadt, Germany). The methanolic extracts were concentrated at low pressure until an aqueous extract was obtained. The extracts were injected directly into the chromatographic system after filtration through a $0.45\ \mu\text{m}$ filter. All analyses were performed in triplicate.

2.3. HPLC–DAD–MS analysis

HPLC–DAD–MS analysis was carried out as described in García-Marino et al. [45]. LC-diode array detection (DAD) analysis was performed in a Hewlett-Packard 1200 series liquid chromatograph, and detection was carried out using a photodiode detector. A Spherisorb® S3 ODS-2 reverse phase $3\ \mu\text{m}$ particle size C18 column $150\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$ i.d. (Waters, Ireland) thermostatted at 25°C was used.

The solvents used were: (A) 2.5% acetic acid, (B) 2.5% acetic acid/acetonitrile (90:10, v:v), and (C) HPLC-grade acetonitrile, establishing the following gradient: from 0 to 100% B for 5 min, from 0 to 15% C for 25 min, from 15 to 50% C for 5 min, and isocratic

50% C for 5 min at a flow rate of $0.5\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Detection was carried out at 280 nm as the preferred wavelength.

The mass analyses were performed using a FinniganTM LCQ ion trap detector (Thermoquest, San Jose, CA, USA) equipped with an API source, using an electrospray ionisation (ESI) interface. The LC system was connected to the probe of the mass spectrometer via the UV cell outlet. Both sheath gas and auxiliary gas were nitrogen and helium. The sheath gas flow was $1.2\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ and the auxiliary gas flow, $6\ \text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The source voltage and the capillary voltage used were 4.50 kV and 28 V, respectively, and the capillary temperature 270°C . Spectra were recorded in positive ion mode between m/z 120 and 2000. The mass spectrometer was programmed to do a series of two consecutive scans: a full mass, and an MS^2 scan of the most abundant ion in the full mass, using a normalised energy of collision of 45%.

Quantification was performed by HPLC/DAD using calibration curves of (+)-catechin, purchased from Sigma and of procyanidins obtained in our laboratory as described in González-Manzano et al. [46].

2.4. Statistical treatment

Significant differences were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) using the SPSS Program, Version 13.0 for Windows software package (SPSS, Inc., Chicago, IL). Correlations and multiple linear regression (MLR) were performed using the same SPSS program. The parameters R (multiple correlation coefficient), B (non-standardised regression coefficients) and β (standardised regression coefficients) were obtained.

2.5. Colour analysis

The colour of the seeds was determined by means of a Minolta colorimeter CR-300 (Osaka, Japan) and recorded in $L^*a^*b^*$ colour system. The $L^*a^*b^*$ colour system consists of a lightness component (L^*) and two chromatic components: the a^* value represents green ($-a$) to red ($+a$) while the b^* value represents blue ($-b$) to yellow ($+b$) colours. Values of hue angle (h_{ab}) and chroma (C_{ab}^*) obtained from a^* and b^* parameters were also given by the instrument. The colorimeter was calibrated using a standard white plate ($L^* = 97.10$, $a^* = +0.13$, $b^* = +1.88$, $C_{ab}^* = 1.88$ and $h_{ab} = 86.1$).

2.6. Sensory analysis

Sensory characteristics of the seeds were analysed in terms of hardness of the seed (HS), tannic intensity (TI) and astringency (A) according to the norms of “l’Institut Coopératif du Vin” [42]. These characteristics were evaluated by a trained panel of 11 oenologists with experience in taste tests.

3. Results and discussion

3.1. Sensory characteristics of grapes

In order to determine the consistency of the trained panel, one-way ANOVA was done with the scores given by them. As can be seen in Table 1 the variation between different kinds of seeds (between groups) is always higher than the discrepancy between the values assigned by each of the panellists for the same seed sample (within groups), which allows us to confirm the reliability of the sensory panel.

Fig. 1 shows the scores given to the seeds at different stages of ripeness for the attributes of colour, HS, TI and A. The colour corresponding to the first sampling is noticeably lower than that of the other samples, but the panellists hardly distinguish between the

Table 1
Results of the one-way ANOVA performed with the scores given by the panellists.

	Sum of squares	df	Mean square	F	Sig.
Colour					
Between groups	11.818	7	1.688	7.411	0.000
Within groups	13.213	58	0.228		
Total	25.030	65			
Hardness of the seed					
Between groups	20.664	7	2.952	5.574	0.000
Within groups	31.246	59	0.530		
Total	51.910	66			
Tannic intensity					
Between groups	13.462	7	1.923	4.986	0.000
Within groups	21.984	57	0.386		
Total	35.446	64			
Astringenc					
Between groups	13.058	7	1.865	4.210	0.001
Within groups	24.371	55	0.443		
Total	37.429	62			

Between groups: variation between different kinds of seeds. Within groups: variation between the values assigned by each panellist for the same seed sample.

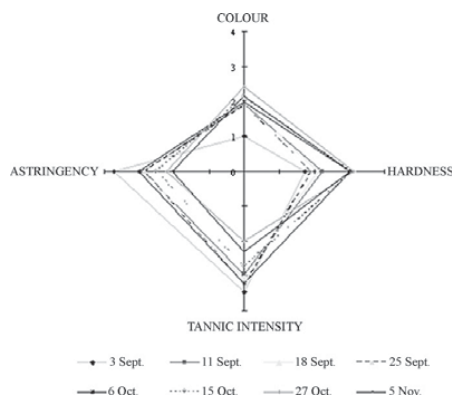


Fig. 1. Scores given to the seeds from grapes picked at different stages of ripeness for the attributes of colour, hardness of the seed, tannic intensity and astringency.

colours of the samples in the other ripeness stages. This proves that the visual evaluation of the seed colour provides poor information about the degree of ripeness of the seed.

Regarding TI and A attributes, at veraison (September 3rd), the seeds achieve the highest scores which tend to diminish as the degree of maturity increases. HS shows a contrary trend. When seeds are easily smashed, the dryness and asperity felt in the lips and palate are reduced.

Table 2
Total content of flavanols in the seed extracts obtained from grapes at different maturity stages.

	2008							
	03 September Mean \pm S.D.	11 September Mean \pm S.D.	18 September Mean \pm S.D.	25 September Mean \pm S.D.	06 October Mean \pm S.D.	15 October Mean \pm S.D.	27 October Mean \pm S.D.	05 November Mean \pm S.D.
Total (mg g^{-1})	74.33 \pm 3.67 ^d	70.50 \pm 6.66 ^{cd}	64.38 \pm 1.33 ^c	51.80 \pm 2.43 ^b	45.64 \pm 1.17 ^b	33.04 \pm 1.40 ^a	30.75 \pm 0.46 ^a	32.96 \pm 5.16 ^a

S.D. = standard deviation ($n=3$). Different lower case letters, a, b, c, d, indicate significant ($p < 0.05$) differences between samples.

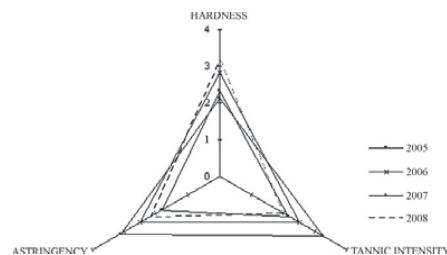


Fig. 2. Scores given to the seeds from grapes picked at harvest in 2005–2008 for the attributes of colour, hardness of the seed, tannic intensity and astringency.

Table 3
Total content of flavanols in the seed extracts obtained from grapes collected at harvest during the years 2005–2008.

	2005 Mean \pm S.D.	2006 Mean \pm S.D.	2007 Mean \pm S.D.	2008 Mean \pm S.D.
Total (mg g^{-1})	40.90 \pm 2.90 ^c	25.25 \pm 4.05 ^a	35.37 \pm 1.79 ^{bc}	30.75 \pm 0.46 ^{ab}

S.D. = standard deviation ($n=3$). Different lower case letters indicate significant ($p < 0.05$) differences between samples.

Fig. 2 shows the results of the sensory analysis carried out on seeds from grapes picked at maturity over four consecutive harvest seasons (2005–2008). As in the previous assay the direct relationship between TI and A and indirect relationship between these two attributes and HS can be observed. Based on the panellists' scores achieved by the samples and in their own perceptions integrating all sensations perceived in mouth, the panel determined that better phenolic maturity was reached in 2005 and 2008 than in 2006 and 2007.

3.2. Composition analysis of grapes

Tables 2 and 3 show the total contents of flavanols in the seed extracts obtained from grapes at different stages of maturity and those from grapes collected at harvest over several years (2005–2008). There is an important decrease in the flavanol contents during ripeness, less than half the total quantity at veraison remaining at the end of the sampling. This decrease is probably related to the decrease observed in the sensory attributes astringency and tannic intensity and to the increase in hardness. Nevertheless, the total content of flavanols in the seed is not the only factor affecting these attributes. Samples from 2006 have the lowest quantity in total flavanols, but had higher scores in A and TI than those from 2005 or 2008. Therefore, the qualitative profile of the seeds could also be responsible for the sensations elicited in the mouth.

The main catechins and proanthocyanidins present in the chromatograms of seed extracts were quantified. These correspond to the three flavan-3-ol monomers: (+)-catechin, (–)-epicatechin and (–)-epicatechin 3-O-gallate and to proanthocyanidins up to a degree of polymerisation of four. The degree of polymerisation

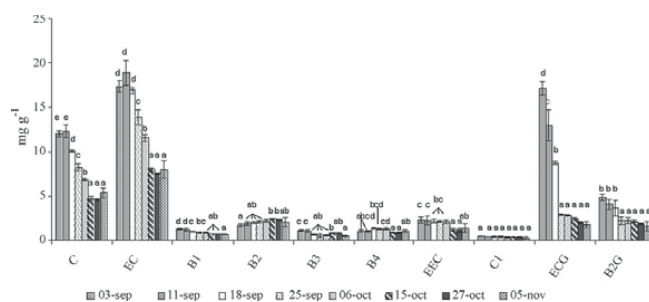


Fig. 3. Content of the main catechins and proanthocyanidins present in the chromatograms of the seed extracts. S.D. = standard deviation ($n = 3$). Different lower case letters, a, b, c, indicate significant ($p < 0.05$) differences in the content of the compound, between samples collected at different degrees of ripening. Abbreviations are the same as in Table 5.

of each procyanidin could be obtained from the MS analysis and the complete identification of the most abundant ones was established by comparison of their chromatographic and spectrometric features with those from standards previously obtained in our laboratory [47,48].

During maturation there is a fall in the concentration of most of the identified flavanols (Fig. 3). Monomers and galloylated compounds undergo the sharpest drop. Among them epicatechin-(4-8)-epicatechin-3-O-gallate (B2G) and (-)-epicatechin-3-O-gallate (ECG) stand out because of their decrease of 60% and 86%, respectively. It is known that the galloylation increases the procyanidin's ability to precipitate salivary proteins [37]. For this reason it is possible that a decrease in these compounds could have important consequences on the astringency and/or the tannic intensity. Near maturity no significant differences in the flavanolic composition of the seeds were obtained. It seems, therefore, that on October 15th the plant reaches its highest phenolic maturity (probably due to climatic conditions) and that it could not improve even if the fruit remained for a few days more on the vine.

Larger molecular weight procyanidins have been reported in grape seeds than those studied in our work and that must certainly be the case [27]. As it is accepted that proanthocyanidin astringency increases with chain length up to the decamer level [49], a decrease in the content of these proanthocyanidins can be expected as astringency decreases during the ripening process. The disappearance of these high molecular weight procyanidins, which were not detected in our extracts, does not give rise to lower molecular weight procyanidins, like those studied herein, since only a slight insignificant increase in the content of the procyanidin B2 can be observed.

Peleg et al. [50] indicated that astringency increases with an increase in the molecular size from monomers to trimers. Samples corresponding to 2006 and 2007, which were scored as more astringent, tend to present lower relative percentages of monomers and higher ones of dimers and trimers than 2005 and 2008. Even though the differences in some cases were not significant (Table 4).

3.3. Colorimetric analysis

During grape growing the colour of the seeds changes from an initial green, typical of the unripe grapes, to a dark brown at harvest, which could be related to oxidative processes [4,12]. This change could only be noticed by the panel at very early stages of maturity (Fig. 1). Colour parameters obtained by the colorimeter are shown in Figs. 4 and 5. During maturity, a decrease in b^* parameter and an increase in a^* could be observed (Fig. 4). This can be interpreted as a

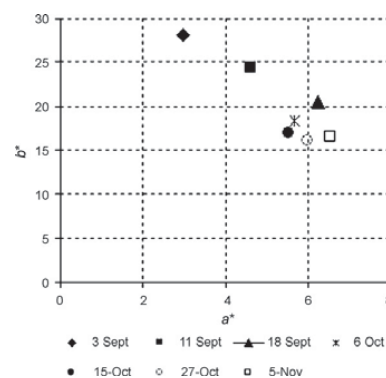


Fig. 4. a^* and b^* CIELab colour parameters of seed samples from grapes picked at different stages of ripeness.

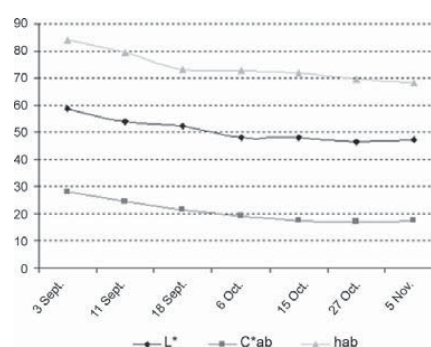


Fig. 5. C^*_{ab} , L^* and h_{ab} colour parameters of seed samples from grapes picked at different stages of ripeness.

Table 4
Distribution of flavanolic compounds in the seeds from grapes harvest during 2005–2008.

	%Total			
	2005 Mean ± S.D.	2006 Mean ± S.D.	2007 Mean ± S.D.	2008 Mean ± S.D.
M	37.72 ± 1.63 ^b	27.55 ± 3.69 ^a	35.73 ± 2.81 ^b	47.29 ± 0.68 ^c
D	21.42 ± 0.59 ^a	24.64 ± 1.33 ^{bc}	25.41 ± 1.22 ^c	22.08 ± 0.48 ^{ab}
DG	8.63 ± 0.56 ^b	9.30 ± 0.47 ^b	6.84 ± 0.13 ^a	6.34 ± 0.39 ^a
T	25.01 ± 0.85 ^b	30.30 ± 2.18 ^c	25.70 ± 1.63 ^{bc}	19.12 ± 0.40 ^a
TG	2.32 ± 0.34 ^a	3.69 ± 0.66 ^b	2.41 ± 0.09 ^a	1.28 ± 0.08 ^a
TE	5.06 ± 0.76 ^a	4.53 ± 0.29 ^a	3.92 ± 0.03 ^a	3.89 ± 0.33 ^a
TTG	14.68 ± 0.31 ^a	16.52 ± 2.50 ^a	14.94 ± 0.16 ^a	14.32 ± 0.53 ^a

M: monomers; D: dimers; DG: galloylated dimers; T: trimers; TG: galloylated trimers; TE: tetramers; TTG: total galloylated compounds.
S.D.=standard deviation (n=3). Different lower case letters, a, b, c, indicate significant ($p < 0.05$) differences, in the content of the compounds, between samples collected at harvest.

decline of yellow and of green and as a rise of red and blue, giving as a result a brownish colour to the seeds. C_{ab}^* , L^* and h_{ab} , suffer a progressive decrease with time, stabilising from October 15th (the date after which no modifications in the flavanol profile were observed) (Fig. 5). Colour differences (ΔE_{ab}^* = $[(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$) calculated between the last three samples showed that it was not possible to distinguish the colour between them ($\Delta E_{ab}^* \leq 1$).

3.4. Statistical analysis

Pearson's correlations obtained between the flavanolic composition and sensory parameters showed that the flavanolic compounds which are highly correlated to TI and A are not the same (Table 5). There is a very high correlation between A and galloylated flavanols and especially with galloylated dimers (Pearson's correlations: 0.830 and 0.836, respectively). Regarding TI, correlations with galloylated flavanols are not as high as in the A parameter, which seems more affected by the presence of galloylation in the molecule.

Multiple linear regression analysis (MLR) was carried out in forward stepwise manner to select suitable variables in the model and only the variables showing significant correlations ($p < 0.05$) in the previous univariate analysis were included in the study. In order to determine which flavanolic compounds or family of flavanolic compounds better explain the variation that occurs in the sensory parameters, the variables A, TI and HS were considered as dependent and the flavanolic compounds as independent variables. The equations thus obtained were as follows:

$$HS = -0.262 DG + 4.022 \quad (R = 0.877)$$

$$TI = 0.191 T + 1.467 \quad (R = 0.815)$$

$$A = 0.219 DG + 1.509 \quad (R = 0.836)$$

As can be seen, the best variables to explain the variation that occurs in HS and A were the galloylated dimers and for TI the trimers.

In Table 6 Pearson's correlation coefficients between colorimetric parameters and flavanolic composition of the seed are shown. In accordance with the opposite tendencies observed for the a^* and b^* parameters, when a flavanolic compound correlates with both (the cases of C, B1, B3, ECG, B2G, M and DG), we find negative and direct correlations, respectively. Once again, galloylated flavanols exhibit the highest correlation coefficients. Epicatechin-3-O-gallate has the highest correlations with -0.749 and 0.979 Pearson correlation values for a^* and b^* , respectively. We should not forget that ECG undergoes the most important and sharpest

Table 5
Pearson's correlations coefficients between the flavanolic composition and the sensory parameters.

	C	EC	B1	B2	B3	B4	EEC	ECG	B2G	M	D	T	TE	DG	TG	TTG
COL	-0.699 ^{**}	-0.615 ^{**}	-0.761 ^{**}	0.623 ^{**}	-0.557 ^{**}	-0.169	-0.556 ^{**}	-0.417 ^{**}	-0.794 ^{**}	-0.733 ^{**}	-0.651 ^{**}	-0.533 ^{**}	-0.282	-0.724 ^{**}	-0.073	-0.792 ^{**}
HS	-0.865 ^{**}	-0.861 ^{**}	-0.813 ^{**}	0.590 ^{**}	-0.386	-0.442	-0.715 ^{**}	-0.518 ^{**}	-0.744 ^{**}	-0.866 ^{**}	-0.459	-0.877 ^{**}	-0.566 ^{**}	-0.877 ^{**}	-0.478 ^{**}	-0.823 ^{**}
TI	0.705 ^{**}	0.730 ^{**}	0.698 ^{**}	-0.433 [*]	0.272	0.594 ^{**}	0.432 [*]	0.575 ^{**}	0.605 ^{**}	0.723 ^{**}	0.487 ^{**}	0.815 ^{**}	0.717 ^{**}	0.782 ^{**}	0.543 ^{**}	0.676 ^{**}
A	0.780 ^{**}	0.756 ^{**}	0.813 ^{**}	-0.528 [*]	0.549 ^{**}	0.387	0.717 ^{**}	0.519 ^{**}	0.777 ^{**}	0.768 ^{**}	0.564 ^{**}	0.698 ^{**}	0.532 ^{**}	0.836 ^{**}	0.285	0.830 ^{**}

COL: colour; HS: hardness of the seed; TI: tannic intensity; A: astringency; C: (+)-epicatechin; B1: EC(4-8)EC; B2: EC(4-8)EC; B3: C(4-8)C; B4: C(4-8)EC; EEC: EC(4-8)EC(4-8)EC; ECG: EC-3-O-gallate; B2G: EC(4-8)EC-3-O-gallate; M: monomers; D: dimers; T: trimers; TE: tetramers; DG: galloylated dimers; TG: galloylated trimers; TTG: total galloylated compounds.

^{*} Pearson's correlations are significant at the 0.05 level.

^{**} Pearson's correlations are significant at the 0.01 level.

Table 6
Pearson's correlation coefficients between colorimetric parameters and flavanolic composition of the seeds.

	a^*	b^*	L^*	C_{ab}^*	h_{ab}
C	-0.464 [*]	0.900 ^{**}	0.904 ^{**}	0.918 ^{**}	0.692 ^{**}
EC	-0.361	0.826 ^{**}	0.836 ^{**}	0.848 ^{**}	0.606 ^{**}
B1	-0.584 ^{**}	0.927 ^{**}	0.931 ^{**}	0.937 ^{**}	0.765 ^{**}
B2	0.374	-0.678 ^{**}	-0.695 ^{**}	-0.695 ^{**}	-0.516 ^{**}
B3	-0.818 ^{**}	0.790 ^{**}	0.764 ^{**}	0.760 ^{**}	0.851 ^{**}
B4	0.276	0.107	0.130	0.143	-0.091
EEC	-0.179	0.621 ^{**}	0.621 ^{**}	0.652 ^{**}	0.402
C1	-0.216	0.456 ^{**}	0.459 ^{**}	0.475 ^{**}	0.321
ECG	-0.749 ^{**}	0.979 ^{**}	0.978 ^{**}	0.972 ^{**}	0.888 ^{**}
B2G	-0.673 ^{**}	0.907 ^{**}	0.917 ^{**}	0.899 ^{**}	0.819 ^{**}
M	-0.404 [*]	0.859 ^{**}	0.867 ^{**}	0.879 ^{**}	0.643 ^{**}
D	-0.395	0.537 ^{**}	0.530 ^{**}	0.531 ^{**}	0.501 ^{**}
T	0.007	0.530 ^{**}	0.550 ^{**}	0.577 ^{**}	0.242
TE	0.211	0.228	0.255	0.269	-0.003
DG	-0.419 [*]	0.843 ^{**}	0.866 ^{**}	0.862 ^{**}	0.640 ^{**}
TG	0.488 [*]	-0.037	0.023	0.015	-0.296
TTG	-0.638 ^{**}	0.955 ^{**}	0.964 ^{**}	0.958 ^{**}	0.815 ^{**}

Abbreviations are the same as in Table 5.

^{*} Pearson's correlations are significant at the 0.05 level.

^{**} Pearson's correlations are significant at the 0.01 level.

drop in its concentration during maturation (see Fig. 3). C_{ab}^* , L^* and h_{ab} have high correlation coefficients with many flavanolic compounds and mainly with ECG, TTG, B2G, B1, C, B3, DG and EC. It is worth emphasising that the flavanol contents of the wines have been found to be correlated with the degree of browning [51] and it is known that the compounds formed from the oxidation of the flavanols during fermentation are responsible for the colour of black tea [52]. The relation we have found between the flavanols (non-coloured flavonoids) could be related, therefore, to these kinds of processes.

The equations obtained from the stepwise multiple regression analysis are listed below. The β parameter (standardised regression coefficient) was also obtained in order to achieve a better estimation of the contribution of each variable to the model.

$$L^* = 50.816 + 0.663 \text{ ECG} - 2.087 \text{ B2}; (R = 0.984); (\beta: \text{ ECG} = 0.894; \text{ B2} = -0.137);$$

$$a^* = 9.803 - 5.377 \text{ B3}; (R = 0.818); (\beta: \text{ B3} = -0.818);$$

$$b^* = 19.581 + 0.664 \text{ ECG} - 1.861 \text{ B2}; (R = 0.984); (\beta: \text{ ECG} = 0.904; \text{ B2} = -0.123);$$

$$C_{ab}^* = 19.357 + 0.403 \text{ ECG} + 4.517 \text{ B1} - 2.527 \text{ B2}; (R = 0.984); (\beta: \text{ ECG} = 0.604; \text{ B1} = 0.270; \text{ B2} = -0.184);$$

$$h_{ab} = 74.168 + 1.661 \text{ ECG} - 1.454 \text{ C}; (R = 0.936); (\beta: \text{ ECG} = 1.549; \text{ C} = -0.723).$$

The results show that ECG was the compound most related to the colour parameters such as L^* , b^* , C_{ab}^* and h_{ab} , since it showed the highest β values. Only in the case of a^* , did B3 play an important role.

4. Conclusions

Grape seeds undergo an important decrease in the content of catechins and procyanidin oligomers during ripening, the content at harvest being approximately a half of that at veraison. B2G and ECG are the flavanolic compounds whose contents decrease the most. Changes in the phenolic composition accompany changes in tannic intensity and astringency which tend to diminish as the maturity degree increases while hardness of the seed shows a contrary trend. When seeds are easily smashed, the dryness and asperity felt on the lips and palate are reduced. Nevertheless, the total content of flavanols in the seed is not the only factor affecting these attributes, since samples containing higher contents in flavanols can exhibit less astringency and tannic intensity than oth-

ers with lower ones. Therefore, the qualitative profile of the seeds is also responsible for the sensations elicited in mouth. A and HS parameters are more affected by the presence of galloylation in the molecule than T1.

CIELab colour parameters of seeds have high correlation coefficients with many flavanolic compounds. ECG was the compound most related to the aforementioned parameters. Taking into account that flavanols are non-coloured flavonoids, this relationship could be linked to oxidative processes.

On the other hand, statistical analysis has shown which compounds were the most related with sensorial and colour parameters. This could be used in order to elucidate sensorial and colour attributes from them. Nevertheless, a more comprehensive study is necessary to predict sensorial and colour attributes from flavanolic compounds and *vice versa* which would help to take decisions during the harvest.

Acknowledgements

Thanks are due to the Spanish MICINN and FEDER for financial support (Project ref. AGL2008-05569-C02-01) and for to an F.P.U. predoctoral scholarship to R. Ferrer-Gallego. The authors also thank Bodegas RODA S.A. (Haro, La Rioja, Spain) for supplying the grape samples and Mr. G.H. Jenkins for his help with the English version of the ms.

References

- [1] J.J. Macheix, A. Fleuriot, J. Billot, Fruit Phenolic, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA, 1990, p. 378.
- [2] V. Núñez, C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, Y.J. Hong, A.E. Mitchell, J. Sci. Food Agric. 86 (2006) 915.
- [3] R. Rodríguez-Montealegre, R. Romero Peces, J.L. Chacón-Vozmediano, J. Martínez, E. Gasqueña, E. García-Romero, J. Food Compos. Anal. 9 (2006) 687.
- [4] J.A. Kennedy, G.J. Troup, J.R. Pilbrow, D.R. Hutton, D. Hewitt, C.A. Hunter, R. Ristic, P.G. Iland, G.P. Jones, Aust. J. Grape Wine Res. 6 (2000) 244.
- [5] J.A. Kennedy, Y. Hayasaka, S. Vidal, E.J. Waters, G.P. Jones, J. Agric. Food Chem. 49 (2001) 5348.
- [6] J. Osmianski, J.C. Sapis, J. Agric. Food Chem. 37 (1989) 1293.
- [7] M.C. Dumond, J. Michaud, J. Masquelier, Bull. OIV 64 (1991) 533.
- [8] R. Ristic, P.G. Iland, Aust. J. Grape Wine Res. 11 (2005) 43.
- [9] F.M. Romeyer, J. Macheix, J.C. Sapis, Phytochemistry 25 (1986) 219.
- [10] V.A.P. de Freitas, Y. Glories, A. Monique, Am. J. Enol. Vitic. 51 (2000) 397.
- [11] J.A. Kennedy, M.A. Matthews, A.L. Waterhouse, Phytochemistry 55 (2000) 77.
- [12] Y. Cadot, M.T. Miñana-Castelló, M. Chevalier, J. Agric. Food Chem. 54 (2006) 9206.
- [13] M. Bourzeix, D. Weyland, N. Heredia, Bull. OIV 59 (1986) 1171.
- [14] J.M. Ricardo da Silva, J. Rigaud, V. Cheynier, A. Cheminat, M. Moutounet, Phytochemistry 30 (1991) 1259.

- [15] J.M. Ricardo da Silva, J.P. Rossec, M. Bourzeix, J. Mourgues, M. Moutonet, *Vitis* 31 (1992) 55.
- [16] B.S. Sun, T. Pinto, M.C. Leandro, J.M. Ricardo-da-Silva, M.I. Spranger, *Am. J. Enol. Vitic.* 50 (1999) 179.
- [17] A.M. Jordao, J.M. Ricardo-da-Silva, O. Laureano, *Vitis* 37 (1998) 93.
- [18] A.M. Jordao, J.M. Ricardo da Silva, O. Laureano, *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (2001) 230.
- [19] T. Fuleki, J.M. Ricardo da Silva, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1156.
- [20] A. Santos-Buelga, S. Bravo-Haro, J.C. Rivas-Gonzalo, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 201 (1995) 269.
- [21] V.A.P. de Freitas, Y. Glories, G. Bourgeois, C. Vitry, *Phytochemistry* 49 (1998) 1435.
- [22] M.T. Escribano-Bailon, M.T. Guerra, J.C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A* 200 (1995) 221.
- [23] E. Bate-Smith, *Food Process. Pack* 23 (1954) 124.
- [24] C.B. Lee, H.T. Lawless, *Chem. Senses* 16 (1991) 225.
- [25] P.A.S. Breslin, M.M. Gilmore, G.K. Beachamp, B.G. Gren, *Chem. Senses* 18 (1993) 405.
- [26] G. Ares, C. Barreiro, R. Deliza, A. Gámbaro, *Food Res. Int.* 42 (2009) 871.
- [27] O.M. Andersen, *Flavonoids*, in: O.M. Andersen, K.R. Markham (Eds.), *Chemistry, Biochemistry and Applications*. Editorial, Taylor & Francis Group, London, 2006.
- [28] E. Haslam, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1981) 309.
- [29] T. Okuda, K. Mori, T. Hatano, *Chem. Pharm. Bull.* 33 (1985) 1424.
- [30] L.J. Porter, J. Woodruffe, *Phytochemistry* 23 (1984) 1255.
- [31] J.M. Ricardo da Silva, V. Cheynier, J.M. Souquet, M. Moutounet, J.C. Cabanis, M. Bourzeix, *J. Sci. Food Agric.* 57 (1991) 111.
- [32] P. Sarni-Machado, V. Cheynier, M. Moutounet, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 42.
- [33] C. Maury, P. Sarni-Machado, S. Lefebvre, V. Cheynier, M. Moutounet, *Am. J. Enol. Vitic.* 52 (2001) 140.
- [34] E.C. Bate-Smith, *Phytochemistry* 12 (1973) 907.
- [35] Z. Czochanska, L.Y. Foo, L.J. Porter, *Phytochemistry* 18 (1979) 1819.
- [36] Y. Glories, *Connaissance Vigne Vin* 18 (1984) 195.
- [37] V. Freitas, N. Mateus, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 940.
- [38] M.C. Llaudi, R. Canals, J.M. Canals, N. Rozés, L. Arola, F. Zamora, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 742.
- [39] E. Monteleone, N. Condelli, C. Dinnella, M. Bertuccioli, *Food Qual. Prefer.* 15 (2004) 761.
- [40] G. Fia, C. Dinnella, M. Bertuccioli, E. Monteleone, *Food Chem.* 113 (2009) 325.
- [41] N. Hayashi, R. Chen, H. Ikezaki, S. Yamaguchi, D. Maruyama, Y. Yamaguchi, T. Ujihara, K. Kohata, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (2006) 626.
- [42] J. Rousseau, D. Delteil, *Revue Française d'Oenologie* 183 (2000) 10.
- [43] L. Martinez, *Revue des Oenologues* 105 (2002) 19.
- [44] M. Le Moigne, R. Symoneaux, F. Jourjon, *Food Qual. Prefer.* 19 (2008) 672.
- [45] M. García-Marino, J.C. Rivas-Gonzalo, E. Ibáñez, C. García-Moreno, *Anal. Chim. Acta* 563 (2006) 44.
- [46] S. González-Manzano, C. Santos-Buelga, J.J. Pérez-Alonso, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4326.
- [47] S. Pascual-Teresa, J.C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, *Int. J. Food Sci. Technol.* 35 (2000) 33.
- [48] M.T. Escribano-Bailon, Y. Gutierrez-Fernandez, J.C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1794.
- [49] A.C.H. Lea, in: R.L. Rouseff (Ed.), *Developments in Food Science*, vol. 25, Elsevier, Amsterdam, 1990, p. 123.
- [50] H. Peleg, K. Gaccon, P. Schilch, A.C. Noble, *J. Sci. Food Agric.* 79 (1999) 1123.
- [51] P. Fernández-Zurbano, V. Ferreira, A. Escudero, J. Cacho, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 4937.
- [52] H.D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, *Food Chemistry*, 4th ed., Springer, 2009, p. 1166.



Contents lists available at ScienceDirect

Talanta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/talanta

Feasibility study on the use of near infrared spectroscopy to determine flavanols in grape seeds

Raúl Ferrer-Gallego, José Miguel Hernández-Hierro*, Julián C. Rivas-Gonzalo, M. Teresa Escribano-Bailón

Grupo de Investigación en Polifenoles, Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 April 2010
Received in revised form 23 July 2010
Accepted 27 July 2010
Available online 3 August 2010

Keywords:

Flavanols
Grape seeds
Near infrared spectroscopy
Chemometrics

ABSTRACT

The potential of near infrared spectroscopy to determine the content of flavanols directly recording the infrared spectra of grape seeds has been evaluated. Moreover, the study shows the potential of this technique to obtain qualitative information related to the samples. In this case, the feasibility to discriminate between possible vineyards of origin has also been evaluated. Modified Partial Least Squares (MPLS) regression was used to develop the quantitative models in order to predict the content of flavanols. These models have been validated showing differences between 3.5% and 14.3% in the external validation. Moreover, Discriminant Partial Least Squares algorithm was used in the qualitative analysis to distinguish between two possible vineyards of origin and showed a high degree of accuracy. Prediction rates of samples correctly classified with a mean of 95% in internal validation and 97% in external validation were obtained. The procedure reported here seems to have an excellent potential for a fast and reasonably inexpensive analysis of these flavanols in grape seeds and could also be a tool to distinguish between possible vineyards of origin.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Grape seeds represent only 0–6% of berry weight, nevertheless they can provide a large source of phenolic compounds to red wines [1,2]. Phenolic composition in grape seeds depends on multiple factors such as variety, soil, viticulture practices, environmental conditions and degree of ripeness among others [3–5]. The presence and distribution of flavanols in grape seeds have been studied by several authors [2,6–10] showing that monomers are usually the most abundant compounds. (+)-Catechin is often the most abundant individual flavanol in seeds, although (–)-epicatechin is also well represented; however, some grape varieties display similar levels of both monomers or an even higher proportion of epicatechin. The oligomers of proanthocyanidins are mainly dimers and trimers in which the elemental units are essentially bound by type C4→C8 interflavan bonds. The dimer B2 and

trimer EEC usually present the highest amounts in their respective oligomer groups. Another characteristic of the flavanol composition of grape seeds is the presence of derivatives esterified with gallic acid [8]. Levels of galloylated flavan-3-ols are noticeable in seeds although these compounds are usually in smaller amounts than the non-galloylated ones [9,11]. During maturation, changes in the flavanolic composition occur which affect the tannic intensity and astringency of seeds [12]. Monitoring these changes could be an important tool in deciding the optimal harvest time. This requires having rapid methods of analysis available with minimal or no sample preparation.

Near infrared spectroscopy (NIRS) provides fast, accurate, direct and non-destructive analysis. It allows qualitative and quantitative analysis to be performed in different matrices thereby reducing costs compared to wet chemical analysis and without generating waste. Therefore, this technique coupled with chemometric tools could provide an alternative method to undertake the analysis of proanthocyanidins in grape seeds.

The use of infrared spectroscopy has increased considerably in enological analysis. Among others, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR) has been used to identify varieties of Greek wines [13] and to determine phenolic compounds (pigmented polymers) [14], organic acids [15] and polysaccharides [16] in wine. Furthermore, this method has been used in order to determine the quality of grapes at harvest [17] and the mean degree of poly-

Abbreviations: C, (+)-catechin; EC, (–)-epicatechin; B1, catechin-(4β→8)-catechin; B2, catechin-(4β→8)-epicatechin; B3, catechin-(4α→8)-catechin; EEC, epicatechin-(4β→8)-epicatechin-(4β→8)-catechin; M, total monomers; D, total dimers; DG, total galloylated dimers; T, total trimers; TG, total galloylated trimers; TE, total tetramers; TT, total compounds; TTG, total galloylated compounds.

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294 537; fax: +34 923 294 515.

E-mail address: jmhierro@usal.es (J.M. Hernández-Hierro).

merization in grape seed extracts [18]. Mid infrared spectroscopy has been applied to discriminate between organic or non-organic wines [19], to detect fermentation problems [20] and to verify the authenticity of some wines [21].

Near infrared spectroscopy (NIRS) has been used to classify grapes according to maturity, wines according to their geographic location [22–25] and to measure condensed tannins and dry matter in red grapes homogenates [26]. Moreover NIRS has been applied to determine mineral elements [27], reducing sugars [28], aromas [29] or phenolic compounds (malvidin-3-glucoside) in wine [30].

The aim of this work is to evaluate the potential of NIR technology to determine the main flavanols present in seeds. In addition to this, the distinction between two vineyards of origin was also evaluated. To our knowledge, this is the first time that NIRS has been used for these purposes using only intact grape seeds.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Vitis vinifera L. cv. “Graciano” red grape samples were collected from two different vineyards located in La Rioja (Spain). P.O.D La Rioja is divided into regions according to their agro-climatic characteristics. Vineyard 1 is located in Logroño (Rioja Media) and vineyard 2 is located 40 km away, in Haro (Rioja Alta). The first region is under the influence of Mediterranean climate while Rioja Alta generally is cooler and is under the influence of Atlantic climate.

In order to have a wide range of flavanol concentrations, the samples were collected at different developmental stages from veraison (September) to over-ripeness (November) in two different vintages (2008 and 2009). In the case of 2008 vintage seven dates were taken into account for vineyard 1 and eight for vineyard 2. For 2009 vintage the number of dates taken into account was six for vineyard 1 and seven for the vineyard 2. Three groups of 150 berries per vineyard were collected at each date. A total of 84 samples were collected in this study corresponding to 39 samples from vineyard 1 and 45 samples from vineyard 2. The berries were collected from both sides of vines located in different rows within the vineyard. Edge rows and the first two vines in a row were avoided. Berries were collected from the top, middle and bottom of the cluster and were immediately frozen and stored at -20°C until analyses were performed. Grape seeds were separated manually from the integral grapes and the remaining pulp was removed with the aid of filter paper. Two aliquots were taken from each sample, one for the HPLC analysis and the other for the near infrared analysis.

2.2. Chemical analysis

Grape seeds separated manually were freeze-dried and ground to obtain a homogeneous powder for extraction. The grape seed powder was extracted with 75% methanol (Merck, LiChrosolv[®], Darmstadt, Germany) and the HPLC-DAD-MS analyses were carried out in accordance with Ferrer-Gallego et al. [12]. Quantification was performed by HPLC-DAD using calibration curves of (+)-catechin, purchased from Sigma and of procyanidins obtained in our laboratory as described in González-Manzano et al. [31]. All analyses were performed in triplicate.

2.3. Near infrared spectroscopy analysis

The aliquot of intact grape seeds of each sample was used to carry out near infrared spectroscopy analysis. A Foss NIRSystem 5000 was used. Transport quartz cup capsules, known as rectangular cups with a window surface of $4.7\text{ cm} \times 5.7\text{ cm}$ and an

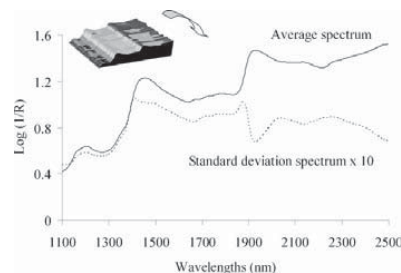


Fig. 1. Average and standard deviation (10 times amplified) spectrum of the whole group (84 samples) in the NIR zone between 1100 and 2498 nm.

optical pathway of 1.7 cm, were used in the 1/2 full mode. Measurements were made between 1100 and 2498 nm. The spectra were recorded at intervals of 2 nm, 32 scans were performed for both reference and samples. To minimise the spectral sampling error, all the samples were analysed in triplicate and averaged to obtain each sample spectrum. The cup was washed with a mixture of methanol–distilled water (50:50), rinsed with distilled water and dried to avoid contamination among samples. A total of 84 spectra were recorded corresponding to the samples previously described. Fig. 1 shows the average and standard deviation (10 times amplified) spectrum of the whole group (84 samples) in the NIR zone between 1100 and 2498 nm.

The software used was Win ISI[®] (v1.50) (Infrasoft International, LLC, Port. Matilda, PA, USA). This software allows not only the spectral acquisition but also the data treatment and the qualitative and quantitative models development. From the three samples of each date one (33%) was allocated into the validation set and the other two (66%) into the calibration set. The samples from each day were randomised allocated into calibration or validation set.

2.4. Chemometric techniques

A supervised pattern recognition technique, with *a priori* knowledge about the category membership of samples, was used in the qualitative analysis. Discriminant Partial Least Squares (DPLS) was used, which is a lineal, parametric, discriminant method and permits the modelling of classes. It has the advantage of being able to manage collinear variables, missing data and noisy variables and can deal with overlapped classes. The calibration was conducted by making a regression on the spectral information on all of group values, in this case defined as 1 or 2. The regression method applied to this procedure is MPLS, which is a modification of a normal PLS 1 [32,33].

Spectral pre-treatments are usually applied to NIR raw data, especially when these data are used to develop quantitative models. The effects of scattering were removed using Multiplicative Scatter Correction (MSC), Standard Normal Variate (SNV), Detrend [34,35]. Moreover, several mathematical treatments were tested in the development of the NIRS calibrations, a,b,c,d, where the first digit is the number of the derivative; the second is the gap over which the derivative is calculated; the third is the number of data points in a running average or smoothing, and the fourth is the second smoothing [36].

Prior to quantitative analysis an unsupervised pattern recognition technique, principal component analysis (PCA) was used in order to provide information about the latent structure of spectral data. This method provides not only information related to spectral outliers and distribution of samples in the created space, but is

Table 1
Flavanol content in mg g^{-1} of seed.

	Minimum	Maximum	Mean	SD
C	1.46	12.27	5.07	3.17
EC	2.27	18.92	7.06	4.78
B1	0.64	1.30	0.84	0.15
B2	1.13	2.49	2.01	0.30
B3	0.50	1.27	0.79	0.18
EEC	0.98	2.26	1.49	0.36
M	4.03	31.20	12.12	7.86
D	4.12	5.30	4.76	0.31
DG	2.35	9.11	4.51	1.86
T	3.93	9.28	5.75	1.52
TG	1.68	5.37	2.94	0.85
TE	1.77	3.44	2.43	0.48
TTG	7.17	27.55	12.67	5.26
TT	25.46	74.33	39.77	13.14

SD: standard deviation ($n=84$).

also an important source of knowledge to create cross-validation groups used in the calibration process. Moreover, this is a useful tool to identify whether unknown samples do not belong to the spectral space created by the samples from which the equations were developed. In this case, the equations should not be used to make any prediction [36,37].

Calibrations were performed by modified partial least squares regression (MPLS), which is often more stable and accurate than the standard PLS algorithm. In MPLS, the NIR residuals at each wavelength, obtained after each factor has been calculated, are standardized (dividing by the standard deviations of the residuals at each wavelength) before calculating the next factor. When developing MPLS equations, cross-validation is recommended in order to select the optimal number of factors and to avoid overfitting [36]. For cross-validation, the calibration set is divided into several groups; each group is then validated using a calibration developed with the other samples. In this process other types of outliers are identified which present high residuals when they are predicted by the model. Finally, validation errors are combined into a standard error of cross-validation (SECV).

3. Results and discussion

3.1. Chemical analysis

Up to 36 flavanolic compounds were determined by HPLC-DAD-MS. These compounds were organized in groups taking into account the existence of galloylation and the polymerization (monomers to tetramers). Moreover, major individual compounds were also considered. Table 1 only shows the range, mean value and

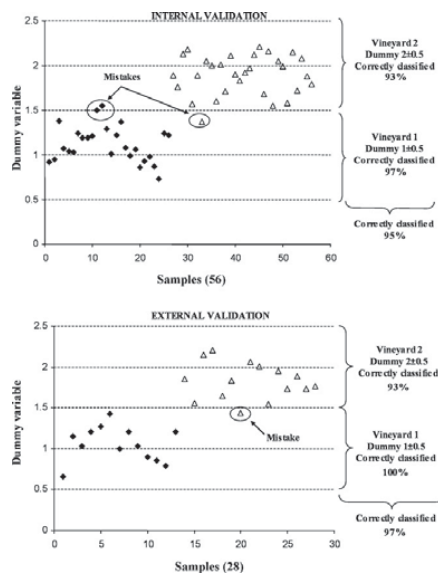


Fig. 2. Dummy variable plot of grape seed samples. Internal and external validation of the DPLS method.

standard deviation of the flavanol contents in the created groups and of the individual compounds that in the later development of NIR models achieved, suitable results.

3.2. Near Infrared spectroscopy analysis and chemometric techniques

3.2.1. Qualitative analysis

Modelling of the groups was carried out using the NIR raw spectral data and one dummy variable, whose values were 1 and 2, thus the explicit algebraic models denominated DPLS were constructed. The model was developed using 11 PLS factors and presented an RSQ of 0.718, SEC of 0.27 and SECV 0.33. The spectral regions between 1100–1358 and 1800–2100 nm showed important con-

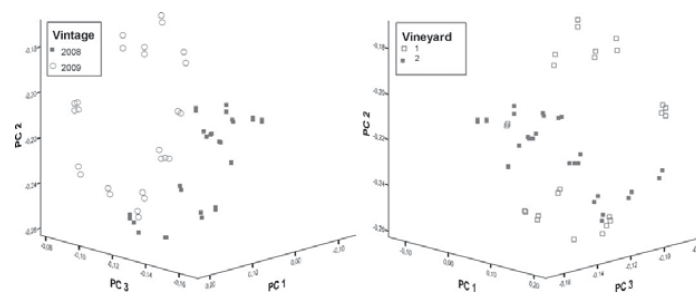


Fig. 3. Score plot of grape seed samples in the space defined by PC1 (87.6%), PC2 (6.0%) and PC3 (3.5%).

tributions to the model loadings and are mainly related to second overtones of C–H and second overtones of the bonds present in the COOH groups, respectively [38,39]. The DPLS developed model predicted a dummy value for each sample and then the samples were allocated according to their predicted values ± 0.5 in the corresponding vineyard with a dummy variable breakpoint of 1.5. The predicted dummy variable plot for the qualitative model is shown in Fig. 2. Samples of vineyard 1 cluster around a dummy value of 1.0, while those belonging to vineyard 2 around 2.0. Moreover, mistakes occurring in the internal and external validation were also indicated in this plot. These mistakes were samples incorrectly classified whose dummy values ± 0.5 did not correspond to the correct one. A prediction rate of samples correctly classified was obtained (mean of 95% in internal validation and 97% in external validation). This demonstrates that NIR spectroscopy and discriminant DPLS analysis permit a clear differentiation between the two vineyards.

3.2.2. Quantitative analysis

As part of the quantitative analysis an SNV 2,4,4,1 spectral pre-treatment was applied to NIR raw data of samples from the calibration set and then principal component analysis was carried out. The spectral variability explained was 98.87% and 6 principal components were required. The Mahalanobis distance was calculated. This measure indicates how different the spectrum of the unknown sample is from the average spectrum in the calibration set. Samples with an H -value (Mahalanobis distance) greater than 3 may be considered as not belonging to the population from which the equations were developed, for this reason 3 samples were removed. The risk of mistakes in the equations under practical conditions is very low or almost nil when using the standardized H -statistic during routine analysis of unknown samples. Samples with an H -value greater than 3 should not be used to make any prediction [36]. Fig. 3 shows the scores of the grape seeds in the space defined by the first, second and third principal components. This plot allows visualization of differences between the 2008 and 2009 vintages, whereas this is more difficult to observe in the case of the vineyard. Moreover, this plot shows that a noticeable spectral variability was taken into account to develop the NIRS models. Vineyards, ripeness and vintages were important sources of this variability.

Using the raw spectral data of the remaining samples (without H -outliers) and testing different spectral pre-treatments and allocating the corresponding HPLC-DAD quantitative flavanols' values to each sample, calibrations were performed by modified partial least squares regression (MPLS). In this method, the set of calibration samples is divided into a series of subsets in order to perform cross-validation to set the number of PLS factors and remove the chemical outliers. Using the $T \geq 2.5$ criterion, samples that present high residual value when they were predicted were eliminated from the set. The statistical parameters of the final calibration equations are shown in Table 2 where N is the number of samples used to obtain the calibration equation after eliminating the samples for spectral (H criterion) or for chemical reasons (T criterion). The best of the different mathematical treatments, concentration range, and standard deviations are also shown. The spectral regions around 1150, 1400, 1650, 1920 and 2280 nm show important contributions to the models loadings. These could be related to first and second overtones of aromatic CH bonds (1650 and 1150 nm respectively), first and second overtones of OH alcohol functional group (2280 and 1400 nm respectively) and second overtone of C=O bonds present in COOH carboxylic acids or COOR esters functional groups (1920 nm). These can be attributed to the chemical structure of the compounds analysed [38,39].

In order to evaluate NIR technology models an internal validation was carried out using samples that belonged to the calibration group after eliminating outliers. The prediction capacity of the model was assessed using the RPD (ratio performance deviation)

Table 2
Calibration statistical descriptor for the NIR models.

Spectral pre-treatments	Flavanols	N	PLS factors	Mean (mg g ⁻¹)	SD (mg g ⁻¹)	Minimum (mg g ⁻¹)	Maximum (mg g ⁻¹)	SEC (mg g ⁻¹)	RSQ	SECV (mg g ⁻¹)	VC (%)
None 2,8,6,1	C	50	7	4.83	2.86	0.00	13.40	0.40	0.980	0.66	8.3
Standard MSC 2,8,6,1	EC	49	7	6.49	4.05	0.00	18.65	0.41	0.990	0.73	6.4
Detrend 2,8,6,1	B1	51	7	0.84	0.15	0.40	1.28	0.03	0.960	0.05	3.5
SNV 2,10,10,1	B2	50	7	2.04	0.28	1.21	2.88	0.11	0.853	0.17	5.2
Standard MSC 2,8,6,1	B3	53	7	0.76	0.14	0.33	1.19	0.06	0.853	0.09	7.3
Detrend 1,4,4,1	EEC	53	7	1.48	0.35	0.44	2.52	0.08	0.947	0.18	5.4
Detrend 2,8,6,1	M	51	7	11.84	7.33	0.00	33.82	0.86	0.986	1.28	7.2
None 1,4,4,1	D	51	7	4.76	0.30	3.87	5.65	0.13	0.823	0.18	2.6
Detrend 2,8,6,1	DG	50	7	4.34	1.59	0.00	9.12	0.18	0.988	0.29	4.1
SNV 2,4,4,1	T	52	7	5.75	1.52	1.20	10.30	0.32	0.956	0.79	5.5
Standard MSC 2,8,6,1	TC	48	7	2.93	0.72	0.77	5.09	0.13	0.966	0.23	4.5
SNV 2,4,4,1	TE	52	6	2.45	0.48	1.02	3.89	0.11	0.947	0.27	4.5
Detrend 1,4,4,1	TTG	49	5	12.04	4.53	0.00	25.63	1.16	0.935	1.78	9.6
Detrend 1,4,4,1	TI	51	7	39.84	12.62	1.89	77.69	1.42	0.987	3.27	3.6

N : number of samples; SD: standard deviation; SEC: standard error of calibration; RSQ: coefficient of determination; SECV: standard error of cross-validation; VC: variation coefficient.

Table 3
Internal and external validations of quantitative NIR models.

Flavanols	Internal validation				External validation		
	RPD	RSQ	SEP (mg g ⁻¹)	SEP (C) (mg g ⁻¹)	Difference (%)	ANOVA (p-value)	SEP (mg g ⁻¹)
C	7.7	0.983	0.37	0.37	12.8	0.91	0.66
EC	10.7	0.991	0.38	0.38	11.4	0.84	1.04
B1	5.4	0.966	0.03	0.03	4.8	0.92	0.06
B2	2.8	0.874	0.10	0.10	7.4	0.61	0.20
B3	2.8	0.874	0.05	0.05	8.3	0.48	0.12
EEC	4.7	0.988	0.79	0.79	9.9	0.11	0.21
M	9.3	0.954	0.07	0.08	12.6	0.95	1.37
D	2.6	0.848	0.12	0.12	3.5	0.63	0.28
DG	9.9	0.99	0.16	0.16	7.4	0.94	0.51
T	5.2	0.962	0.29	0.29	10.6	0.21	0.82
TG	6.0	0.971	0.12	0.12	11.2	0.87	0.51
TE	4.7	0.953	0.10	0.10	10.2	0.88	0.37
TTG	4.2	0.941	1.09	1.10	14.3	0.68	2.43
TT	9.6	0.989	1.31	1.32	9.4	0.94	4.86

RPD: ratio performance deviation; SEP: standard error of prediction; SEP (C): corrected standard error of prediction.

parameter, defined as the relationship between the standard deviation of the chemical method (SD ref) and that of prediction in the NIR model (SEP). The RPD value should ideally be greater than 2.5. When this is the case it is assumed that the calibration model is adequate. All the models developed in this study present values higher than 2.5, therefore these models present an adequate prediction capacity [40]. Other descriptors of the internal validation are shown in Table 3.

We checked the robustness of the method by applying NIRS technology to 28 samples that did not belong to the calibration group. The calibration equations obtained during the work were applied and the predicted values were compared with the reference data. Table 3 also shows the results obtained in the external validation. The NIRS methodology and the reference data for flavanols were compared using one-way ANOVA (SPSS 13.0, Inc., Chicago, IL). All the *p*-values obtained were higher than 0.05, thus there were no differences between the results obtained and it can be concluded that the method provides significantly equal values to those of the starting reference data. The differences between the HPLC reference method and the NIRS technique in the external validation were between 3.5% for D and 14.3% for TTG, the SEP values are also presented.

The biosynthesis of these compounds follow essentially the same course so inter-correlations among them could be expected [41]. The correlations evidenced among these compounds show that it is not possible to ascertain if the results of NIRS models for predicting the composition of these flavanols were due to their real absorbance or the correlation between them.

4. Conclusions

The results of this work show that the models developed using NIRS technology together with chemometric tools allow the content of flavanols to be determined in intact grape seeds throughout the maturation process and also specify the vineyard of origin. The procedure reported here seems to have an excellent potential for a fast and reasonably inexpensive analysis of these flavanols in grape seeds and to distinguish between possible vineyards of origin. Moreover, a comprehensive study should be made in order to evaluate factors, such as different production areas and grape varieties, in the development of these models.

Acknowledgements

Thanks are due to the Spanish MICINN (Project ref. AGL2008-05569-CO2-01) and to Junta de Castilla y León (group GR133) for financial support. R. Ferrer-Gallego thanks the Spanish MICINN for

the F.P.I. predoctoral scholarship. The authors also thank Bodegas RODA S.A. (Haro, La Rioja, Spain) for supplying the grape samples and Dr. I. González-Martín, who kindly allowed us to use the NIRS instrument. Thanks are also given to G. H. Jenkins for revision of the English version of the manuscript.

References

- [1] B.S. Sun, T. Pinto, M.C. Leandro, J.M. Ricardo-Da-Silva, M.I. Spranger, *Am. J. Enol. Viticult.* 50 (1999) 179–184.
- [2] Y. Cadot, M.T. Minana-Castello, M. Chevalier, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 9206–9215.
- [3] J.A. Kennedy, M.A. Matthews, A.L. Waterhouse, *Phytochemistry* 55 (2000) 77–85.
- [4] V. Núñez, C. Gómez-Cordovés, B. Bartolomé, Y.-J. Hong, A.E. Mitchell, *J. Sci. Food Agric.* 86 (2006) 915–921.
- [5] R. Rodríguez-Montealegre, R. Romero-Peces, J.L. Chacón Vozmediano, J. Martínez Gascuña, E. García Romero, *J. Food Compos. Anal.* 19 (2006) 687–693.
- [6] A.G.H. Lea, P. Bridle, C.F. Timberlake, V.L. Singleton, *Am. J. Enol. Viticult.* 30 (1979) 289–300.
- [7] M. Bourzeix, D. Weyland, N. Heredia, *Bull. OIV* 59 (1986) 1171–1254.
- [8] J.M. Ricardo Da Silva, J. Rigaud, V. Cheymier, A. Cheminat, M. Moutounet, *Phytochemistry* 30 (1991) 1259–1264.
- [9] C. Santos-Buelga, E.M. Francia-Aricha, M.T. Escribano-Bailón, *Food Chem.* 53 (1995) 197–201.
- [10] A.M. Jordão, J.M. Ricardo Da Silva, O. Laureano, *Am. J. Enol. Viticult.* 52 (2001) 230–234.
- [11] T. Escribano-Bailón, Y. Gutierrez-Fernandez, J.C. Rivas-Gonzalo, C. Santos-Buelga, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1794–1799.
- [12] R. Ferrer-Gallego, M. García-Marino, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailón, *Anal. Chim. Acta* 660 (2010) 22–28.
- [13] P.A. Tarantilis, V.E. Troianou, C.S. Pappas, Y.S. Kotseridis, M.G. Polissiou, *Food Chem.* 111 (2008) 192–196.
- [14] J.S. Jensen, M. Egebo, A.S. Meyer, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 3493–3499.
- [15] J.L. Moreira, L. Santos, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 421–425.
- [16] J.C. Boulet, P. Williams, T. Doco, *Carbohydr. Polym.* 69 (2007) 79–85.
- [17] A. Versari, G.P. Parpinello, A.U. Mattioli, S. Galassi, *Am. J. Enol. Viticult.* 59 (2008) 317–322.
- [18] C.P. Passos, S.M. Cardoso, A.S. Barros, C.M. Silva, M.A. Coimbra, *Anal. Chim. Acta* 661 (2010) 143–149.
- [19] D. Cozzolino, M. Holdstock, R.G. Damberg, W.U. Cynkar, P.A. Smith, *Food Chem.* 116 (2009) 761–765.
- [20] A. Urtubia, J.R. Perez-Correa, F. Pizarro, E. Agosin, *Food Control* 19 (2008) 382–388.
- [21] C.J. Bevin, R.G. Damberg, A.J. Fergusson, D. Cozzolino, *Anal. Chim. Acta* 621 (2008) 19–23.
- [22] J. Herrera, A. Guesalaga, E. Agosin, *Meas. Sci. Technol.* 14 (2003) 689–697.
- [23] M. Le Moigne, C. Maury, D. Bertrand, F. Jourjon, *Food. Qual. Prefer.* 19 (2008) 220–231.
- [24] D. Cozzolino, H.E. Smyth, M. Gishen, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 7703–7708.
- [25] L. Liu, D. Cozzolino, W.U. Cynkar, M. Gishen, C.B. Colby, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 6754–6759.
- [26] D. Cozzolino, W.U. Cynkar, R.G. Damberg, M.D. Mercurio, P.A. Smith, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 7631–7636.
- [27] D. Cozzolino, M.J. Kwiatkowski, R.G. Damberg, W.U. Cynkar, L.J. Janik, G. Skouroumounis, M. Gishen, *Talanta* 74 (2008) 711–716.
- [28] J. Fernandez-Novales, M.I. Lopez, M.T. Sanchez, J. Morales, V. Gonzalez-Caballero, *Food Res. Int.* 42 (2009) 285–291.

- [29] H.E. Smyth, D. Cozzolino, W.U. Cynkar, R.G. Damberg, M. Sefton, M. Gishen, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1911–1916.
- [30] D. Cozzolino, M.J. Kwiatkowski, M. Parker, W.U. Cynkar, R.G. Damberg, M. Gishen, M.J. Herdreich, *Anal. Chim. Acta* 513 (2004) 73–80.
- [31] S. Gonzalez-Manzano, C. Santos-Buelga, J.J. Perez-Alonso, J.C. Rivas-Gonzalo, M.T. Escribano-Bailon, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4326–4332.
- [32] S. Lars, W. Svante, *J. Chemometr.* 1 (1987) 185–196.
- [33] D.L. Massart, B.G. Vandeginste, L.M. Buydens, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, S.D. Jong, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics*, Elsevier Science Inc., 1998.
- [34] P. Geladi, D. MacDougall, H. Martens, *Appl. Spectrosc.* 39 (1985) 491–500.
- [35] M.S. Dhanoa, S.J. Lister, R.J. Barnes, *Appl. Spectrosc.* 49 (1995) 765–772.
- [36] J.S. Shenk, M.O. Westerhaus, *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*, NIRSystems, Silver Spring, MD, USA, 1995.
- [37] R.G. Brereton, *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, J. Wiley, Chichester, West Sussex, England, 2003.
- [38] B.G. Osborne, T. Fearn, P.T. Hindle, *Practical NIR Spectroscopy with Applications in Food and Beverage Analysis*, Longman Scientific & Technical/Wiley, Harlow, Essex, England/New York, 1993.
- [39] H.W. Siesler, Y. Ozaky, S. Kawata, H.M. Heise, *Near Infrared Spectroscopy: Principles, Instruments, Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2002.
- [40] P.C. Williams, D.C. Sobering, *J. Near Infrared Spectrosc.* 1 (1993) 25–32.
- [41] J.B. Harborne, *The Flavonoids: Advances in Research Since 1986*, Chapman & Hall, London, England, 1994.



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy

Raúl Ferrer-Gallego, José Miguel Hernández-Hierro*, Julián C. Rivas-Gonzalo, M. Teresa Escribano-Bailón

Grupo de Investigación en Polifenoles. Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E 37007 Salamanca, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 July 2010
Received in revised form
24 November 2010
Accepted 2 December 2010

Keywords:

Polyphenols
Red grapes
Grape skins
Near infrared spectroscopy
Chemometrics

ABSTRACT

The potential of near infrared spectroscopy (NIRS) to determine the content of phenolic compounds in red grapes has been evaluated. The near infrared spectra of intact grapes and grape skins throughout maturity were recorded using a fibre-optic probe and a *transport quartz cup*, respectively. Reference values of phenolic compounds were obtained by HPLC-DAD-MS. Modified Partial Least Squares (MPLS) regression was used to develop the quantitative models for flavanols, flavonols, phenolic acids, anthocyanins and total phenolic compounds. The procedure reported here seems to have an excellent potential for fast and reasonable cost analysis. The results of this work show that the models developed using NIRS technology together with chemometric tools allow the quantification of total phenolic compounds and the families of main phenolic compounds in grape skins throughout maturation. The validation of these models showed the best results for the determination of flavonols (differences between HPLC and NIRS of 7.8% using grapes and 10.7% using grape skins) in the external validation procedure. Good results in the external validation were also obtained for the determination of total phenolic compounds (differences of 11.7% using grapes and 14.7% using grape skins). The best results were generally obtained recording the spectra directly in intact grapes.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The content of the different families of phenolic compounds and the total content of phenolic compounds in grapes provide noticeable information about the different ageing potential of wine (Moreno-Arribas & Polo, 2008). The phenolic composition of grapes has also an important role in the definition of the organoleptic properties of wines. Anthocyanins are direct responsible of the color. Flavanols are particularly relevant for astringency (Kallithraka, Bakker, & Clifford, 1998) and flavonols may have some influence on bitterness (Preys et al., 2006). Furthermore, flavanols, flavonols and phenolic acids provide support to wine color and ensure its stabilization during ageing as they can act as anthocyanin copigments. (Boulton, 2001; Gómez-Míguez, González-Manzano, Escribano-Bailón, Heredia, & Santos-Buelga, 2006).

Global methods have been used to quantify polyphenols, such as the Glories method, PTI, Cromoenos® or the Folin-Ciocalteu index among others (Fragoso, Mestres, Busto, & Guasch, 2010; Kontoudakis, Esteruelas, Fort, Canals, & Zamora, 2009; OIV, 1990),

but these methods are not able to distinguish between different families of phenolic compounds (i.e. flavanols, flavonols, etc.). To achieve this, the use of the high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to diode array detection (DAD) and/or mass spectrometry (MS) is necessary (Cheynier & Rigaud, 1986; Goldberg, Karumanchiri, Tsang, & Soleas, 1998; Goldberg, Tsang, Karumanchiri, & Soleas, 1998; Hong & Wrolstad, 1990; Monagas, Suarez, Gomez-Cordoves, & Bartolome, 2005; Wulf & Nagel, 1978). However these techniques are time-consuming and expensive for monitoring changes in phenolic compounds throughout ripening.

Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) is a non-destructive technique, accurate, fast and that can be employed as a replacement for time-consuming chemical methods. NIRS has been proved to be a powerful analytical tool to determine phenolic compounds and other bioactive compounds in foodstuffs (McGovern, Weeranananaphan, Downey, & Manley, 2010). Infrared spectroscopy has been used for the prediction of procyanidins in cocoa (Whitacre et al., 2003), for the determination of total polyphenol content in green tea using FT-NIR (Chen, Zhao, Liu, Cai, & Liu, 2008), to evaluate phenolic changes occurring during development of olive fruit using ATR-FTIR (López-Sánchez, Ayora-Cañada, & Molina-Díaz, 2009) and to determine malvidin-3-

* Corresponding author. Tel.: +34 923 294 537; fax: +34 923 294 515.
E-mail address: jmhierro@usal.es (J.M. Hernández-Hierro).

glucoside, tannins and pigmented polymers in wine (Cozzolino, Kwiatkowski et al., 2004; Jensen, Egebo, & Meyer, 2008; Skogerson, Downey, Mazza, & Boulton, 2007). This technology has also been used to measure, gluconic acid, glycerol, soluble solids and pH in grape juice (Versari, Parpinello, Mattioli, & Galassi, 2008) and to determine condensed tannins, anthocyanins and the dry matter in homogenised red grape berries (Cozzolino, Cynkar, Damberg, Mercurio, & Smith, 2008; Janik, Cozzolino, Damberg, Cynkar, & Gishen, 2007). Moreover, some studies have also been performed directly in intact grape berries in order to determine total anthocyanins (Cozzolino, Damberg, Janik, Cynkar, & Gishen, 2006; Cozzolino, Esler et al., 2004), the concentration of extractable anthocyanins at pH equal to 1.0 and 3.2, the concentration of total polyphenols, the concentration of sugars and the density (Kemps, Leon, Best, De Baerdemaeker, & De Ketelaere, 2010) using near infrared spectroscopy.

Due to the different roles that the main families of phenolic compounds could play in the chemical, functional and sensory properties of wine, their individual determination is of interest, especially using a single and rapid method of analysis. The aim of this study is to evaluate the potential of NIRS technology to determine the concentrations of the main phenolic families (flavanols, anthocyanins, flavonols and phenolic acids) and the total of phenolic compounds in grape skins and intact grapes. Furthermore, because of the advantages that fibre-optic probe attachment provides in comparison with the use of classic attachments: faster measures, easier clean up and simpler sample preparation; the use of this probe to record the spectra of intact grapes has also been evaluated. To our knowledge, this is the first time that NIRS has been used for simultaneously determining the main phenolic families and total phenolic compounds using a single spectroscopic method.

2. Material and methods

2.1. Samples

Vitis vinifera L. cv. "Graciano" red grape samples were collected from two different vineyards located in La Rioja (Spain). P.O.D La Rioja is divided into regions according to their agro-climatic characteristics. Vineyard 1 is located in Logroño (Rioja Media) and vineyard 2 is located 40 km away, in Haro (Rioja Alta). The first region is under the influence of Mediterranean climate while Rioja Alta generally is cooler and is under the influence of Atlantic climate.

In order to have a wide range of phenolic compounds concentrations to develop more suitable calibrations, the samples were collected at different developmental stages from veraison (September) to over-ripeness (November) in two different vintages (2008 and 2009). In the case of 2008 vintage seven dates were taken into account for vineyard 1 and eight for vineyard 2. For 2009 vintage the number of dates taken into account was six for vineyard 1 and seven for the vineyard 2. Three groups of 150 berries per vineyard were collected at each date. A total of 84 samples were collected in this study corresponding to 39 samples from vineyard 1 and 45 samples from vineyard 2. The berries were collected from both sides of vines located in different rows within the vineyard. Edge rows and the first two vines in a row were avoided. Berries were collected from the top, middle and bottom of the cluster and were immediately frozen and stored at -20°C until analyses were performed. Firstly, the samples were thawed and tempered at room temperature and the near infrared spectra of the intact grapes were recorded at room temperature which was controlled by an air-conditioning device, grape skins were then separated manually

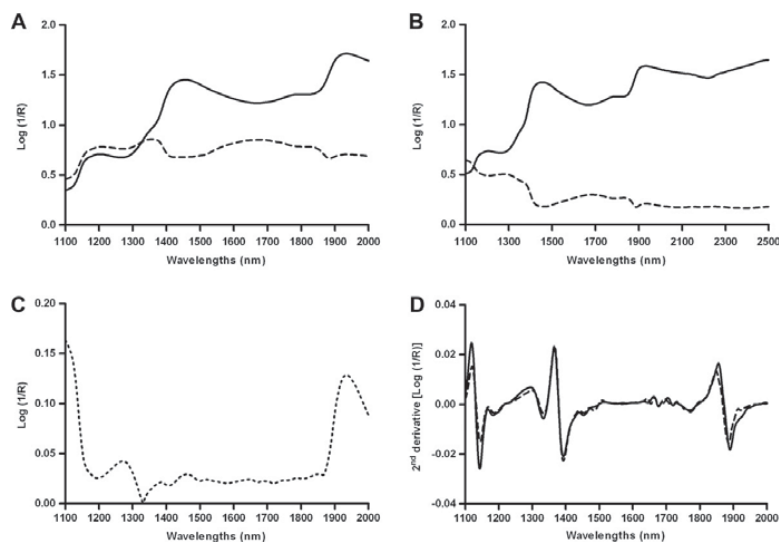


Fig. 1. Average (—) and standard deviation (---) (10 times amplified) spectrum of (A) the whole group of intact grapes (84 samples) in the NIR zone between 1100 and 2000 nm and (B) the whole group of grape skins (84 samples) in the NIR zone between 1100 and 2498 nm. (C) Absolute differences (---) between the mean spectrum of the whole group of intact grapes and the mean spectrum of the whole group of grape skins in the NIR zone between 1100 and 2000 nm. (D) Second derivative of the mean spectrum of grape skins (---) and intact grapes (—) in the NIR zone between 1100 and 2000 nm.

from the whole grapes. Two subsamples were taken from each sample, one for the HPLC analysis and the other one for the near infrared analysis which was also carried out at room temperature.

2.2. Phenolic extraction

Ten grams of grape skins were macerated at 4 °C in methanol (Merck, LiChrosolv®, Darmstadt, Germany) containing 0.1% of 12 M HCl. Methanolic phases were successively pooled, a few milliliters of water were added and the extract was concentrated under vacuum at 30 °C until methanol was removed and finally made up to 100 mL with ultrapure water. The aqueous extract was diluted 1:2 with 0.1 M HCl, filtered through 0.45 µm pore-size filters and directly injected into the chromatographic system to determine the flavonols and anthocyanins. In the case of flavanols and phenolic acids, an aliquot of the aqueous diluted extract was subjected to a clean up procedure using a cationic exchange cartridge (Oasis® MCX). The cartridge was previously conditioned with 2 mL of methanol and 2 mL of Milli-Q water and then the diluted extract (2 mL) was added to the cartridge. Sugars and other polar substances were removed by passing 4 mL of water. The flavanols and phenolic acids were eluted with methanol. The eluate was concentrated under vacuum and redissolved in 500 µL of water. The eluate was injected into the chromatographic system after filtration through a 0.45 µm pore-size filter. All analyses were performed in triplicate.

2.3. HPLC analysis of phenolic compounds

Chromatographic analyses were performed on a Hewlett–Packard 1200 Series HPLC equipped with an auto-injector, quaternary HPLC pump, column heater, diode array detection (DAD) and data treatment station. The HPLC-DAD-MS analyses were carried out in accordance with Ferrer-Gallego et al. (Ferrer-Gallego, García-Marino, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailón, 2010) to determine flavanols and phenolic acids. Furthermore, the analyses of anthocyanins and flavonols were carried out in accordance with García-Marino et al. (García-Marino, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailón, 2010). Quantification was performed by HPLC-DAD using external calibration curves of purchased standards, unless standards of proanthocyanidins, which were obtained in our laboratory as described by González-Manzano et al., were employed (González-Manzano, Santos-Buelga, Pérez-Alonso, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailón, 2006). The standard error was generally below 10% so the error and high degree of accuracy of the reference method was considered appropriate to use these data as reference values.

2.4. Near infrared spectroscopy analysis and chemometrics

The eighty four subsamples of grape skins and intact grapes were used to carry out near infrared spectroscopy analysis. A Foss NIRS system 5000 was used. The spectra were recorded at intervals of 2 nm, performing 32 scans for both reference and samples. The fibre-optic probe employs a remote reflectance system and a ceramic plate as reference. The window is of quartz with a 5 × 5 cm surface area, measuring reflectance in the NIR zone over a wavelength range of 1100–2000 nm. The NIR spectra were recorded by direct application of the fibre-optic probe onto the intact grapes. The whole data set was constituted by 84 intact grape samples and 451 data points per sample. Fig. 1 shows the average and standard deviation spectrum of the whole group (84 intact grape samples) in the NIR zone between 1100 and 2000 nm.

The transport quartz cup with a window surface of 4.7 cm × 5.7 cm and an optical pathway of 1.7 cm was used in the 1/2 full mode (i.e. grape skins covering 1/2 of the surface windows) to

record the reflectance spectra of grape skins. In this case, the measurements were made in the NIR zone over a wavelength range of 1100–2498 nm. The whole data set was constituted by 84 grape skin samples and 700 data points per sample. Fig. 1 shows the average and standard deviation spectrum of the whole group (84 grape skin samples) in the NIR zone between 1100 and 2498 nm.

The software used was Win ISI® (v1.50) (Infrasoft International, LLC, Port. Matilda, PA, USA). This software allows not only the spectral acquisition but also the data treatment and the development of the quantitative models. From the three samples of each date, one (33%) was randomly allocated to the validation set and the other two (66%) to the calibration set. Consequently, from the 84 samples of each sample presentation, i.e. intact grapes and grape skins, 56 samples were allocated in the calibration set and the remaining 28 samples were allocated in the validation set.

Prior to the quantitative analysis, principal component analysis (PCA), an unsupervised pattern recognition technique, was used in order to provide information about the latent structure of the spectral data and to identify spectral outliers according to their Mahalanobis distance (H-outliers). These outliers were eliminated at this stage.

The spectral data were pre-treated with Multiplicative Scatter Correction (MSC), Standard Normal Variate (SNV) and Detrend to remove the effects of scattering (Dhanoa, Lister, & Barnes, 1995; Geladi, MacDougall, & Martens, 1985). Moreover, several mathematical treatments were tested in the development of the NIRS calibrations, a, b, c, d, where the first digit is the number of the derivative; the second is the gap over which the derivative is calculated; the third is the number of data points in a running average or smoothing, and the fourth is the second smoothing (Shenk & Westerhaus, 1995). The calibrations were performed by modified partial least squares regression (MPLS), which is often more stable and accurate than the standard PLS algorithm. In MPLS the NIRS residuals at each wavelength obtained after each factor has been calculated were standardised (dividing by the standard deviations of the residuals at each wavelength) before calculating the next factor (Shenk & Westerhaus, 1995). For cross-validation, the calibration set was divided into several groups (6 groups in this case); each group was then validated using a calibration developed with the other samples. In this process another type of outliers (T outliers) was identified which presents high residuals when predicted by the model generated in the cross-validation process. The final calibration models were developed after eliminating these outliers. Finally, validation errors were combined into a standard error of cross-validation (SECV).

3. Results and discussion

3.1. Chemical analysis

Up to 41 phenolic compounds were determined by HPLC-DAD-MS. The phenolic compounds were grouped taking into account their basic structures. The range, mean value and the standard deviation of the concentrations of flavanols, flavonols, anthocyanins and phenolic acids are shown in Table 1.

Table 1
Phenolic compounds content in mg g⁻¹ of grape skins.

	Minimum	Maximum	Mean	SD ^a
Anthocyanins	0.24	11.14	4.41	2.56
Flavonols	0.54	1.75	1.24	0.34
Flavanols	0.41	6.92	3.14	2.08
Phenolic acids	0.10	0.76	0.43	0.17
Total	1.95	18.35	9.23	4.61

^a SD = Standard Deviation (n = 84).

Table 2
Calibration statistical descriptors^a for the NIRS models in intact grapes (mg g⁻¹ of grape skins).

Spectral pre-treatments	Phenolic compounds	T outliers	N	PLS factors	Mean (mg g ⁻¹)	SD (mg g ⁻¹)	Minimum (mg g ⁻¹)	Maximum (mg g ⁻¹)	SEC (mg g ⁻¹)	RSQ	SECV (mg g ⁻¹)	VC ^b (%)
Std. MSC 2,4,4,1	Anthocyanins	0	56	6	4.41	2.56	0.00	12.10	0.56	0.952	1.10	12.76
SNV 2,8,6,1	Phenolic acids	2	54	5	0.42	0.17	0.00	0.93	0.08	0.747	0.11	20.25
SNV 2,8,6,1	Flavanols	4	52	7	3.11	2.04	0.00	9.23	0.38	0.966	0.59	12.08
None 2,4,4,1	Flavanols	0	56	6	1.24	0.34	0.23	2.26	0.09	0.953	0.16	7.01
SNV 2,4,4,1	Total	2	54	6	9.17	4.69	0.00	23.23	0.63	0.982	1.33	6.87

^a N: number of samples; SD: standard deviation; SEC: standard error of calibration; RSQ: coefficient of determination; SECV: standard error of cross-validation.

^b VC (%)=(SEC/Mean)·100.

Table 3
Calibration statistical descriptors^a for the NIRS models in grape skins (mg g⁻¹ of grape skins).

Spectral pre-treatments	Phenolic compounds	T outliers	N	PLS factors	Mean (mg g ⁻¹)	SD (mg g ⁻¹)	Minimum (mg g ⁻¹)	Maximum (mg g ⁻¹)	SEC (mg g ⁻¹)	RSQ	SECV (mg g ⁻¹)	VC ^b (%)
None 1,4,4,1	Anthocyanins	2	54	7	4.17	2.24	0.00	10.90	0.39	0.970	0.66	9.33
Detrend 2,4,4,1	Phenolic acids	1	55	6	0.42	0.16	0.00	0.91	0.04	0.941	0.12	9.55
Std. MSC 2,4,4,1	Flavanols	2	54	7	3.14	2.12	0.00	9.50	0.17	0.994	0.68	5.38
SNV 2,4,4,1	Flavanols	3	53	7	1.28	0.31	0.36	2.20	0.03	0.993	0.11	2.07
SNV 2,4,4,1	Total	0	56	5	9.23	4.61	0.00	23.06	0.65	0.980	1.34	7.07

^a N: number of samples; SD: standard deviation; SEC: standard error of calibration; RSQ: coefficient of determination; SECV: standard error of cross-validation.

^b VC (%)=(SEC/Mean)·100.

3.2. NIRS analysis

A spectral pre-treatment (SNV 2,4,4,1) was applied to NIR raw data of samples from the calibration set and then PCA was carried out. This method provides not only information related to the spectral outliers and distribution of the samples in the created space, but it is also an important source of knowledge for the creation of cross-validation groups used in the calibration process. The cross-validation groups were created according to the H distance thus the groups presented a homogeneous distribution of samples among groups but heterogeneous within groups according to their H distance. Moreover, this is a useful tool to identify whether unknown samples do not belong to the spectral space ($H > 3$) created by the samples from which the models were developed (Brereton, 2003; Shenk & Westerhaus, 1995). The spectral variability explained in grapes was 97.9% and 9 principal components were required. For the grape skins the spectral variability explained was 97.1% and 14 principal components were required. It is noticeable that in the case of grape skins more principal components were required to explain similar spectral variability. This could be due to the fact that the spectral data matrix of grape skins presented a more complex structure and the manipulation of the sample often introduces a major source of variation. Thus, the use of intact grapes avoids interferences that may be due to the manipulation of the sample. The spectra of the samples were ranked in order of their H (Mahalanobis) distance from the mean spectrum of all the spectra and the $H > 3$ criterion

was applied. H-outliers were not found either in grapes or grape skins.

The calibrations were performed by modified partial least squares regression (MPLS) testing different spectral pre-treatments. The optimum number of PLS terms used for the calibration was determined by cross-validation taking into account 6 groups. Tables 2 and 3 show the statistical parameters of the final calibration equations for the grapes and the grape skins, respectively. These tables show the number of samples used to obtain the calibration equation (N) after eliminating outliers based on the T value ($T > 2.5$). The best of the different mathematical treatments, concentration range and standard deviation are also shown. The performance of the calibration is expressed as the standard error of cross-validation (SECV).

The spectral regions close to 1140 and 1320 nm presented important contributions to the loadings of the models and are mainly related to combination bands of the –OH functional group, symmetric and anti-symmetric stretching. This wavelength region is also related to C–H aromatic second overtones and C–H third overtones (Osborne, Fearn, & Hindle, 1993; Siesler, Ozaky, Kawata, & Heise, 2002). These can be attributed to the chemical structure of the compounds analysed. Fig. 1 shows the standard deviation spectrum of the whole group and the highest deviation was around 1100–1300 nm which was also the most important zone used in the development of the PLS models in both cases (i.e. intact grapes and grape skins). Moreover, differences in the spectra and the second derivative spectra were observed around the O–H bands regarding

Table 4
Internal and external validation of quantitative NIRS models in intact grapes (mg g⁻¹ of grape skins).

Phenolic compounds	Internal validation (N ^a samples)					External validation (28 samples)	
	N ^a	RPD ^b	RSQ ^c	SEP ^c (mg g ⁻¹)	SEP (C) ^c (mg g ⁻¹)	Differences (%)	SEP ^c (mg g ⁻¹)
Anthocyanins	56	4.8	0.957	0.53	0.53	43.9	1.09
Phenolic acids	54	2.1	0.766	0.08	0.08	27.3	0.13
Flavanols	52	5.8	0.971	0.35	0.35	27.8	0.72
Flavanols	56	4.2	0.941	0.08	0.08	7.8	0.12
Total	54	7.9	0.984	0.59	0.59	11.7	1.26

^a N: samples used in the internal validation procedure.

^b RPD: ratio performance deviation of internal validation (SD/SEP).

^c RSQ: coefficient of determination; SEP: standard error of prediction; SEP (C): corrected standard error of prediction.

Table 5
Internal and external validations of quantitative NIRS models in grape skins (mg g^{-1} of grape skins).

Phenolic compounds	Internal validation (N^a samples)				External validation (28 samples)		
	N^a	RPD ^b	RSQ ^c	SEP ^c (mg g^{-1})	SEP (C) ^c (mg g^{-1})	Differences (%)	SEP ^c (mg g^{-1})
Anthocyanins	54	4.4	0.974	0.36	0.36	17.5	0.81
Phenolic acids	55	6.3	0.947	0.04	0.04	29.5	0.11
Flavanols	54	13.6	0.995	0.16	0.16	31.9	0.68
Flavonols	53	12.7	0.993	0.02	0.03	10.7	0.15
Total	56	7.5	0.982	0.62	0.62	14.7	1.30

^a N : samples used in the internal validation procedure.

^b RPD: ratio performance deviation of internal validation (SD/SEP).

^c RSQ: coefficient of determination; SEP: standard error of prediction; SEP (C): corrected standard error of prediction.

the presentation form. This confirms a previous studies that showed differences in the same zone using intact grapes, homogenates of grapes and a single grape (Cozzolino et al., 2006).

In order to evaluate NIRS technology models, an internal validation was carried out using samples that belonged to the calibration group after eliminating outliers (in this case only T outliers). The SD/SEP ratio or ratio performance deviation (RPD) indicates that the performances of calibrations were adequate. Tables 4 and 5 show other descriptors of the internal validation. Fig. 2 and Fig. 3 show the NIRS predicted values versus HPLC values in intact grapes and grape skins respectively.

An external validation (Tables 4 and 5) was performed to check the robustness of the method using the 28 samples that did not belong to the calibration group. Calibration models obtained were applied and the predicted values were compared with the reference data.

The differences between the HPLC reference method and the NIRS technique in external validation are generally smaller in intact

grapes than in grape skins except in the case of anthocyanins. For both (grape skins and grapes) minor differences between methods were found in the determination of flavonols. Moreover, the content of total polyphenols show similar and good results in both cases.

Although previous studies have been carried out in intact grape berries in order to determine total anthocyanins (Cozzolino et al., 2006; Cozzolino, Esler et al., 2004), the concentration of extractable anthocyanins at pH equal to 1.0 and 3.2, the concentration of total polyphenols, the concentration of sugars and the density (Kemps et al., 2010) using near infrared spectroscopy none of them has performed the determination of the main families of phenolic compounds (i.e. flavanols, anthocyanins, flavonols and phenolic acids). In the case of total polyphenols, Kemps et al. did not achieve satisfactory results because they considered the total ITP index instead of the total polyphenols from the skins (Kemps et al., 2010). Regarding anthocyanins other studies have been performed taking into account different varieties of grapes and production areas. The

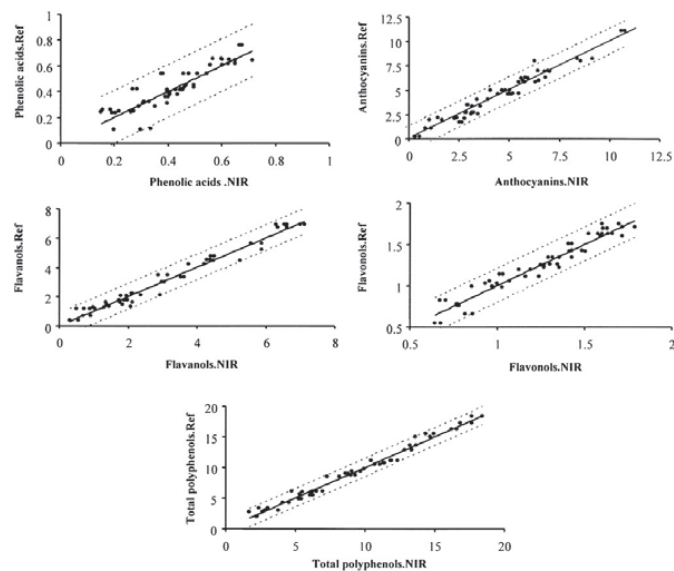


Fig. 2. Comparison of HPLC reference value with the values predicted by the NIRS models in intact grapes (mg g^{-1} of grape skins).

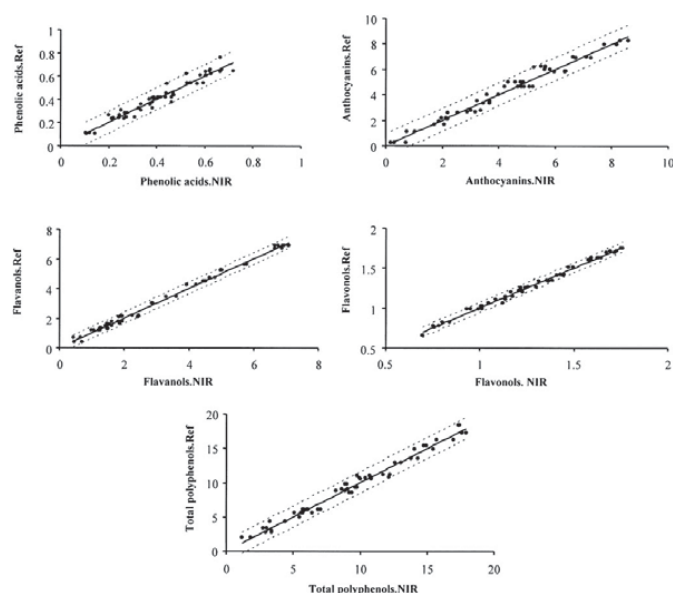


Fig. 3. Comparison of HPLC reference value with the values predicted by the NIRS models in grape skins (mg g^{-1} of grape skins).

SEP values reported for total anthocyanins vary from 0.05 to 0.18 mg g^{-1} of berry (Cozzolino et al., 2006; Cozzolino, Esler et al., 2004). The obtained results (e.g. range and SEP) in our case were comparable to the results obtained in these studies.

4. Conclusions

The results of this work show that the models developed using NIRS technology together with chemometric tools allow the determination, directly in grapes and in grape skins, of the concentrations of total polyphenols and the families of main polyphenols throughout maturation. The best results were generally obtained using a fibre-optic probe and directly recording the spectra of intact grapes, which can be attributable to the practical absence of manipulation of the samples that is needed. The technique reported here is a good option for a rapid quantification of total polyphenols and the families of main polyphenols, the results being comparable with the high-cost and time-consuming analysis methods. The development and application of this technique could become an accurate and efficient tool to aid decision making at harvest time. Nonetheless, a comprehensive study should be made in order to evaluate factors, such as different production areas and grape varieties, in the development of these models.

Acknowledgements

Thanks are due to the Spanish MICINN (Project ref. AGL2008-05569-C02-01), Junta de Castilla y León (Grupo de Investigación de Excelencia (GIP/USAL), GR133) and to the Consolider-Ingenio 2010 Programme (FUN-C-FOOD, CSD2007-00063) for financial support.

R. Ferrer-Gallego thanks the Spanish MICINN for the F.P.I. predoctoral scholarship. The authors also thank Bodegas RODA S.A. (Haro, La Rioja, Spain) for supplying the grape samples and Dr. I. González-Martín, who kindly allowed us to use the NIRS instrument.

References

- Boulton, R. (2001). The copigmentation of Anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67–87.
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. Chichester, West Sussex, England: J. Wiley.
- Chen, Q., Zhao, J., Liu, M., Cai, J., & Liu, J. (2008). Determination of total polyphenols content in green tea using FT-NIR spectroscopy and different PLS algorithms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 568–573.
- Cheyrier, V., & Rigaud, J. (1986). HPLC separation and characterization of flavonols in the skins of *Vitis vinifera* var. Cinsault. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 248–252.
- Cozzolino, D., Cynkar, W. U., Damberg, R. G., Mercurio, M. D., & Smith, P. A. (2008). Measurement of condensed tannins and dry matter in red grape homogenates using near infrared spectroscopy and partial least squares. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7631–7636.
- Cozzolino, D., Damberg, R. G., Janik, L., Cynkar, W. U., & Gishen, M. (2006). Review: analysis of grapes and wine by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 14, 279–289.
- Cozzolino, D., Esler, M. B., Damberg, R. G., Cynkar, W. U., Boehm, D. R., Francis, I. L., et al. (2004). Prediction of colour and pH in grapes using a diode array spectrophotometer (400–1100 nm). *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 12, 105–111.
- Cozzolino, D., Kwiatkowski, M. J., Parker, M., Cynkar, W. U., Damberg, R. G., Gishen, M., et al. (2004). Prediction of phenolic compounds in red wine fermentations by visible and near infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta*, 513, 73–80.
- Dhanoa, M. S., Lister, S. J., & Barnes, R. J. (1995). On the scales associated with near-infrared reflectance difference spectra. *Applied Spectroscopy*, 49, 765–772.
- Ferrer-Gallego, R., Garcia-Marino, M., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2010). Statistical correlation between flavanolic

- composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Analytica Chimica Acta*, 660, 22–28.
- Fragoso, S., Mestres, M., Busto, O., & Guasch, J. (2010). Comparison of three extraction methods used to evaluate phenolic ripening in red grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4071–4076.
- Gómez-Míguez, M., González-Manzano, S., Escribano-Bailón, M. T., Heredia, F. J., & Santos-Buelga, C. (2006). Influence of different phenolic copigments on the color of malvidin 3-Glucoside. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5422–5429.
- García-Marino, M., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta*, 660, 134–142.
- Geladi, P., MacDougall, D., & Martens, H. (1985). Linearization and scatter-correction for near-infrared reflectance spectra of meat. *Applied Spectroscopy*, 39, 491–500.
- Goldberg, D. M., Karumanchiri, A., Tsang, E., & Soleas, G. J. (1998). Catechin and epicatechin concentrations of red wines: regional and cultivar-related differences. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 23–34.
- Goldberg, D. M., Tsang, E., Karumanchiri, A., & Soleas, G. J. (1998). Quercetin and p-coumaric acid concentrations in commercial wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 142–151.
- González-Manzano, S., Santos-Buelga, C., Pérez-Alonso, J. J., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2006). Characterization of the mean degree of polymerization of proanthocyanidins in red wines using liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 4326–4332.
- Hong, V., & Wrolstad, R. E. (1990). Use of HPLC separation/photodiode array detection for characterization of anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, 708–715.
- Janik, L. J., Cozzolino, D., Damberg, R., Cynkar, W., & Gishen, M. (2007). The prediction of total anthocyanin concentration in red-grape homogenates using visible-near-infrared spectroscopy and artificial neural networks. *Analytica Chimica Acta*, 594, 107–118.
- Jensen, J. S., Egebo, M., & Meyer, A. S. (2008). Identification of spectral regions for the quantification of red wine tannins with Fourier transform mid-infrared spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3493–3499.
- Kallithraka, S., Bakker, J., & Clifford, M. N. (1998). Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *Journal of Sensory Studies*, 13, 29–43.
- Kemps, B., Leon, L., Best, S., De Baerdemaeker, J., & De Ketelaere, B. (2010). Assessment of the quality parameters in grapes using VIS/NIR spectroscopy. *Biosystems Engineering*, 105, 507–513.
- Kontoudakis, N., Esteruelas, M., Fort, F., Canals, J. M., & Zamora, F. (2009). Comparison of methods for estimating phenolic maturity in grapes: correlation between predicted and obtained parameters. *Analytica Chimica Acta*, 660, 127–133.
- López-Sánchez, M., Ayora-Cañada, M. J., & Molina-Díaz, A. (2009). Olive fruit growth and ripening as seen by vibrational spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 82–87.
- McGovern, C. M., Weerananatanaphan, J., Downey, G., & Manley, M. (2010). Review: the application of near infrared spectroscopy to the measurement of bioactive compounds in food commodities. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 18, 87–111.
- Monagas, M., Suarez, R., Gomez-Cordoves, C., & Bartolome, B. (2005). Simultaneous determination of nonanthocyanin phenolic compounds in red wines by HPLC-DAD/ESI-MS. *American Journal of Enology and Viticulture*, 56, 139–147.
- Moreno-Arribas, M. V., & Polo, C. (2008). *Wine chemistry and biochemistry*. New York, NY: Springer New York.
- OIV. (1990). *Recueil de methods internationales d'Analyse des vins. Caracteristiques chromatiques*. Paris: OIV.
- Osborne, B. G., Fearn, T., & Hindle, P. T. (1993). *Practical NIR spectroscopy with applications in food and beverage analysis*. Harlow, Essex, England, New York: Longman Scientific & Technical; Wiley.
- Preys, S., Mazerolles, G., Courcoux, P., Samson, A., Fischer, U., Hanafi, M., et al. (2006). Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*, 563, 126–136.
- Shenk, J. S., & Westerhaus, M. O. (1995). *Routine operation, calibration, development and network system management manual, NIR systems*. MD, USA: Silver Spring.
- Siesler, H. W., Ozaky, Y., Kawata, S., & Heise, H. M. (2002). *Near infrared spectroscopy: Principles, instruments, applications*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Skogerson, K., Downey, M., Mazza, M., & Boulton, R. (2007). Rapid determination of phenolic components in red wines from UV-visible spectra and the method of partial least squares. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 318–325.
- Versari, A., Parpinello, G. P., Mattioli, A. U., & Galassi, S. (2008). Determination of grape quality at harvest using Fourier-transform mid-infrared spectroscopy and multivariate analysis. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 317–322.
- Whitacre, E., Oliver, J., van den Broek, R., van Engelen, P., Kremers, B., van der Horst, B., et al. (2003). Predictive analysis of cocoa procyanidins using near-infrared spectroscopy techniques. *Journal of Food Science*, 68, 2618–2622.
- Wulf, L. W., & Nagel, C. W. (1978). High-pressure liquid chromatographic separation of anthocyanins of *Vitis vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture*, 29, 42–49.

Multivariate analysis of sensory data of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano during ripening. Correlation with the phenolic composition of the grape skins

Análisis multivariante de datos sensoriales de *Vitis vinifera* L. cv. Graciano durante la maduración. Correlación con la composición fenólica del hollejo

R. Ferrer-Gallego, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo and M.T. Escribano-Bailón*

Grupo de Investigación en Polifenoles, Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E 37007 Salamanca, Spain

(Received 6 April 2011; final version received 25 June 2011)

The aim of this work was to evaluate sensory changes in grape skins during ripening and to obtain a correlation with their phenolic composition. Flavan-3-ols (monomers and dimers), prodelphinidins, hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, anthocyanins and flavonols were determined by HPLC-DAD-MS. In addition, skin dilaceration, tannic intensity, astringency, acidity, aroma intensity (AI) and type of aroma were evaluated. Multivariate analysis showed the evolution of these samples during ripening and the relationship among sensory scores and phenolic composition of grapes skins. Skin dilaceration, type of aroma and to a lesser extent AI tend to increase during ripening. The contents in the phenolic compounds in grape skins present a similar pattern to the aforementioned sensory parameters. Nevertheless, tannic intensity, astringency, dryness and acidity present an opposite pattern which indicates a decrease of these sensory scores during ripening.

Keywords: grapes; phenolic compounds; sensory analysis; multivariate analysis

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar los cambios en los parámetros sensoriales del hollejo de uva durante la maduración y obtener una correlación con su composición fenólica. Se han determinado flavan-3-oles (monómeros y dímeros), prodelphinidinas, ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinámicos, antocianos y flavonoles mediante HPLC-DAD-MS. Además, se han evaluado los siguientes atributos sensoriales del hollejo: facilidad de dilaceración, intensidad tánica, astringencia, acidez, sequedad, intensidad de aroma y tipo de aroma. El análisis multivariante mostró la evolución de los hollejos a lo largo de la maduración y la relación entre las puntuaciones sensoriales y la composición fenólica de los mismos. La facilidad de dilaceración, el tipo de aroma y en menor medida la intensidad del aroma tienden a aumentar con la maduración, pauta similar a la presentada por los compuestos fenólicos estudiados. Sin embargo, la intensidad tánica, la astringencia, la sequedad y la acidez presentan una pauta opuesta, lo que indica una disminución de estos atributos sensoriales durante la maduración.

Palabras clave: uvas; compuestos fenólicos; análisis sensorial; análisis multivariante

Introduction

Phenolic compounds are widely distributed in fruits, vegetables, nuts and beverages. Among them, three types of flavonoids (i.e. anthocyanins, flavanols and flavonols) are particularly relevant to red wine quality. Their reactivity during winemaking and aging define wine colour, astringency, bitterness and the evolution of all these sensory attributes.

The anthocyanins structurally depend on the conditions and composition of the media where they are dissolved and suffer interactions with other compounds that influence their structural equilibria and modify their colour (Santos-Buelga & Freitas, 2009).

Among phenolics, flavanols are the most studied compounds in relation to their influence on wine

astringency. Grape flavanols are mainly derived from (epi)catechin and, to a lesser extent, from epicatechin-3-*O*-gallate and (epi)gallocatechin. They can be found in grapes as monomers but also as oligomers and polymers, also called condensed tannins or proanthocyanidins. It is well known that skins contain both catechins and gallocatechins and their corresponding derived proanthocyanidins highly contribute to the phenolic composition of wines (Darias-Martín, Díaz-González, & Díaz-Romero, 2004; Darias-Martín, Rodríguez, Díaz, & Lamuela-Raventós, 2000). Their concentration and chemical structure seem to have an important contribution to astringency, although concentration appears to be less important than chemical structure (de Freitas & Mateus, 2001; Delcour, Vandenberghe, Corten, & Dondeyne, 1984; Kielhorn

*Corresponding author. Email: escriban@usal.es

& Thorngate III, 1999; Lesschaeve & Noble, 2005; Peleg, Gacon, Schlich, & Noble, 1999; Vidal et al., 2004).

The perception of the astringency seems to increase with the molecular weight of the proanthocyanidin, as well as with the degree of galloylation (Vidal et al., 2003). However, there are different trends about the influence of high molecular weight proanthocyanidins on astringency. Some authors have reported that proanthocyanidins with mean molecular size bigger than seven are insoluble and unable to contribute to astringency (Lee & Jaworski, 1990).

Recent studies have shown that high polymerized proanthocyanidins are soluble in wine-like water-alcoholic solution and are very astringent (Vidal et al., 2003) and have reported that galloylated tannins induce a puckering astringent mouthfeel (Vidal et al., 2004). Nevertheless, it has been suggested that this sensation could get largely modulated by the presence of some flavonol glycosides and phenolic acids (Hufnagel & Hofmann, 2008). In contradiction to previous literature about astringent perception, recent studies have suggested that flavanols were not relevant compounds (Hufnagel & Hofmann, 2008; Sáenz-Navajas, Ferreira, Dizy, & Fernández-Zurbano, 2010).

It has been suggested that oral astringency results from the precipitation of salivary proteins. However, by itself it does not explain all aspects of astringency (Jackson, 2009) and it has been recently pointed out that tannin-protein interaction is more closely associated to astringency than tannin-protein complex precipitation (Obrequé-Slier, López-Solís, Peña-Neira, & Zamora-Marin, 2010). The mechanism of astringency has not been fully understood yet, and nowadays the sensory analysis is a useful tool to evaluate organoleptic attributes (Condelli, Dinnella, Cerone, Monteleone, & Bertuccioli, 2006; Le Moigne, Maury, Bertrand, & Jourjon, 2008; Sáenz-Navajas, et al., 2010).

The aim of this work was to evaluate sensory changes in grape skins during ripening and to investigate correlations between the sensory parameters and the phenolic composition of grapes. For this, the phenolic composition of grape skins with different degrees of maturity was analyzed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometry detection (HPLC-DAD-MS) and the results were correlated with the following sensory parameters, skin dilaceration (Dil), tannic intensity (TI), astringency (A), acidity (Ac), aroma intensity (AI), dryness (D) and type of aroma (Ar).

Material and methods

Samples

Vitis vinifera L. cv. Graciano red grape samples were collected from two different vineyards located in La Rioja (Spain). Vineyard V is located in Logroño (Rioja

Media) and vineyard Z is located 40 km away, in Haro (Rioja Alta). The samples were collected at different developmental stages from veraison (September) to over-ripeness (November) in two different vintages (2008 and 2009). In the case of 2008 vintage, seven dates were taken into account for vineyard V and eight for vineyard Z. For 2009 vintage, the number of dates taken into account was six for vineyard V and seven for the vineyard Z. Three groups of 150 berries per vineyard were collected at each date. The berries were collected from both sides of vines located in different rows within the vineyard. Edge rows and the first two vines in a row were avoided. Berries were collected from the top, middle and bottom of the cluster. Two subsamples were taken from each sample, one for the sensory analysis, which was performed immediately, and the other one was frozen and stored at -20°C until chromatographic analyses.

Phenolic compounds extraction and determination

Grape skins were separated manually, and 10 g of skins were macerated at 4°C in methanol containing 0.1% of 12M HCl. Methanolic phases were successively pooled, a few milliliters of water were added and the extract was concentrated under vacuum at 30°C until methanol was removed and finally made up to 100 mL with ultrapure water. HPLC-DAD-MS analysis and procedure of cationic exchange were carried out as previously described (Ferrer-Gallego, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailón, 2011).

The determined phenolic compounds were grouped taking into account their basic structures and their degree of polymerization: flavan-3-ols (Mon, monomers; Dim, dimers); PD, prodelphinidins; HB, hydroxybenzoic acids; HC, hydroxycinnamic acids; Ant, anthocyanins; Flavo, flavonols. Supplementary Table 1 shows the contents of the aforementioned compounds expressed as mg g^{-1} of grape skins.

Sensory analysis

Prior to their participation in the experiments, subjects were trained to recognize and rate the perceived intensity of the following sensations: sourness, bitterness and astringency using the following standard solutions, respectively: tartaric acid: 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1, 2 g/L; quinine monohydrochloride dihydrate: 0.025, 0.037, 0.05 g/L; aluminium potassium sulphate: 0.3, 0.45, 0.6, 0.9 g/L. During training sessions, subjects were asked when they began to feel some taste or mouth sensation. Moreover, they have to order different concentrations and to realize duo-trio tests. Several tests were carried out to familiarize the panelist with grape aromas. An aroma kit was used to recognize the type of aroma (herbal, neutral, fruit, ripening fruit or post-harvest fruit) and AI (slight intensity, moderate intensity, rather strong intensity or strong intensity).

Subjects participated in a total of four training sessions.

Eleven non-smokers subjects, seven women and four men, took part in the experiment. Some judges had experience in this kind of tasting but the others were instructed to sip the sample (grape skin), to practice the same number of chews and to rate the intensity (Rousseau & Delteil, 2000).

Chemometric analysis

Unsupervised methods are applied to observe trends in the data indicating relationships between samples and variables (Brereton, 2003; Massart et al., 1998). Principal components analysis (PCA) was used for data analysis as unsupervised pattern recognition method. The data matrix was constituted not only by sensory scores of samples but also by their phenolic composition. The aforementioned chemometric tool was applied to the correlation matrix of the original variables.

The software package SPSS 13.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for data processing.

Results and discussion

Supplementary Figure 1 presents the obtained sensory scores of grape skins during the ripening process using a radial plot which is useful for illustrating temporal data. It is noteworthy that the main differences in these scores are related with the vintage instead of the vineyard. Samples corresponding to 2008 vintage present more acidity at the beginning of the ripening and also show more AI than 2009 vintage samples. Nevertheless, the samples corresponding to 2009 vintage reach more ripening fruity aromas at the last steps of ripening. This plot also reveals the evolution of these sensory parameters during ripening. Skin dilaceration, type of aroma and AI tend to increase during ripening. Nevertheless, TI, astringency, dryness and acidity present an opposite trend which indicates a decrease of these sensory scores during ripening.

In order to evaluate the relationship between sensory parameters and phenolic composition of grape skin samples, PCA was applied. Figure 1 shows the projection of the samples on the plane defined by the first and second principal components and also the corresponding loading plot (Figure 1(b)). The first principal component (PC 1) describes 46.2% of the variability in the data and the second (PC 2) 24.6%. Each sample was represented by an alphanumeric code indicating the vintage (i.e. none = 2008; 2 = 2009), vineyard (V and Z) and sampling date. PC 1 describes the evolution of grape skin samples during ripening; this pattern has been emphasized in Supplementary Figure 2(a). In this plot, the first dates of each sample presents negative scores in PC 1 and these scores

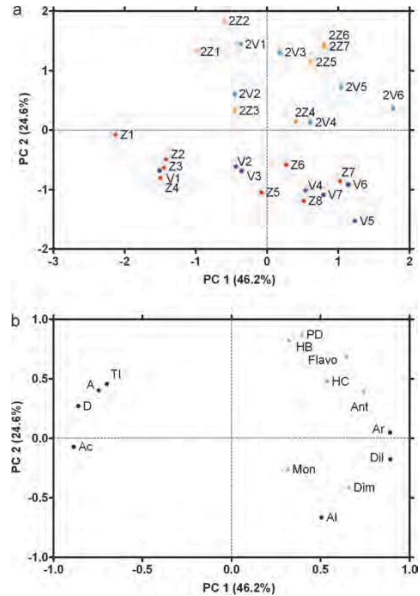


Figure 1. Representation of the grape skin samples in the score plot (a) and the variables in the loadings plot (b) on the plane defined by the first and second principal components.

Figura 1. Representación de las muestras de hollejo en el diagrama de puntuaciones (a) y de las variables en el diagrama de cargas (b) en el plano definido por el primer y segundo componente principal.

increased during ripening. It is also noticeable that the 2009 vintage presents a more homogeneous pattern and the 2008 vintage starts at more negative scores. This may be related to a faster and more homogeneous ripening in the 2009 and later verasion in the 2008 vintage. This plot also shows when the samples reach the highest values in PC 1 which correspond to the most suitable sensory attributes (i.e. lower astringency, acidity, dryness and TI and higher skin dilaceration, type and intensity of aroma) and the associated values of the studied phenolic compounds (Figure 1(b)). For each vineyard, the samples which presented the highest values in this principal component were V5, Z7 in 2008 vintage and 2V6, Z26 and Z27 in 2009 vintage (Supplementary Figure 2(a)). It could reveal the optimum harvest date taking into account not only the sensory maturity but also the phenolic ripeness.

The loadings plot (Figure 1(b)) shows that the most important variables in this principal component are mainly the sensory variables. Figure 1(b) shows a

relationship among skin dilaceration (Dil), type of aroma (Ar) and to a lesser extent AI. The sensory scores of these variables tend to increase during ripening. This pattern suggests that skin dilaceration (Dil) may have relationship with aroma parameters but not with the rest of the sensory parameters [i.e. TI, astringency (A), acidity (Ac) and dryness (D)] evaluated. Easiness of skin dilaceration increases during ripening and could improve the release of volatile compounds.

Phenolic compounds of grape skins present in PC 1 a similar pattern to skin dilaceration, type of aroma (Ar) and AI, especially anthocyanins (Ant) and dimers of procyanidins (Dim). These compounds also increased during ripening. Nevertheless, TI, astringency (A), dryness (D) and acidity (Ac) present an opposite pattern which indicates a decrease of these sensory scores during ripening. Moreover, dryness (D) and acidity (Ac) present a high relationship in PC 1, which is less noticeable in the case of TI and astringency (A). This can be inferred from Figure 1(b) where the loadings of these variables are presented.

PC 2 shows a clear separation between 2008 and 2009 vintages (Figure 1(a)). This pattern has been emphasized in Supplementary Figure 2(b). The loadings plot (Figure 1(b)) shows that the most important variables in this principal component are prodelfphinidins (PD), hydroxybenzoic acids (HB) and to lesser extent flavonols (Flavo) and AI, since they present the highest absolute values in this principal component loading. This pattern suggests higher values of these compounds prodelfphinidins (PD), hydroxybenzoic acids (HB) and flavonols (Flavo) in the 2009 vintage and more intense aroma (AI) in the 2008 vintage. The intensity of aroma trend has already been observed in Supplementary Figure 1 which present the results obtained only from the sensory analysis.

Conclusions

Multivariate analysis was applied to sensory and phenolic composition of grape skin. This procedure has shown the evolution of these samples during ripening and the relationship among sensory scores and phenolic composition of grapes skins. The relationship between some studied sensory parameters and phenolic compounds may be indirect and cannot be easily described by their phenolic composition. Therefore, a wide study could be useful in order to explain the variation in the aforementioned sensory attributes taking into account not only the phenolic composition but also volatile composition, etc.

Supplementary material

The supplementary material for this paper is available online at <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2011.601430>

Acknowledgments

Thanks are due to the Spanish MICINN (Project ref. AGL2008-05569-C02-01), to Junta de Castilla y León (group GR133) and to the Consolidar-Ingenio 2010 Programme (FUN-C-FOOD, CSD2007-00063) for financial support. R. Ferrer-Gallego thanks the Spanish MICINN for the F.P.I. predoctoral scholarship. The authors also thank Bodegas RODA S.A. (Haro, La Rioja, Spain) for supplying the grape samples and the sensory panel for tasting and evaluating the samples.

References

- Brereton, R.G. (2003). *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. Chichester, West Sussex, UK: John Wiley.
- Condelli, N., Dinnella, C., Cerone, A., Montealeone, E., & Bertuccioli, M. (2006). Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Quality and Preference*, *17*, 96–107.
- Darias-Martín, J., Díaz-González, D., & Díaz-Romero, C. (2004). Influence of two pressing processes on the quality of must in white wine production. *Journal of Food Engineering*, *63*, 335–340.
- Darias-Martín, J., Rodríguez, O., Díaz, E., & Lamuela-Raventós, R.M. (2000). Effect of skin contact on the antioxidant phenolics in white wine. *Food Chemistry*, *71*, 483–487.
- de Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *49*, 940–945.
- Delcour, J.A., Vandenberghe, M.M., Corten, P.F., & Dondeyne, P. (1984). Flavor thresholds of polyphenolics in water. *American Journal of Enology and Viticulture*, *35*, 134–136.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J.M., Rivas-Gonzalo, J.C., & Escribano-Bailón, M.T. (2011). Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. *LWT – Food Science and Technology*, *44*, 847–853.
- Hufnagel, J.C., & Hofmann, T. (2008). Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 9190–9199.
- Jackson, R.S. (2009). In *Wine tasting* (2nd ed.) San Diego: Academic Press.
- Kielhorn, S., & Thorngate III, J.H. (1999). Oral sensations associated with the flavan-3-ols (+)-catechin and (–)-epicatechin. *Food Quality and Preference*, *10*, 109–116.
- Lee, C.Y., & Jaworski, A.W. (1990). Identification of Some Phenolics in White Grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, *41*(1), 87–89.
- Le Moigne, M., Maury, C., Bertrand, D., & Jourjon, F. (2008). Sensory and instrumental characterisation of Cabernet Franc grapes according to ripening stages and growing location. *Food Quality and Preference*, *19*, 220–231.
- Lesschaeve, I., & Noble, A.C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *81*(1), 330S–335S.
- Massart, D.L., Vandeginste, B.G., Buydens, L.M., Lewi, P.J., Smeyers-Verbeke, J., & Jong, S.D. (1998). *Handbook of chemometrics and quality metrics*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Inc.

- Obreque-Slier, E., López-Solís, R., Peña-Neira, Á., & Zamora-Marín, F. (2010). Tannin–protein interaction is more closely associated with astringency than tannin–protein precipitation: Experience with two oenological tannins and a gelatin. *International Journal of Food Science & Technology*, 45, 2629–2636.
- Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., & Noble, A.C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1123–1128.
- Rousseau, J., & Delteil, D. (2000). Présentation d'une méthode d'analyse sensorielle des raisins. Principe, méthode et grille d'interprétation. *Revue Française d'Oenologie*, 183, 10–13.
- Sáenz-Navajas, M.P., Ferreira, V., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 673, 151–159.
- Santos-Buelga, C., & Freitas, V. (2009). Influence of phenolics on wine organoleptic properties. In M.V. Moreno-Arribas & C. Polo (Eds.), *Wine chemistry and biochemistry* (pp. 529–570). New York, USA: Springer.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E.J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 564–573.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 57–65.

Multivariate analysis of sensory data of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano during ripening. Correlation with the phenolic composition of the grape skins

Análisis multivariante de datos sensoriales de *Vitis vinifera* L. cv. Graciano durante la maduración. Correlación con la composición fenólica del hollejo

R. Ferrer-Gallego, J.M. Hernández-Hierro, J.C. Rivas-Gonzalo and M.T. Escribano-Bailón*

Grupo de Investigación en Polifenoles, Unidad de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E 37007 Salamanca, Spain

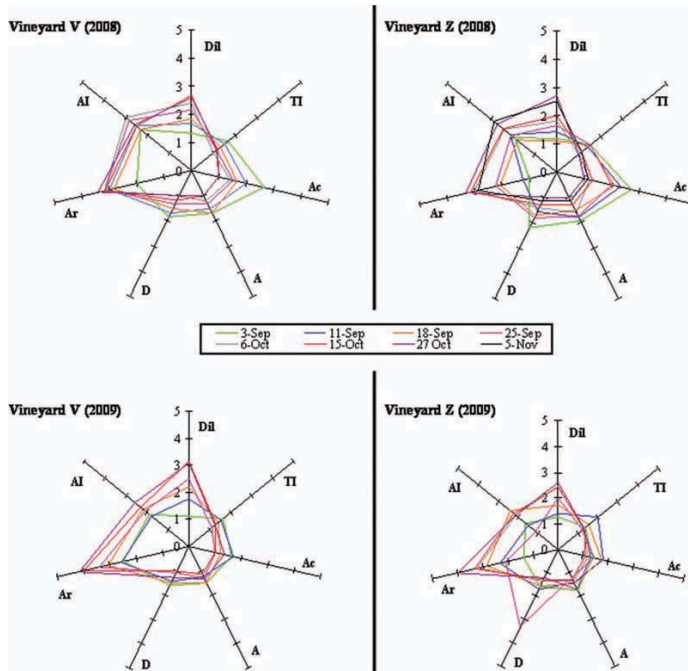
Supplementary Table 1. Phenolic composition of grape skins (mg g^{-1} of grape skins).

Tabla adicional 1. Composición fenólica de los hollejos (mg g^{-1} de hollejo).

Vintage	Vineyard	Date	Samples	Mon	Dim	PD	HB	HC	Ant	Flavo
2008	V	1	V1	0.31	0.16	1.00	0.06	0.17	0.25	0.77
		2	V2	0.36	0.29	1.14	0.09	0.33	1.70	1.02
		3	V3	0.33	0.27	0.70	0.08	0.23	3.53	0.99
		4	V4	0.40	0.40	1.27	0.10	0.33	4.98	1.06
		5	V5	0.54	0.58	0.98	0.09	0.36	6.01	1.25
		6	V6	0.35	0.54	1.31	0.11	0.30	6.93	1.26
		7	V7	0.29	0.23	0.68	0.08	0.20	6.18	1.11
	Z	1	Z1	0.25	0.06	0.39	0.13	0.12	0.24	0.76
		2	Z2	0.23	0.14	0.82	0.08	0.18	1.10	0.82
		3	Z3	0.11	0.19	1.03	0.02	0.09	2.19	0.66
		4	Z4	0.11	0.10	0.20	0.02	0.08	1.94	0.54
		5	Z5	0.20	0.34	1.07	0.04	0.20	2.75	0.98
		6	Z6	0.24	0.24	1.28	0.08	0.45	2.11	1.14
		7	Z7	0.20	0.27	1.15	0.07	0.55	2.57	1.34
2009	V	8	Z8	0.29	0.23	0.68	0.08	0.24	3.31	1.20
		1	2V1	0.19	0.14	3.90	0.19	0.57	4.62	1.51
		2	2V2	0.18	0.08	2.74	0.13	0.22	5.82	1.34
		3	2V3	0.23	0.15	4.39	0.15	0.39	7.97	1.70
		4	2V4	0.18	0.10	3.18	0.10	0.29	5.84	1.41
		5	2V5	0.20	0.24	4.77	0.12	0.26	11.14	1.63
	Z	6	2V6	0.24	0.49	5.97	0.16	0.45	8.25	1.75
		1	2Z1	0.25	0.12	4.13	0.17	0.38	2.68	1.34
		2	2Z2	0.34	0.14	5.14	0.17	0.47	4.98	1.63
		3	2Z3	0.18	0.09	3.07	0.08	0.34	4.01	1.61
		4	2Z4	0.20	0.12	4.17	0.14	0.27	4.60	1.22
		5	2Z5	0.27	0.25	6.41	0.23	0.38	4.65	1.42
		6	2Z6	0.27	0.25	6.41	0.23	0.42	7.00	1.71
		7	2Z7	0.27	0.25	6.41	0.23	0.42	6.26	1.63

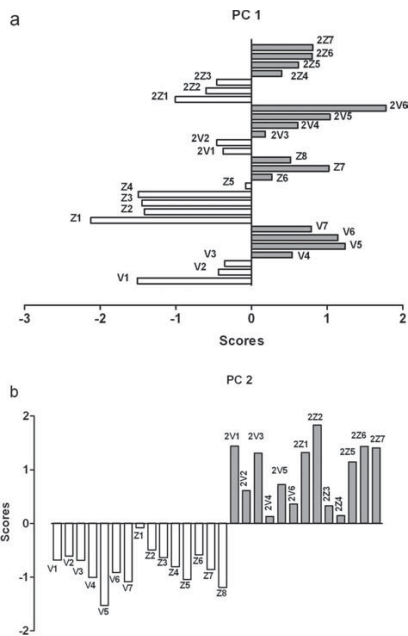
Note: Flavan-3-ols (Mon, monomers; Dim, dimers); PD, prodelphinidins; HB, hydroxybenzoic acids; HC, hydroxycinnamic acids; Ant, anthocyanins; Flavo, flavonols.

Nota: Flavan-3-oles (Mon, monómeros; Dim, dímeros); PD, prodelphinidinas; HB, ácidos hidroxibenzoicos; HC, ácidos hidroxicinámicos; Ant, antocianos; Flavo, flavonoles.



Supplementary Figure 1. Sensory analysis of grape skins during ripeness. Skin dilaceration (Dil), tannic intensity (TI), astringency (A), acidity (Ac), aroma intensity (AI), dryness (D) and type of aroma (Ar).

Figura adicional 1. Análisis sensorial de los hollejos de uva durante la maduración. Facilidad de dilaceración (Dil), intensidad tánica (TI), astringencia (A), acidez (Ac), intensidad de aroma (AI), sequedad (D) y tipo de aroma (Ar).



Supplementary Figure 2. Bar diagrams of the scores in the first (a) and the second (b) principal components.
 Figura adicional 2. Diagrama de barras de las puntuaciones del primer (a) y del segundo (b) componente principal.

