

TRABAJO DE FIN DE GRADO
GRADO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

UNIVERSIDAD
DE BURGOS



SEGUIMIENTO MULTIVARIANTE DE LA
MADURACIÓN DE LAS UVAS

Marina Pérez Ausejo

Mayo 2019

Tutoras: Ana Herrero Gutiérrez y Susana Palmero Díaz



Co-funded by the
Erasmus+ Programme
of the European Union

Índice

1. Introducción	2
2. Objectives	3
3. Fundamento teórico	3
3.1 Definición y medida de parámetros físico-químicos en uvas	3
3.2 Análisis y regresión de componentes principales	6
4. Experimental	7
4.1 Reactivos y disoluciones	7
4.2 Materiales e instrumentación	7
4.3 Toma y preparación de la muestra para el análisis	8
4.4 Procedimiento experimental	8
5. Resultados y discusión	13
5.1 Determinaciones analíticas	13
5.2 Análisis multivariante	17
5.2.1. Análisis de componentes principales	17
5.2.2. Regresión de componentes principales	20
6. Conclusions	22
7. Acknowledgements	22
8. Bibliografía	23

Resumen

El análisis de los parámetros físico-químicos de la uva durante su maduración es de vital importancia para los viticultores, pues de él dependerá que el vino producido tenga unas características sensoriales u otras, y un mayor o menor grado alcohólico.

En el presente trabajo, se utilizan técnicas de análisis basadas en los métodos oficiales, normalizados por la OIV, para la determinación de parámetros físicos (densidad, intensidad de color y tonalidad) y químicos (pH, acidez, azúcares totales, azúcares reductores, potasio, ácido málico y polifenoles totales) en uvas recogidas secuencialmente.

Mediante un análisis multivariante basado en el análisis y regresión de componentes principales, se estudia la relación de esos parámetros con la maduración de las uvas, y cómo es su variación con el tiempo.

Abstract

Analysis of physico-chemical parameters of grapes during their ripening is really important to vine growers because by checking them, the wine they produce will acquire different sensorial features and a higher or a lower alcoholic strength.

Analytic techniques founded on official methods, normalized by OIV, are used to determine physical parameters (density, intensity and tonality of colour) and chemical parameters (pH, acidity, sugars, reducing sugars, potassium, malic acid and total polyphenols) analysed on grapes sequentially harvested.

By doing a multivariate analysis based on principal component analysis and regression, it is possible to study how these parameters are related to the ripening of the grapes, and how they vary as ripening progress.

1. Introducción

Las antiguas civilizaciones ya lo empleaban en sus actos ceremoniales e incluso dedicaron dioses como Dionisio en Grecia, Baco en Roma y Osiris en Egipto para venerarlo, y es que el vino proporcionaba unas sensaciones placenteras que iban mucho más allá de la necesidad de alimentarse o hidratarse [1].

Debido a su larga historia, los estudios que se han realizado sobre el vino son muy numerosos y abarcan muchos ámbitos de estudio como su historia, la cultura que lo rodea, sus características físico-químicas, su aporte nutricional, cómo es su producción y cómo se puede combinar con la gastronomía de cada región o maridaje.

El primer paso para llevar a cabo la producción del vino se denomina vendimia y consiste en recoger la uva de la vid lo suficientemente madura para que la fermentación de los azúcares y la producción de alcohol, aromas, color y otros parámetros sea óptima. Si la vendimia se realiza demasiado pronto, las uvas estarán aún verdes y su sabor será áspero y astringente, en cambio, si se recogen demasiado tarde se obtendrán uvas sobremaduras [2]. Pero, ¿cómo determinar cuándo es el momento óptimo para la vendimia? Para poder contestar a esta pregunta es necesario tener clara la definición de maduración en relación al fruto de la vid.

Hay tres aspectos a considerar en la maduración de las uvas: la madurez tecnológica se da cuando hay un crecimiento notable de las bayas, un aumento en la concentración de azúcares y una disminución de la acidez; la madurez fenólica, cuando se desarrollan los componentes responsables del color (polifenoles), y la fisiológica, en la que las semillas son capaces de germinar [3]. Los componentes de la uva evolucionan en su interior de diferente manera dependiendo de diversos factores externos tales como el clima (temperatura, humedad, iluminación), el suelo y la ubicación de la vid, así como su variedad, los trabajos para el cultivo y desarrollo de la vid, por lo que no se puede generalizar y establecer un tiempo de maduración concreto para todas las uvas.

En la práctica, se suelen realizar diversos análisis físico-químicos para determinar cuándo se deben recoger las uvas. La madurez tecnológica se evalúa principalmente mediante dos parámetros: los azúcares, para el cálculo del grado alcohólico probable y los ácidos. No obstante, según un estudio llevado a cabo por la Estación Enológica de Haro (La Rioja) y con la colaboración de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Burgos, en el que se realizaron exámenes visuales, táctiles y gustativos, se concluyó que el análisis sensorial es igual de válido que el físico-químico para determinar el momento óptimo de la vendimia [4-5].

Los análisis físico-químicos de los componentes de la uva para la determinación de su madurez se pueden realizar de distinta manera según laboratorios, por lo que en España existe una legislación específica que describe cómo han de realizarse los análisis de manera oficial [6]. Por su parte, la OIV (Organización Internacional de la Viña y el Vino) es una organización intergubernamental que se encarga, entre otras actividades, de establecer una armonía en las prácticas y normas relacionadas con todos los productos de la vid entre los países miembros [7-8].

En el presente trabajo, se ponen a punto una serie de procedimientos de análisis siguiendo, en la medida de lo posible, los métodos oficiales. Para llevar a cabo el

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

seguimiento de la maduración de uvas recogidas a lo largo de un período de tiempo, se han estudiado:

- ✓ Densidad
- ✓ pH y acidez
- ✓ Concentración de azúcar
- ✓ Concentración de ácido málico
- ✓ Azúcares reductores
- ✓ Potasio
- ✓ Parámetros relacionados con el color: índice de polifenoles totales, intensidad y tonalidad

Para establecer la relación de los parámetros químico-físicos considerados con el tiempo, es decir, con el grado de maduración, se utilizan métodos de análisis multivariantes.

2. Objectives

To learn the official analytic methods to determine physico-chemical parameters in grapes in order to monitor their ripening.

To determine different physico-chemical parameters in grapes, after having been sequentially harvested.

To establish a relationship between these physico-chemical parameters and the ripening of the grapes and also with their evolution over time.

3. Fundamento teórico

3.1. Definición y medida de parámetros físico-químicos en uvas

En este trabajo se evalúan distintos parámetros físico-químicos relacionados con la maduración de las uvas. Por ejemplo, la concentración de solutos disueltos se incrementa a medida que la uva va madurando. Cuanto mayor es la concentración de solutos disueltos en el mosto, como por ejemplo azúcares, mayor será la densidad de éste. Los glúcidos del mosto, principalmente glucosa y fructosa, se transforman en etanol y dióxido de carbono durante la fermentación, por tanto, para obtener un vino de calidad, con un grado alcohólico adecuado, es necesario controlar periódicamente el nivel de azúcar de las uvas para llevar a cabo la vendimia en el momento idóneo. Conocer la densidad y la concentración de azúcar del mosto permite tener una estimación del grado alcohólico probable.

La **densidad** es la masa por unidad de volumen de mosto a una temperatura dada, y se expresa en gramos por mililitro. Su determinación se puede realizar por aerometría (hidrometría) utilizando un aerómetro graduado o densímetro, cuyo fundamento se

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

encuentra en el principio de Arquímedes, en base a la flotabilidad que presenta un cuerpo de peso constante en el mosto (Método OIV-MA-AS2-01B en [7]).

Por otro lado, la refractometría es una técnica analítica que permite determinar de forma indirecta la **concentración de azúcar** de un mosto a través de la medida de su índice de refracción, ya que éste aumenta proporcionalmente a medida que lo hace la densidad del mosto. Este análisis se lleva a cabo utilizando refractómetros, que establecen el índice de refracción en base a la determinación del ángulo crítico.

Los refractómetros digitales utilizan sistemas de reflexión como el que se muestra de forma esquemática en la figura 1. Contienen un prisma de un material de alto índice de refracción, sobre el que se dispone la muestra. El haz A, que incide con cierto ángulo sobre la interfase prisma-muestra, es refractado. Por otro lado, el haz B, que incide con un ángulo mayor, ya no se refracta; este ángulo se denomina ángulo crítico. Hazes que inciden con ángulos mayores que el ángulo crítico, como el haz C, son reflejados por reflexión interna total. El ángulo crítico depende de la relación entre los índices de refracción del prisma y la muestra, y por tanto su determinación lleva a conocer el índice de refracción de la muestra [9].

En la actualidad, es habitual que los refractómetros proporcionen el índice de refracción, expresado en grados Brix, relacionado con el porcentaje de sólidos solubles contenidos en la solución acuosa, en este caso, el mosto. Dentro de los sólidos solubles se encuentran todos los sólidos disueltos, incluyendo azúcares, sales, proteínas, ácidos, etc. El refractómetro se calibra respecto a la cantidad de azúcar, de modo que los grados Brix de un mosto representan los gramos de azúcar (expresados en g de sacarosa) que contienen 100 mL de mosto (Método OIV-MA-AS2-02, en [7]).

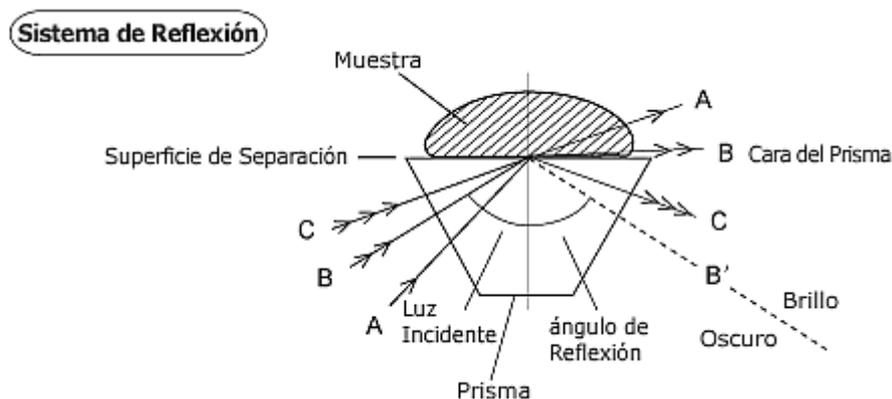


Figura 1. Esquema del sistema de refracción de un refractómetro digital [9].

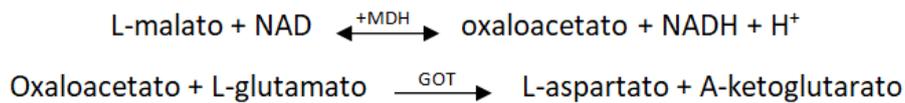
Otro parámetro a considerar en el estudio de la maduración de las uvas es el **pH**. Determinar el pH es importante porque sus variaciones pueden conllevar: cambios de color, sabor ácido y modificaciones de los potenciales redox, así como de la eficacia de la fermentación maloláctica, etc. [10].

La **acidez total** es, según la OIV (Método OIV-MA-AS313-01 en [7]), la suma de los ácidos valorables del mosto cuando éste es valorado potenciométricamente hasta

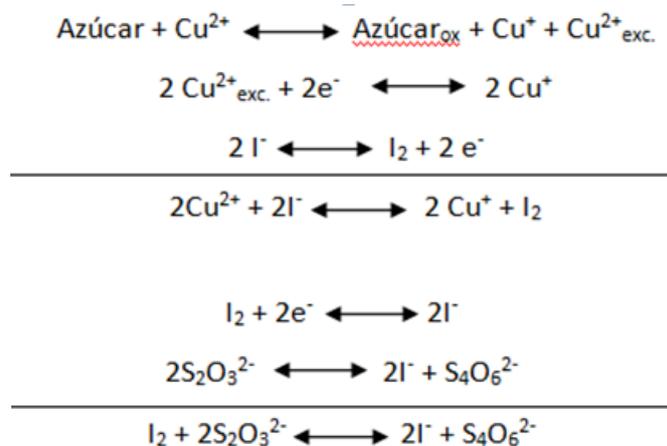
Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

llegar a pH 7 por adición de una disolución patrón de hidróxido de sodio. Sin embargo, en este caso, la AOAC (11.042/84.962.12/90) aconseja llevarlo hasta un pH algo más elevado, como 8,2 por tratarse de una valoración de una base fuerte con un ácido débil. Esta acidez se expresa como gramos de ácido tartárico por litro de mosto, por ser éste el ácido mayoritario tanto de la uva como del mosto (y el futuro vino).

A pesar de que la acidez se expresa como ácido tartárico, al ser ácido más abundante, no se debe despreciar la presencia de otros ácidos como el ácido málico, que también resultan relevantes en la maduración de las uvas. La concentración del **ácido L-málico** se determina utilizando un método enzimático (Método OIV-MA-AS313-11, en [7]). Este ensayo se basa en la oxidación del ácido L-málico a oxalacetato por la nicotinamida-adenina dinucleótido (NAD^+); la forma reducida de este compuesto, NADH, se relaciona directamente con el L-malato que se consume y se mide espectrofotométricamente a 340 nm. La reacción está catalizada por la enzima L-malato deshidrogenasa (MDH) y, para desplazar el equilibrio, favoreciendo la formación de oxalacetato, se añade también la enzima glutamato-oxalacetato transaminasa (GOT), que transforma irreversiblemente el oxalacetato en L-aspartato.



Por otro lado, la determinación de los **azúcares reductores** presentes en el zumo de uva (glucosa y fructosa) se basa en el método Rebelein (Método OIV-MA-AS311-01C). En éste método se mide la capacidad de estos azúcares para reducir sales cúpricas, haciendo reaccionar el mosto con una cantidad determinada de una solución alcalina de cobre y midiendo yodométricamente el exceso de iones cobre. A temperatura de ebullición el Cu^{+2} (azul) es reducido a Cu^+ (incolore) y el exceso se determina por yodometría, tras haber adicionado KI en condiciones ácidas. Las reacciones que tienen lugar son las siguientes:



El **potasio** es uno de los cationes más abundantes de las uvas, seguido del calcio, del magnesio y del sodio. Además de en forma de catión, el potasio se puede encontrar formando sales como sulfatos, cloruros y fosfatos de potasio. Además, puede unirse a

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

ácidos y formar sales ácidas como el tartrato ácido de potasio [11], que precipita en presencia de etanol, por lo que es normal encontrarlo en el fondo de las barricas durante el proceso de crianza del vino. La precipitación en forma de cristales de estas sales hace que disminuya la acidez. En este trabajo el **potasio** se determina mediante fotometría de llama, mediante un método basado en el oficial: OIV-MA-AS322-02B.

Los **polifenoles** son sustancias caracterizadas por la presencia de uno o varios anillos fenólicos que se encuentran principalmente en las plantas [12]. Actúan como antioxidantes, contribuyen al color y protegen contra la luz ultravioleta. En los alimentos, contribuyen a la acidez y sensación astringente así como en el color, el aroma y la estabilidad oxidativa[13]. Debido a la presencia de estos anillos fenólicos, los polifenoles tienen la capacidad de absorber la radiación ultravioleta a 280 nm, por lo que midiendo en el mosto la absorbancia a esta longitud de onda se estima el índice de polifenoles totales (IPT) [14].

La determinación del color de un alimento, en este caso un mosto de uva, puede ser evaluado tanto cualitativamente mediante, por ejemplo, determinaciones sensoriales, como cuantitativamente, caracterizando dos de los parámetros que conforman el color: la intensidad y la tonalidad. En el caso del vino (Método OIV-MA-AS2-07B), la **intensidad de color** se define como la suma de las absorbancias o densidades ópticas a 420, 520 y 620 nm, mientras que la **tonalidad** o tono es el cociente entre la densidad óptica a 420 y a 520 nm. El valor de la absorbancia a cada una de esas tres longitudes de onda indica la “cantidad” de pigmentos amarillos (420 nm), rojos (520 nm) y azules (620 nm) del mosto [14].

3.2. Análisis y regresión de componentes principales

Cuando se dispone de un conjunto de datos en el que, para cada muestra (u objeto) se han medido diversas variables (llamadas variables predictoras), el análisis de componentes principales es una técnica de análisis multivariante que se utiliza para reducir la dimensionalidad del conjunto de datos y facilitar, así, el estudio y la interpretación de su estructura interna.

En el espacio multidimensional de las variables predictoras se construyen unas nuevas variables, las componentes principales. La primera componente principal (CP 1) se obtiene como combinación lineal de las variables predictoras, en la dirección de máxima varianza. La segunda componente principal (CP 2) se calcula como combinación lineal de las variables predictoras en la siguiente dirección de máxima varianza que no esté correlacionada con la anterior. Y de esta forma, se van construyendo las sucesivas componentes principales.

Las coordenadas de cada muestra en el espacio vectorial definido por las componentes principales se denominan puntuaciones o *scores*, y los coeficientes de las variables predictoras en cada combinación lineal son los pesos o *weight*. El análisis de las primeras componentes principales, las que explican más varianza, suele poner de manifiesto la estructura subyacente del conjunto de datos.

Cuando las variables predictoras son de magnitudes muy diferentes, antes de realizar el análisis, es habitual llevar a cabo un autoescalado de los datos para evitar que pesen más las variables de mayor tamaño. Al autoescalar una variable (restando la media a

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

cada valor, y dividiendo por la desviación típica) ésta tiene media cero y desviación típica uno. De esta manera se consigue que todas las variables tengan la misma influencia en el análisis.

Por otro lado, para relacionar las variables predictoras medidas con una variable respuesta, es necesario ajustar un modelo de regresión multivariante. Lo más sencillo sería utilizar un modelo de regresión lineal múltiple por mínimos cuadrados, pero para ello es necesario que las variables predictoras no estén correlacionadas entre ellas ya que, de lo contrario, se obtienen modelos de regresión inestables y con poca capacidad de predicción. Sin embargo, es frecuente que exista correlación entre las variables medidas, cuando se trata de datos experimentales, de modo que, una forma de eludir este problema consiste en realizar el ajuste utilizando, en lugar de las variables predictoras, las puntuaciones de las componentes principales que, por construcción, no están correlacionadas entre sí. En este caso, se habla de regresión de componentes principales.

4. Experimental

4.1. Reactivos y disoluciones

Se ha utilizado tiosulfato sódico pentahidratado (PR) y almidón (PA) de Panreac, tartrato de potasio y sodio tetrahidratado (PA), yoduro potásico (PA) y ftalato ácido de potasio (Emsure[®]) de Merck, sulfato de cobre pentahidratado (99 %) de Cofarcas S.A., ácido sulfúrico (95 %, Analab) de VWR Chemical BDH, e hidróxido de sodio (97%) de Ercros.

Para llevar a cabo los análisis, se han preparado las siguientes disoluciones en agua destilada: NaOH 0.1 N, ftalato ácido de potasio 0.1 N, tiosulfato sódico 0.0551 M, yoduro potásico del 30 % (p/v) y ácido sulfúrico al 16 %. Se ha preparado también una disolución de almidón al 2 % (p/v) y una disolución alcalina 0.886 M de tartrato sódico de potasio. Por último, se ha dispuesto una solución cúprica de sulfato de cobre pentahidratado 0.17 M.

Por otro lado, se han preparado disoluciones patrón de 5, 8, 11, 14 y 17 mg/L de potasio a partir de una disolución madre de 100 ppm, obtenida a partir de cloruro potásico.

4.2. Materiales e instrumentación

Las medidas espectrofotométricas se han realizado con los espectrofotómetros UV-Visible Cary 50 Conc de Varian y UV-mini-1240 de Shimadzu y la determinación de potasio se ha llevado a cabo con el fotómetro de llama 410 de Corning. Por otro lado, la concentración de azúcares se ha determinado utilizando el refractómetro digital de bolsillo PAL-1 3810 de Atago y en las medidas de acidez y pH se ha empleado el valorador automático Metrohm 719S Titrino con el agitador magnético Metrohm 728 acoplado.

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

Las muestras se han filtrado con filtros de papel Whatman™ 597 y con filtros de jeringa de fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrofílico, de 25 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro, de Labbox. La determinación de ácido málico se ha llevado a cabo utilizando el kit enzimático Enzytec™ Liquid L-Malic Acid (E8280) de R-biopharm®.

Los análisis de datos se han realizado con el programa el programa STATGRAPHICS Centurion XVII [15] y el PLS Toolbox [16] de Matlab (versión 7.10, TheMathWorks).

4.3. Toma y preparación de la muestra para el análisis

Para llevar a cabo los análisis, se han recogido uvas de una parra ornamental, cada cuatro días aproximadamente, durante un período de 47 días (del 1 de octubre al 16 de noviembre de 2018) Una vez recogidas, las uvas se introducen en una bolsa de plástico que se mete al congelador para su posterior análisis. Se dispone de un total de 12 muestras distintas.

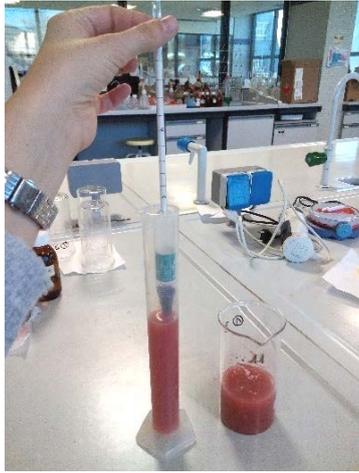
Aproximadamente 24 horas antes del análisis, las muestras se sacan del congelador para que se vayan descongelando poco a poco a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, se parten por la mitad de manera vertical para poder extraer las semillas y se tritura la pulpa (con hollejos incluidos) con una batidora a la velocidad más baja, para obtener el zumo. Como el mosto resultante es muy turbio, éste se somete a un proceso de filtración, que se divide en tres fases. El primer filtrado se obtiene al hacer pasar el zumo por un embudo Büchner mediante filtración a vacío, en esta etapa se consigue eliminar la mayor parte de los hollejos, pero el zumo sigue siendo muy turbio, por lo que se hace una segunda filtración con papel de filtro. Por último, antes de comenzar los análisis, se realiza una tercera filtración utilizando filtros de jeringa.

4.4. Procedimiento experimental.

Determinación de la densidad. Se toman aproximadamente 70 mL del mosto filtrado y se ponen en una probeta limpia. Se introduce el densímetro dejándolo caer y levantándolo un par de veces para asegurarse de que no toca las paredes de la probeta y, a continuación, se toma la medida (Figura 2.2)

Determinación del grado Brix. Tras hacer un blanco con agua destilada, se toma una gota de mosto con una pipeta Pasteur, se coloca en el visor del refractómetro y se lee la medida de azúcares totales expresada en grados Brix (Figura 2.2). El dispositivo realiza la corrección de temperatura de forma automática. Para determinar el grado alcohólico probable podríamos acudir a las tablas para la evaluación de los azúcares por refractometría de la OIV, en el método especificado anteriormente.

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas



(1)



(2)

Figura 2. Aerómetro (1) y refractómetro (2)

Determinación del pH. Se lleva a cabo con el valorador automático (Figura 3) después de calibrarlo con las soluciones reguladoras de pH 7.02 y 4.01. Para llevar a cabo la medida del pH del mosto simplemente se introduce el electrodo en el mosto y se anota la medida cuando esta se estabilice.



Figura 3. Valorador automático Metrohm 719S Titrino

Determinación de la acidez total. Se realiza igualmente con el valorador automático (Figuras 4.1 y 4.2) Para ello se toman 10 mL de mosto y 10 mL de agua destilada, y se añade NaOH, previamente valorada con ftalato ácido de potasio, hasta que el pH llega a 8,2.

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

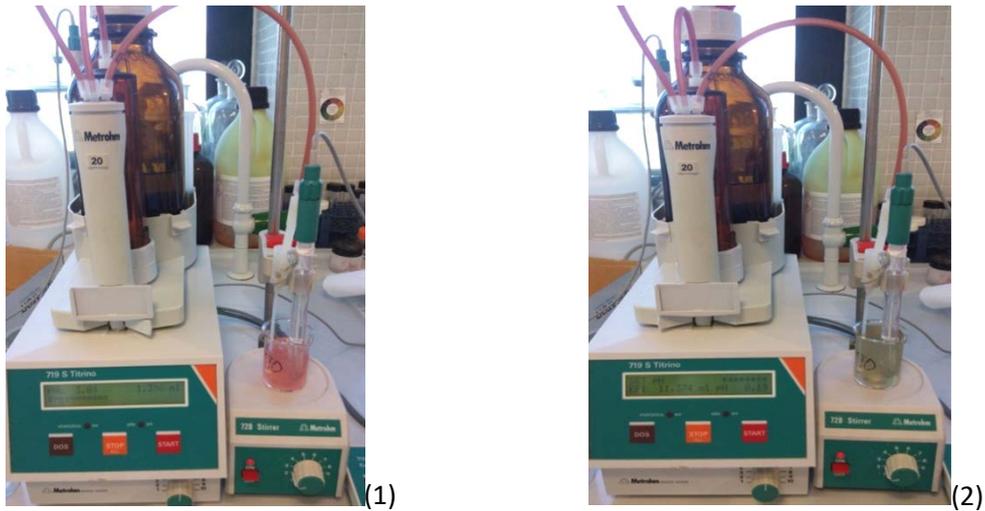


Figura 4. Valorador automático Metrohm 719S Titrino con agitador antes (1) y después de la valoración (2)

Determinación de los azúcares reductores. Se analizan siguiendo el método Rebelein, que consiste en una valoración con tiosulfato de sodio, la cual se realiza con dos tipos de buretas (Figura 5.1) En un matraz Erlenmeyer o en un vaso de precipitados se ponen: el mosto (o el mismo volumen de agua destilada en el caso del blanco) y la solución cúprica. Se añaden perlas de vidrio, se tapa y se coloca sobre una placa calefactora hasta ebullición durante dos minutos (Figura 5.2) En caliente, se añaden la solución alcalina y se mantiene en ebullición un minuto y medio más. Se deja enfriar y se añade yoduro potásico (Figura 6.1), ácido sulfúrico (Figura 6.2) y almidón, que actúa como indicador (Figura 7.1) Finalmente se valora con tiosulfato hasta color lechoso (Figura 7.2) La diferencia entre el volumen de tiosulfato gastado en el blanco (v) y en la muestra (v') da el contenido de azúcares reductores expresado en g/L.

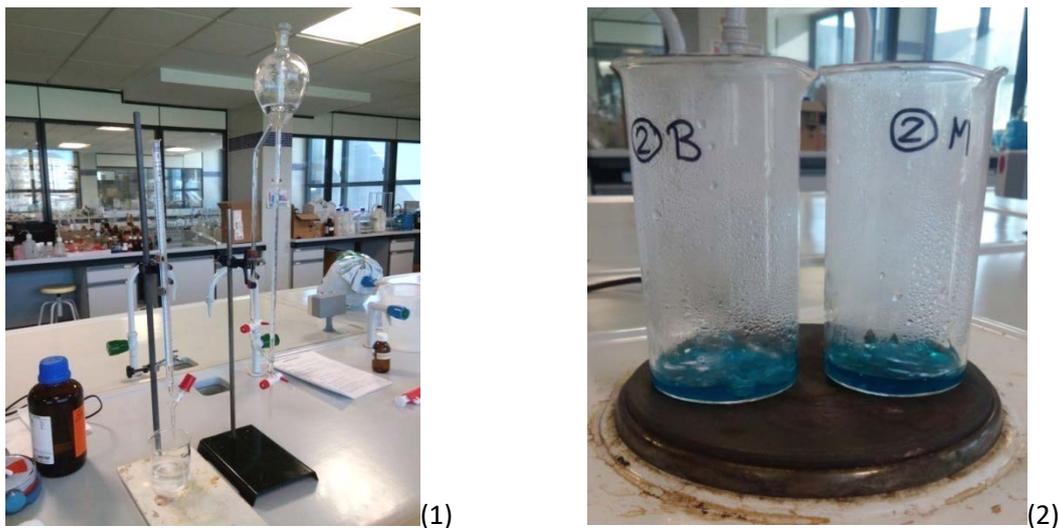


Figura 5. Bureta y microbureta de 25 y 2 mL (1) y ebullición de la muestra y el blanco con reducción del cobre (2)

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

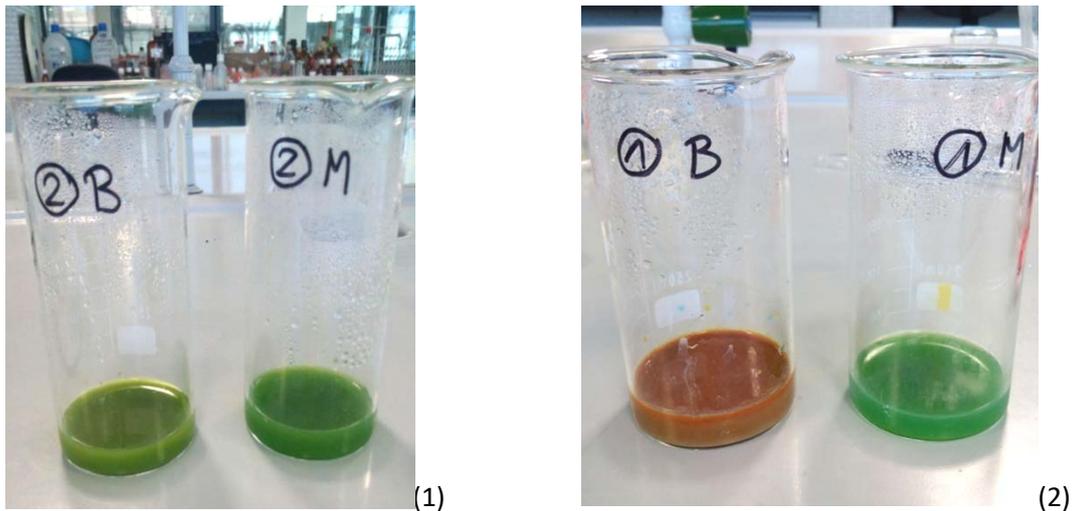


Figura 6. Blanco y muestra de mosto tras la adición del yoduro potásico (1) y del ácido sulfúrico (2)

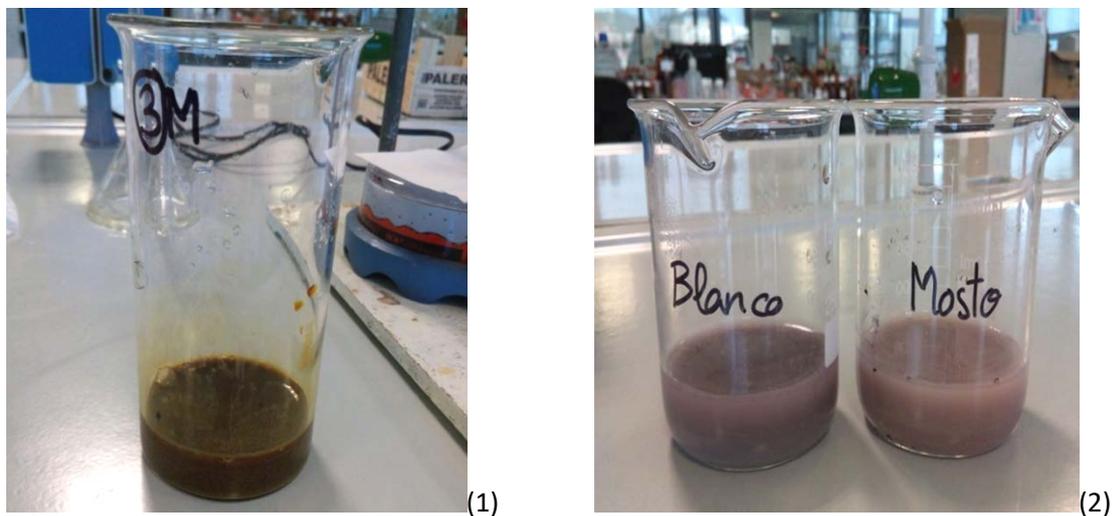


Figura 7. Muestra tras la adición de engrudo de almidón (1) y blanco y muestra tras la valoración con tiosulfato (2).

Determinación del potasio. En primer lugar, se lleva a cabo la medida de los patrones de calibrado utilizando el fotómetro de llama (Figura 8.2) Para medir las muestras de mosto, éstas se diluyen inicialmente 100 veces (0.25mL en 25 mL) y, en caso de que la señal supere a la del patrón más concentrado, se diluye de nuevo a la mitad.

Determinación del ácido málico. En primer lugar, se diluye la muestra en proporción 1:25 y a continuación se siguen las indicaciones del Kit enzimático. Se toman dos tubos de ensayo, uno para el blanco y otro para la muestra, y se marcan como "B" y "M" respectivamente. En el de la muestra se ponen 100 μ L (v) de la muestra diluida y en el del blanco, el mismo volumen de agua destilada. A cada uno de ellos se les añaden 2000 μ L del reactivo 1 (tampón, L-glutamato y glutamato-oxalacetato transaminasa) y se incuban a 37 °C durante 3 minutos. Luego, se calibra el espectrofotómetro y se mide la absorbancia de la muestra y el blanco a 340 nm (Figura 9) A las absorbancias obtenidas las llamaremos en cada caso A_{B1} o A_{M1} , dependiendo

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

de si se trata del blanco o de la muestra. Después, se añaden 500 μL del reactivo 2 (NAD y L-malato deshidrogenasa) a cada uno de los dos tubos, tras lo cual tanto las muestras como los blancos adquieren una coloración amarillenta. Se incuban de nuevo durante 1 minuto y se mide de nuevo la absorbancia a la misma longitud de onda. De manera análoga, las absorbancias obtenidas las denominaremos como A_{B2} y A_{M2} . Para determinar la concentración de ácido málico, se introducen los datos obtenidos en la siguiente ecuación:

$$C_{\text{L-málico}} [\text{g/L}] = (V * P_{\text{molecular}} * \Delta A) / (\varepsilon * d * v * 1000)$$

$$C_{\text{L-málico}} [\text{g/L}] = 0.5534 * \Delta A$$

Donde V es el volumen total (2600 μL), $P_{\text{molecular}}$ es el peso molecular del ácido málico (134,09 g/mol), ΔA se calcula como $(A_{M2} - df * A_{M1}) - (A_{B2} - df * A_{B1})$, df , es el factor de dilución (0,808), ε es el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm (6,3 L/mmol*cm) y d es el camino óptico (1 cm).



Figura 8. Fotómetro de llama

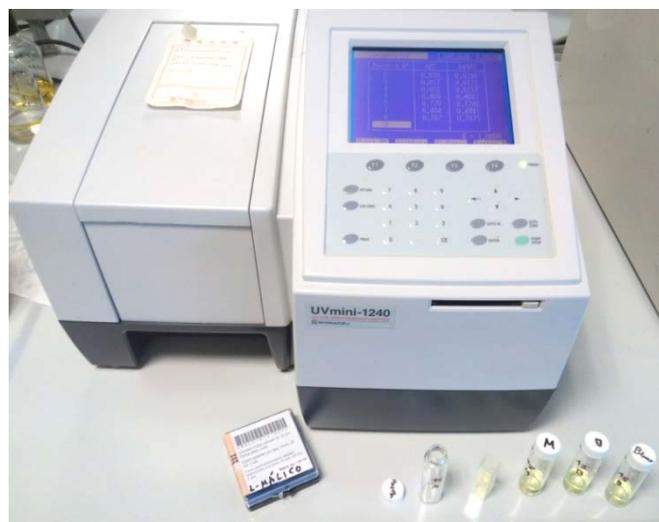


Figura 9. Espectrofotómetro UV-mini-1240 de Shimadzu.

Determinación de los polifenoles totales y de las características cromáticas.

Esta determinación se basa en una medida espectrofotométrica en la región visible (800-380 nm) y otra en el ultravioleta (400-200 nm). Para la medida en el espectro visible se utilizan cubetas de vidrio de 1 mm de camino óptico, mientras que para el ultravioleta se trata de cubetas de cuarzo de 10 mm de camino óptico (Figura 10)

Según la O.I.V., para obtener el índice de polifenoles totales se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{IPT} = A_{280} \cdot 100$$

Y de la misma manera, para obtener las características cromáticas, definidas por la intensidad colorante (I) y la tonalidad (N) se utilizan las siguientes fórmulas:

$$I = A_{420} + A_{520} + A_{620}$$

$$N = A_{420} / A_{520}$$

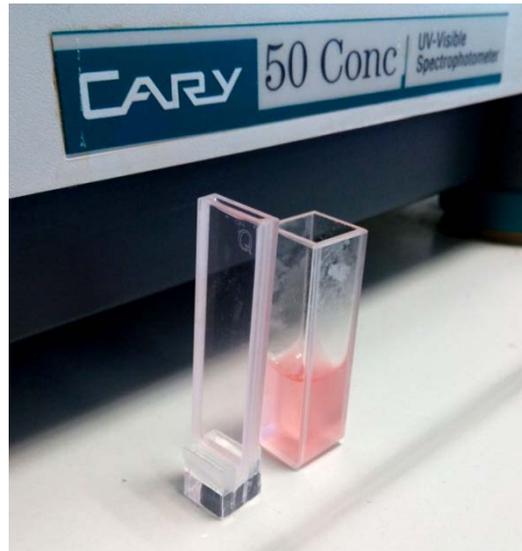


Figura 10. Cubetas de 1 y 10 mm para medir espectrofotométricamente en el espectro visible y en el ultravioleta, respectivamente.

5. Resultados y discusión

5.1. Determinaciones analíticas

Para llevar a cabo el seguimiento de la maduración de las uvas, se realizan en cada una de las 12 muestras recogidas a lo largo de 47 días, las determinaciones detalladas en el apartado “Procedimiento experimental”. Este seguimiento es importante de cara a determinar el momento propicio para la vendimia pues, dependiendo del tipo de vino que se quiera obtener, es decir, de los parámetros que se quieran potenciar como el color, el sabor, el grado alcohólico... se vendimiará antes o después. En la tabla 1 se pueden ver los resultados obtenidos tras cada determinación. Algunos de ellos se han considerado resultados anómalos al compararlos con el resto de datos obtenidos para cada parámetro (en la tabla se encuentran indicados en cursiva), por lo que han sido excluidos del resto del análisis. Para facilitar el estudio, el resto de datos se muestran de forma gráfica en la figura 11.

Los valores obtenidos para la **densidad** se encuentran dentro de los esperados para el mosto de uva, que suelen encontrarse entre 1,059-1,115 g/cm³. Como puede observarse en la figura 11.1, hay una cantidad significativa de sólidos disueltos, aunque no se acusa un cambio realmente significativo en la densidad, quizás una tendencia a aumentar ligeramente a medida que pasa el tiempo.

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

Tabla 1. Parámetros físico-químicos obtenidos a lo largo de los distintos días de maduración.

Parámetro	Día											
	1	5	9	12	15	20	24	29	33	37	42	47
Densidad (g/cm ³)	1,068	1,071	1,070	1,072	1,064	1,070	1,070	1,075	1,080	1,077	1,076	1,067
Azúcares (°Brix)	12,0	12,0	13,2	15,3	13,1	13,4	12,4	13,1	15,1	13,5	14,6	14,2
pH	3,20	3,20	3,41	3,49	3,27	3,25	3,14	3,30	3,39	3,45	3,46	3,33
Acidez (g/L tartárico)	11,5	11,2	10,0	11,4	11,4	12,6	11,4	11,4	10,1	10,5	10,5	12,7
Azúcares reductores (g/L)	1,20	0,80	0,28	0,87	0,63	0,05	0,12	2,73	0,08	1,12	0,73	0,17
Potasio (ppm)	1356	501	473	635	525	526	1052	913	681	771	1840	2140
Ácido málico (mg/L)	178,8	204,1	199,0	202,1	209,7	216,3	261,4	213,2	12,4	248,6	254,1	291,2
Polifenoles totales	53,2	34,7	18,8	65,1	61,0	57,1	69,4	66,3	70,4	68,5	69,3	78,7
Intensidad	1,09	4,12	1,15	1,49	1,42	1,23	1,82	1,35	1,77	1,82	1,35	1,74
Tonalidad	0,88	1,43	2,14	0,93	0,95	0,98	1,16	0,53	1,08	1,27	1,08	0,90

Como se ha señalado anteriormente, es muy importante que el viticultor conozca las propiedades de la uva en cada momento durante su desarrollo para, así, saber o aproximar cuándo podrá vendimiarse. Con la ayuda de un refractómetro, los viticultores pueden medir de forma muy sencilla la **concentración de azúcares** en unidades de grados Brix y relacionarla con el grado alcohólico probable, es decir el grado de alcohol que se espera que tenga el vino resultante tras la fermentación. Si en la fermentación todo transcurre correctamente, la cantidad de etanol formado debería ser directamente proporcional a la concentración inicial de azúcares. La sacarosa que pudiera quedar (que no se ha hidrolizado en fructosa y glucosa) aportará dulzor al vino.

Haciendo alusión a los resultados obtenidos para la concentración de azúcares, que se muestran en la tabla 1 y la figura 11.2, se podría decir que la tendencia es ascendente, es decir, la concentración de azúcares aumenta con la maduración. No obstante, los días 12 y 33 el aumento es mayor, se alcanzan valores más altos que los que cabría esperar teniendo en cuenta la pauta marcada por el resto de días. No obstante, esto entraría dentro de la variabilidad esperada entre las distintas muestras de uvas recogidas para realizar el estudio.

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

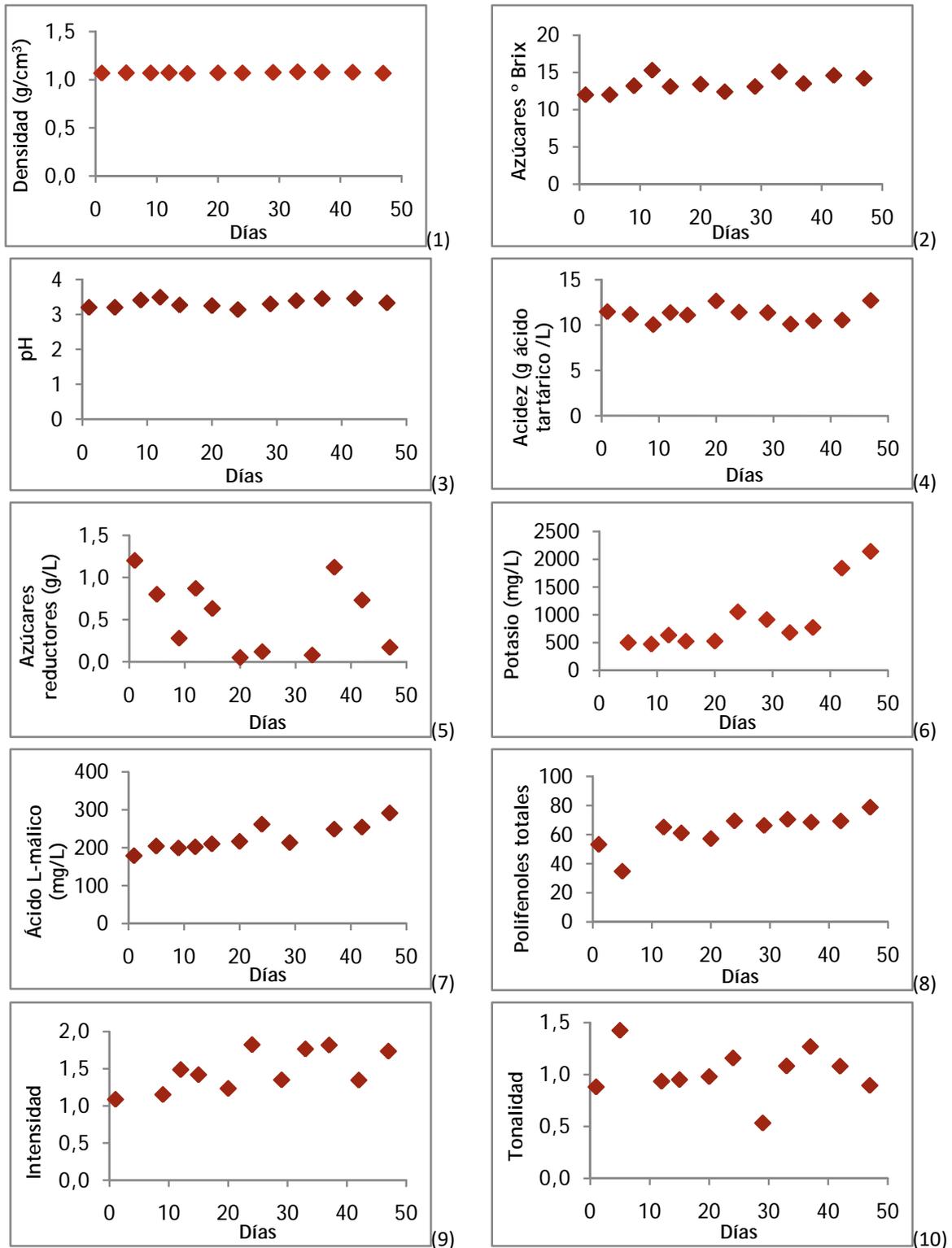


Figura 11. Parámetros físico-químicos analizados en las uvas a lo largo del período de maduración considerado.

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

Los **azúcares reductores** que podría haber en la uva son la glucosa y la fructosa, principalmente. Se podría suponer, que, así como la concentración de azúcares, expresados en grados Brix es ascendente, la concentración en azúcares reductores siguiera la misma tendencia, sin embargo, según los resultados obtenidos, se observa tanto en la tabla 1 como en la gráfica 11.5, que no es así. Esto puede deberse a que el tamaño muestral era pequeño, pues todas las uvas que se recogieron eran de una sola parra y no eran representativas de la planta entera. Esto puede influir en gran medida en los resultados de las diferentes determinaciones, puesto que condiciones climáticas distintas como la exposición al sol o la acumulación de más agua por lluvias influye en gran medida en los componentes de la uva [17].

De la misma manera que la concentración de azúcares está íntimamente relacionada con la maduración, lo están el **pH** y la **acidez**, pero en su caso de manera inversamente proporcional, ya que van disminuyendo conforme avanza la etapa de maduración del fruto. Como podemos observar en la tabla 1, el pH y la acidez no siguen una tendencia similar, lo cual es contradictorio pues, así como los valores de pH son más o menos constantes (alrededor de 3,3), para la acidez no se observa ninguna tendencia clara, por lo que no se evidencia si aumenta o disminuye. Esto se podría deber a que el mosto se comporta como una disolución tampón o reguladora. En el pH, además de los ácidos, influyen otras especies que participan en los equilibrios de hidrólisis e ionización de los ácidos. La acidez está expresada en ácido tartárico puesto que es uno de los principales ácidos de las uvas. Según la ref. [21], la calidad de las uvas para producir vino reside en que la acidez total del mosto, expresada en gramos de ácido tartárico por litro, tiene que ser mayor a 7,8. Además, tanto la acidez como el pH se ven influidos por la cantidad de otros ácidos orgánicos como el málico, del que se hablará más tarde. La variación de pH podría afectar a otras características como el aroma, la estabilidad del color o la facilidad para extraer antocianos.

Además, la acidez valorable se ve influenciada por la concentración de diferentes tipos de ácidos, de la concentración de potasio y del pH, por lo que es normal que cuando varíe uno de estos tres parámetros, la acidez total (expresada como ácido tartárico) se vea influenciada.

En cuanto a la concentración de **potasio**, como ya se ha indicado anteriormente, este elemento puede formar, en combinación con ácido tartárico, tartrato ácido de potasio, cuya solubilidad disminuye cuando lo hace la temperatura. Debido a la formación de cristales de hielo durante la congelación de las uvas, las células del tejido vegetal se rompen permitiendo la salida de sus componentes al exterior y haciendo que reaccionen entre sí formando sales ácidas, muy poco solubles y provocando la precipitación de las mismas [18]. Es posible que el hecho de que las determinaciones se hayan hecho tras un período de congelación haya influido tanto en la concentración de potasio como en la de ácido tartárico, aunque este efecto sería el mismo para todas las muestras. Sin embargo, según se observa en la figura 11.6, el potasio aumenta conforme avanza la maduración. Este aumento se podría justificar teniendo en cuenta que, durante la descongelación de las uvas, por el aumento de la temperatura, el tartrato ácido de potasio vuelve a solubilizarse [16] y podría disociarse de nuevo en potasio y ácido tartárico.

Según se observa tanto en la tabla de resultados como en la gráfica de manera más visual (figura 11.7), la evolución del **ácido málico** es claramente creciente conforme la

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

maduración avanza. Esto es algo contradictorio, puesto que en teoría [11], los ácidos disminuyen durante la maduración, pero el ácido málico se forma gracias a diferentes rutas metabólicas de los azúcares durante el periodo herbáceo, lo cual puede significar que este período aún no ha finalizado.

Los **polifenoles** se encuentran sobre todo en el hollejo [19], por lo que es esperable que esta parte de la uva tenga más color que la pulpa, incluso aunque la pulpa no contenga polifenoles y que su leve coloración provenga tan solo de lo que aporta la piel. Además de observar un claro aumento de los polifenoles con respecto al transcurso de los días en los resultados obtenidos (figura 11.8), la maduración en este caso se evidencia claramente por el cambio de color en las uvas, desde un verde claro hasta un rojo pálido.

Se podría decir que el color, así como otras determinaciones físicas entraría a formar parte del análisis sensorial. Sin embargo, como se ha visto, se puede hacer una valoración cuantitativa de la maduración de las uvas (y del mosto) atendiendo a las características cromáticas: **intensidad y tonalidad**, definidas anteriormente en el apartado 3, “Fundamento teórico”. Según los resultados obtenidos (figuras 11.9 y 11.10) se pueden observar diferencias entre la evolución de la intensidad y la de la tonalidad. La intensidad sigue claramente una tendencia ascendente, por lo que, sabiendo que este parámetro es inversamente proporcional a la luminosidad, podemos decir que las uvas se van oscureciendo conforme transcurre la maduración. Para la tonalidad, por su parte, no se observan cambios significativos en el tiempo de estudio.

5.2. Análisis multivariante

5.2.1. Análisis de componentes principales

El estudio de todos los parámetros físico-químicos determinados en las distintas muestras de uva se ha realizado de manera conjunta mediante un análisis de componentes principales. Este análisis se ha llevado a cabo con los datos de la tabla 1 autoescalados; el conjunto de datos inicial tiene dimensión 12×10 , donde 12 es el número de muestras (uvas recogidas en 12 días distintos de forma secuencial) y 10 el número de variables predictoras (determinaciones analíticas de las uvas). Sin embargo, en la tabla se pueden observar algunos datos anómalos, indicados en cursiva, que no siguen la pauta del resto de los datos y que se pueden considerar medidas erróneas. Estos datos se han eliminado antes del análisis.

Los autovalores y porcentajes de varianza explicada del análisis de componentes principales se pueden ver en las primeras filas de la tabla 2. Como los datos se autoescalan previamente, en principio habría que considerar relevantes únicamente las componentes principales con autovalores mayores de 1, es decir, las tres primeras componentes. Con ellas se explica casi el 75% de la variabilidad de los datos experimentales.

Sin embargo, cuando se representan gráficamente las puntuaciones de estas tres componentes (Figura 12), se puede ver cómo únicamente la primera componente principal se puede relacionar con el paso del tiempo y, por tanto, con el proceso de

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

maduración de las uvas. Las puntuaciones en la primera componente principal son mayores cuanto más maduras están las uvas.

Para establecer una relación entre la primera componente principal y los parámetros físico-químicos analizados, se deben estudiar los pesos de las variables en dicha componente. En la figura 13 se representan gráficamente estos pesos. Muestras con puntuaciones altas en la primera componente principal (Figura 12), tendrán valores más altos en las variables predictoras con pesos grandes (Figura 13), y viceversa. El análisis de componentes principales lleva a establecer que, en el período de tiempo considerado, todos los parámetros se incrementan en las uvas con el paso del tiempo excepto los azúcares reductores (variable 5), que se reducen ligeramente, y la acidez y la tonalidad, que no han experimentado grandes cambios.

Tabla 2 Análisis de componentes principales realizado con todos los datos y sin el día 12.

Modelo	Número de componentes principales	Autovalor	Varianza explicada (%)	Varianza acumulada (%)
Experimento completo	1	3,57	35,74	35,74
	2	2,38	23,78	59,53
	3	1,52	15,19	74,71
	4	0,94	9,36	84,07
	5	0,56	6,63	89,70
	6	0,46	4,95	94,28
Experimento sin el día 12	1	3,85	38,48	38,48
	2	2,36	23,57	62,05
	3	1,42	14,17	76,22
	4	0,99	9,90	86,11
	5	0,57	5,74	91,85
	6	0,40	4,00	95,85

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

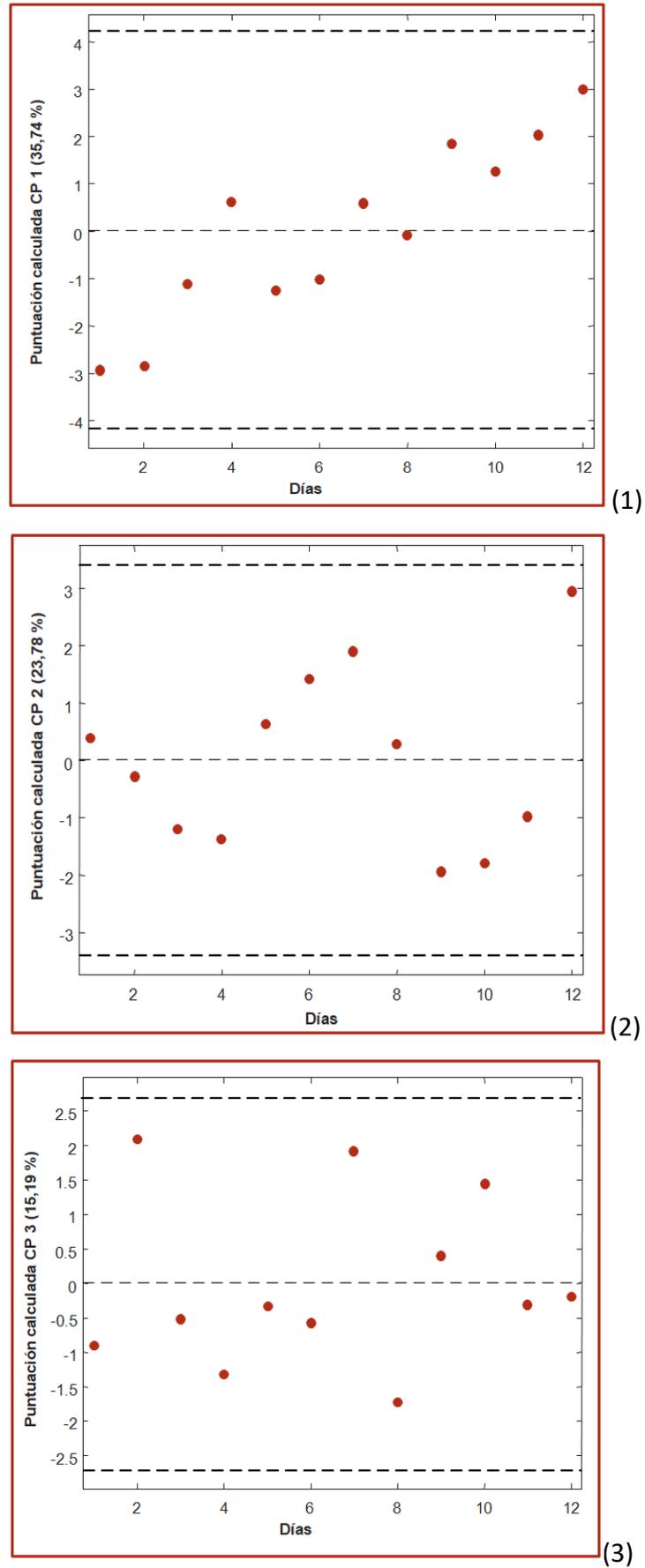


Figura 12. Puntuaciones de las tres primeras componentes principales en los días muestreados.

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

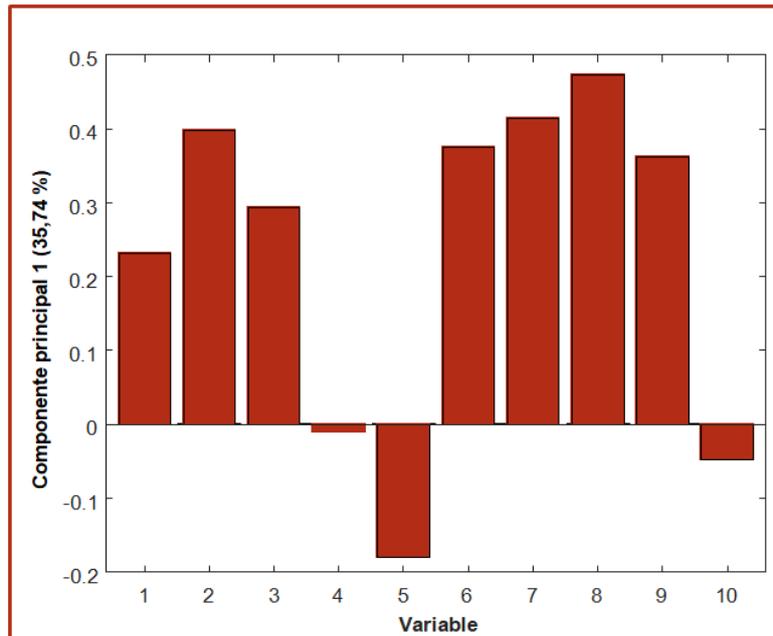


Figura 13. Pesos estimados para la primera componente principal. Variables: densidad (1), azúcares (2), pH (3), acidez (4), azúcares reductores (5), potasio (6), ácido málico (7), polifenoles totales (8), intensidad (9) y tonalidad (10)

5.2.2 Regresión de componentes principales

Con objeto de confirmar la relación de los parámetros físico-químicos considerados y el grado de maduración de las uvas, se construye un modelo de regresión multivariante. Se ajusta un modelo de regresión lineal múltiple por mínimos cuadrados, considerando como respuesta los días transcurridos hasta la recogida de la uva y como variables predictoras las puntuaciones de las muestras para las tres primeras componentes principales.

En las primeras filas de la Tabla 3 se muestran los parámetros correspondientes a dicho modelo de regresión. Este modelo explica el 93,20% de la varianza de la respuesta. Sin embargo, se puede ver que las estimaciones de los coeficientes b_2 y b_3 no son significativas a un nivel de significación del 5%. En ambos casos, dado que el P-valor del test de significación es mayor de 0,05, no se tienen evidencias suficientes para rechazar la hipótesis nula (hipótesis nula: el coeficiente no es significativo; hipótesis alternativa: sí que lo es).

Por ello, se ajusta un nuevo modelo de regresión por mínimos cuadrados considerando como variable independiente (z_1) las puntuaciones de la primera componente principal. Se debe tener en cuenta que, aunque este modelo es univariante, z_1 es una combinación lineal de todas las variables predictoras medidas. La ecuación del modelo, que tiene un coeficiente de correlación de 0,912, es la siguiente:

$$y = 22,829 + 7,222 z_1$$

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

Tabla 3. Parámetros y estadísticos de los modelos de regresión múltiple.

Modelo	Coficiente	Estimación	Desviación típica	Estadístico T	P-Valor
Experimento completo	b_0	24,24	1,41	17,25	0,000
	b_1	7,48	0,747	10,01	0,000
	b_2	0,34	0,960	0,350	0,737
	b_3	-0,37	1,24	-0,298	0,775
Experimento sin el día 12	b_0	23,82	1,44	16,57	0,000
	b_1	7,51	0,769	9,77	0,000
	b_2	0,682	0,982	0,695	0,510
	b_3	-0,140	1,27	-0,110	0,915

Al analizar los residuos estudentizados de las distintas muestras, se observa que hay una de ellas con un residuo anormalmente grande (-3,86), el cuarto dato de la figura 14.1 (día 12), cuyo valor absoluto supera el valor umbral de 2,5 y que, por tanto, debe ser eliminado.

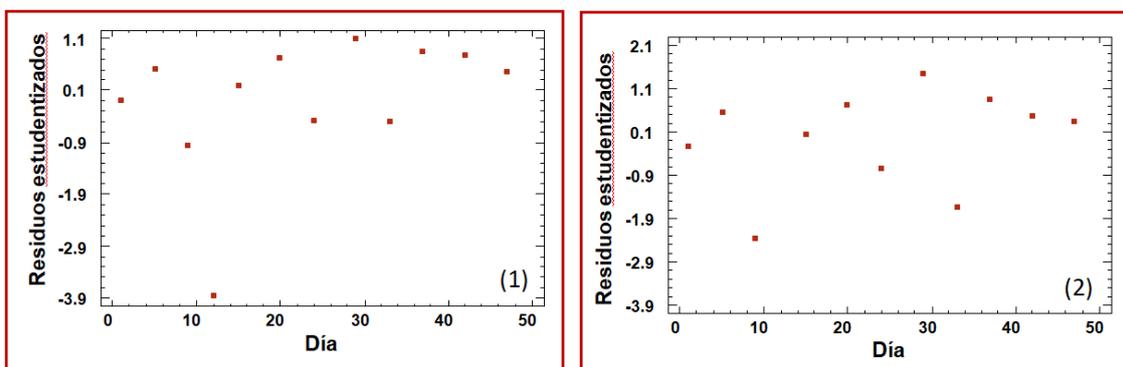


Figura 14. Residuos estudentizados de los modelos de regresión estimados con todas las muestras (1) y sin la del día 12 (2).

Se rehace el análisis multivariante completo con los datos restantes. La exclusión del día 12 del conjunto de datos apenas modifica el análisis de componentes principales anterior. Los porcentajes de varianza explicada por las cuatro primeras componentes principales construidas en este segundo análisis se muestran en la Tabla 2. Se puede ver que los valores de varianza apenas varían, y tampoco cambian prácticamente las puntuaciones y los pesos estimados, que son prácticamente idénticos a los mostrados, para la primera componente principal, en las figuras 12 y 13 respectivamente.

Se ajusta un nuevo modelo de regresión de componentes principales con las puntuaciones de las tres primeras componentes de este segundo análisis. Los coeficientes estimados en ausencia del día 12 se encuentran en la tabla 3. De nuevo, los coeficientes relacionados con las componentes principales segunda y tercera son

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

estadísticamente iguales a cero (p -valor $> 0,05$), por lo que se recalcula el modelo de regresión únicamente con las puntuaciones de la primera componente principal. En este caso no se ha detectado ningún residuo estudentizado que supere el valor umbral, como se puede ver en la figura 14.2, por lo que ningún dato se ha considerado anómalo. El modelo de regresión es el siguiente:

$$y = 23,819 + 7,508 z_1$$

El coeficiente de correlación de este modelo es 0,963, lo que quiere decir que los parámetros físico-químicos considerados, y transformados a través del análisis de componentes principales, están relacionados con la maduración de las uvas y explican el 96,3% de la variabilidad encontrada en éstas durante el transcurso de los días.

6. Conclusions

The analytical procedures for the determination of physico-chemical parameters on grapes have been successfully implemented in the laboratory.

The one at a time interpretation of each physico-chemical parameter does not provide a good enough global point of view to establish a relationship between them and the ripening of the grapes, but it highlights the patterns over time.

The joint study of the physico-chemical parameters by using multivariate methods of analysis has allowed extracting the relevant information about ripening and the role that each parameter plays.

Most of the parameters analysed increase as the time goes by, but some others like reducing sugars decrease. The acidity and the tonality decrease as well but in a lower proportion.

7. Acknowledgements

This work was supported by the Erasmus+ of the European Union programme (Project No. 2018-1-ES01-KA201-049936).

8. Bibliografía

1. Peñín, J., *Historia del vino – Ebook*. 2011, Espasa Libros, ISBN: 978-84-670-3845-3.
2. Hui, Y. H., editado por Sinha, N. K., Sidhu, J. S. *Handbook of fruits and fruit processing*. 2006. Blackwell Publishing, Parte III: 440-441. ISBN 978-0-8138-0894-9
3. Sotomayor, J.P., *Determinación de madurez en uvas para vinificar*. 1984, IPA, Quilamapu 22: 22-27
4. Meléndez, E., Íñiguez, M., Puras, P., Ortiz, M. C., Sarabia, L. A., *Las uvas también se catan*. 2010 Cuaderno de campo 45: 34-39
5. Meléndez, E., Íñiguez, M., Puras, P., Ortiz, M. C., Sarabia, L. A., *Las uvas también se catan (Segunda parte)*. 2011 Cuaderno de campo 46: 34-39
6. Orden de 27 de abril de 1988 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis de zumos de uva. Boletín Oficial del Estado núm. 110, de 7 de mayo de 1988, páginas 13905 a 13920.
7. Organización internacional del vino y la viña (OIV) *Compendium of international methods of wine and must analysis*, 2019. Volumen 1.
8. Organización internacional del vino y la viña (OIV) *Compendium of international methods of wine and must analysis*, 2019. Volumen 2.
9. ATAGO. Cuerpo visible: Bits of knowledge about refractometers. ATAGO. Recuperado de: https://www.atago.net/USA_es/pop_knowledge.html (último acceso: mayo 2019)
10. Cazorla García, J.; Xirau Vayreda, M. *Manual enología - Técnicas usuales de análisis en enología*. INCAVI y Panreac química S.A. (último acceso: mayo 2019) <http://www.usc.es/caa/MetAnalisisStgo1/enologia.pdf>
11. Benito Sáez, P., (2011), *Origen y evolución de los ácidos de la uva*. Urbina Vinos Blog. [Sitio web]. (último acceso: mayo 2019) Disponible en: <https://urbinavinos.blogspot.com/search?q=%C3%A1cido+tart%C3%A1rico>
12. Quinones, M., Miguel, M., Alexandre, A., *Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular (Revisión)* Nutrición hospitalaria 2012; 27 (1):76-89. ISSN 0212-1611. DOI:10.3305/nh.2012.27.1.5418
13. Cetó, X., Gutiérrez, J. M., Gutiérrez, M., Céspedes, F., Capdevila, J., Mínguez, S., Jiménez-Jorquerac, C., del Valle, M., *Determination of total polyphenol index in wines employing a voltammetric electronic tongue*, Analytica Chimica Acta 2012; 732: 172-179. DOI:10.1016/j.aca.2012.02.026
14. Méndez Sánchez, J. V. *Estudio de la maduración fenólica y antociánica en uvas tintas de bobal para diferentes condiciones agrológicas*. Tesis doctoral Universidad

Seguimiento multivariante de la maduración de las uvas

politécnica de Valencia (2005). (último acceso: mayo 2019) Disponible en: <https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/1853/tesisUPV2293.pdf>

15. Statgraphics Centurion XVII. Version 17.1.12 StatPoint Technologies, Inc., Herndon, VA, 2014

16. Wise, B.M., Gallagher, N.B., Bro, R., Shaver, J.M., Windig, W., Koch, R.S., PLS Toolbox 5.8.2, Eigenvector Research Inc., Manson, WA, (2010)

17. Hidalgo Togados, J., *La calidad del vino desde el viñedo*, 2006. Ediciones Mundi-Prensa. ISBN: 84-8476-279-3.

18. Threlfall, R., Main, G., Morris, J., *Effect of freezing grape berries and heating must samples on extraction of components and composition parameters of red wine grapes varieties*. 2006. Australian Journal of Grape and Wine Research, 12:161-169.

19. Peynaud, E., *Enología práctica. Conocimiento y elaboración del vino*. 1993, Ediciones Mundi-Prensa, ISBN: 84-7114-214-7.