



# UNIVERSIDAD DE BURGOS

## Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

*Determinación de algunos parámetros físico-químicos y seguimiento multivariante de la fermentación maloláctica en vinos*

**Estela Andrés Igea**

**Tutoras:** Ana Herrero Gutiérrez y Susana Palmero Díaz

2016-2017



Funded by the  
Erasmus+ Programme  
of the European Union



# Índice

Resumen-Abstract .....	1
1. Objetivos.....	1
2. Introducción .....	1
3. Fundamento teórico.....	4
3.1. Cromatografía plana .....	4
3.2. Análisis de componentes principales .....	5
3.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) .....	6
4. Experimental.....	7
4.1. Reactivos.....	7
4.2. Disoluciones y muestras .....	7
4.3. Materiales y equipos.....	8
4.4. Procedimiento experimental .....	8
4.4.1. Determinación del grado alcohólico .....	8
4.4.2. Determinación del pH .....	9
4.4.3. Determinación de la acidez total.....	9
4.4.4. Determinación de ácidos orgánicos mediante cromatografía en papel ..	10
4.5. Software .....	10
5. Resultados y discusión .....	11
5.1. Determinación de grado alcohólico, pH y acidez total en muestras de vino ..	11
5.2. Determinación de ácido málico, láctico y tartárico en vino mediante PLS .....	12
5.2.1. Determinación de ácido tartárico .....	13
5.2.2. Determinación de ácido málico .....	15
5.2.3. Determinación de ácido láctico .....	18
5.2.4. Validación de los métodos de análisis .....	20
5.2.4.1 Exactitud: precisión y veracidad .....	20
5.2.4.2 Límite de decisión y capacidad de detección.....	21
5.2.4.3. Recuperación. ....	21
5.3. Análisis de componentes principales .....	22
6. Conclusions .....	24
7. Acknowledgements.....	24
8. Bibliografía.....	24



## Resumen-Abstract

En este trabajo se lleva a cabo el análisis de algunos parámetros físico-químicos en vinos para estudiar la evolución de la fermentación maloláctica de los mismos. Se desarrolla un procedimiento analítico para determinar ácido tartárico, málico y láctico que implica el análisis de imágenes de las manchas obtenidas por un método de cromatografía en papel y regresión por mínimos cuadrados parciales de los datos obtenidos. También se determinan el grado alcohólico, la acidez total y el pH. Teniendo en cuenta todos estos parámetros, se lleva a cabo el seguimiento multivariante de la fermentación maloláctica mediante el análisis de componentes principales.

The analysis of some physicochemical parameters in wines is carried out in this work to study the evolution of their malolactic fermentation. An analytical procedure is developed to determine tartaric, malic and lactic acids, which involves the image analysis of stains obtained by a paper chromatography method and partial least squares regression of the obtained data. The determination of alcoholic strength by volume, total acidity and pH is also performed. The multivariate monitoring of the malolactic fermentation is performed taking into account all these parameters through principal component analysis.

## 1. Objetivos

Los principales objetivos de este trabajo son:

- Calcular algunos parámetros físicoquímicos del vino, como acidez total, pH y grado alcohólico, durante la fermentación maloláctica, realizada en distintas condiciones, de diferentes vinos.
- Estudiar la viabilidad de la determinación de ácido láctico, málico y tartárico en vino, utilizando calibración multivariante, a través del análisis de imágenes de manchas obtenidas mediante cromatografía en papel.
- Determinar la concentración de ácido láctico, málico y tartárico en diferentes vinos para el seguimiento de la fermentación maloláctica.
- Establecer las relaciones internas entre los diferentes parámetros durante la fermentación mediante el análisis de componentes principales.

## 2. Introducción

La vid (*Vitis vinífera*) fue la primera planta cultivada por el hombre, por lo que se considera uno de los factores determinantes de la evolución de nuestra especie. Para encontrar las primeras civilizaciones que la cultivaron tenemos que remontarnos unos siete mil años hasta una región al este del Mar Negro. De allí se extendió hacia el Mediterráneo, donde adquirió gran importancia. Tras la caída del Imperio Romano, el cultivo de la vid disminuyó considerablemente, pero gracias al importante papel que

adquirió el vino dentro de la Iglesia Católica, volvió a resurgir y se expandió por todo el mundo. En España, el cultivo de la vid alcanza su mayor esplendor tras la conquista de Granada y el descubrimiento de América, cuando se extendió por todos los rincones de la península. Gracias a la Revolución Industrial, la agricultura y, por tanto, el cultivo de la vid, evolucionaron notablemente. Durante muchos años, el vino ha jugado un papel importante en la dieta Mediterránea, llegando hasta nuestros días como una bebida muy apreciada, no sólo en el terreno de la gastronomía sino también en el del turismo [1].

Según Oriol Segarra, el **vino** es “una bebida alcohólica de baja graduación resultante de la fermentación completa o parcial del mosto, o zumo de la uva, que es el fruto de la vid (*Vitis vinifera*)” [1]. En función del tipo de uva que se emplee, se distinguen tres tipos de vino: tinto (uvas tintas), blanco (uvas blancas) y rosado (uvas tintas o mezcla de uvas tintas y blancas).

Durante la elaboración del vino se llevan a cabo dos tipos de fermentaciones: la **fermentación alcohólica**, realizada por levaduras y mediante la cual los azúcares del mosto se transforman en etanol y CO<sub>2</sub>, entre otros compuestos químicos; y la **fermentación maloláctica**, realizada por bacterias lácticas que transforman el ácido málico en ácido láctico y CO<sub>2</sub>. Mediante la fermentación alcohólica el mosto se convierte en vino; mientras que, durante la fermentación maloláctica, el vino ya formado, además de perder acidez, se suaviza y estabiliza, en cuanto al sabor [2].

Este trabajo se centra en el estudio de la **fermentación maloláctica**. Durante dicho proceso, se llevan a cabo una serie de cambios en el vino que pueden ser más o menos beneficiosos en función del producto que se vaya a elaborar. Estos cambios suelen ser beneficiosos solamente en vinos tintos, con algunas excepciones de vinos blancos en los que el nivel de ácido málico es muy elevado. Las **bacterias lácticas**, *Oenococcus oeni* en particular, son los microorganismos encargados de llevar a cabo este proceso, bajo unas condiciones determinadas. Suelen estar presentes de forma natural en la materia prima del vino o en las diferentes instalaciones de la propia bodega; aunque también pueden ser añadidas mediante preparaciones industriales con el fin de llevar a cabo la fermentación maloláctica si esta no se desarrolla espontáneamente [3].

El desarrollo de la fermentación maloláctica está determinado por diversos factores, tanto del propio vino como externos. Los que tienen mayor influencia son, principalmente, temperatura y acidez-pH del vino; aunque también influyen otros como la vendimia y maduración de las uvas, la época del año en la que se va a desarrollar la fermentación (influye en la temperatura de la bodega y, por tanto, del vino), la aireación del vino (las condiciones ideales son de anaerobiosis no estricta), la cantidad de alcohol etílico formado durante la fermentación alcohólica (pequeñas cantidades del mismo, 3-4%, estimulan el crecimiento bacteriano), la cantidad de anhídrido sulfuroso presente en el vino y los compuestos fenólicos del mismo. Además, también hay que tener en cuenta las necesidades nutricionales de las bacterias, así como la presencia de sustancias inhibitoras, y las interacciones que puedan tener con otros microorganismos presentes en el vino, que pueden ocasionar paradas de la fermentación.

La **temperatura** es un factor importante en el desarrollo de la fermentación maloláctica. Las bacterias lácticas pueden desarrollarse a una temperatura entre 10 y 30°C, siendo la temperatura óptima de 20 a 30°C. Por su parte, el **pH** del vino también juega un papel muy importante, encontrándose entre 4.2 y 4.5 el óptimo para el crecimiento de las bacterias lácticas. El pH mínimo de crecimiento es 2.9-3.0, aunque a un pH por debajo de 3.2, se ve muy limitado el crecimiento de estos microorganismos. Además del pH, también son importantes las concentraciones de diferentes ácidos, no sólo del ácido málico, sino también de otros como el láctico y el tartárico [3].

La presencia de **ácidos** en el vino es importante en cuanto a la calidad de los mismos, ya que, además de ser importantes determinantes del pH, son responsables en gran medida de la formación del color y del equilibrio gustativo. Los ácidos orgánicos más importantes presentes en las uvas, son el ácido tartárico y el ácido málico. El ácido **tartárico** es característico de las uvas (no aparece en otros frutos), en las que se encuentra en concentraciones que oscilan entre 5 y 10 g/L, y permanece constante durante el proceso de maduración. Por su parte el ácido **málico** está en las uvas a unas concentraciones entre 2 y 4 g/L. Esta concentración varía en función de la variedad de uva y va disminuyendo notablemente durante la maduración, ya que dicho ácido es empleado por la uva durante la respiración celular. El ácido málico, durante la fermentación maloláctica, se convierte en ácido **láctico**, que se encuentra en el vino en una concentración entre 0 y 2.5 g/L. Una vez formado, la concentración de ácido láctico presente en el vino no suele variar. Además de estos, hay otros ácidos presentes como el ácido acético o el ácido cítrico [3,4].

La determinación de los ácidos presentes en el vino se puede realizar mediante diversas técnicas, como: HPLC, espectrometría o cromatografía en papel. Esta última es la más sencilla, se puede llevar a cabo incluso en la propia bodega y se puede emplear tanto con fines cualitativos como cuantitativos.

En este trabajo, se determinan los ácidos presentes en los vinos mediante cromatografía en papel y su uso como técnica de análisis semicuantitativo.

Se han medido también otros parámetros enológicos como la acidez total, el pH y el grado alcohólico volumétrico. La acidez del vino puede expresarse de dos formas: mediante la **acidez total** que es “la suma de los ácidos valorables cuando se lleva el pH a 7 añadiendo una solución alcalina valorada” [5]; y mediante la determinación del **pH**, que mide la fuerza de dichos ácidos [6].

El **grado alcohólico volumétrico (%vol)** es igual al “número de litros de etanol contenidos en 100 litros de vino, medidos ambos volúmenes a la temperatura de 20°C” [5]. Dicho etanol se forma a partir de los azúcares de la uva que son fermentados por levaduras durante la fermentación alcohólica.

La cantidad de etanol puede medirse por distintos métodos, siendo el más sencillo el empleo de un vinómetro. Esta técnica, aunque es menos precisa, es una medida rápida que puede proporcionar información aproximada del grado alcohólico.

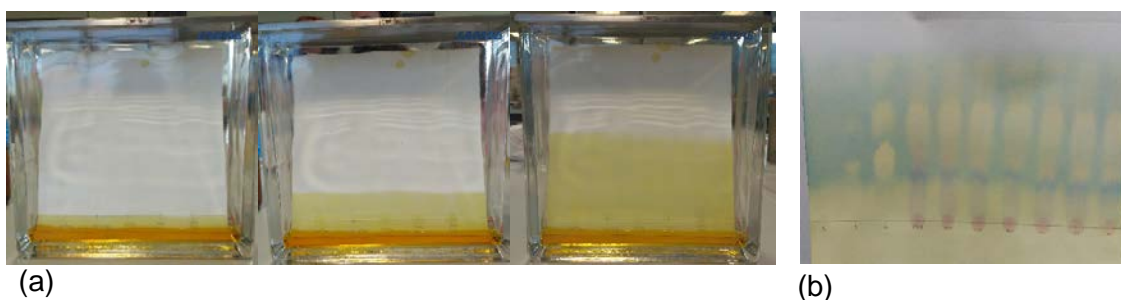
## 3. Fundamento teórico

### 3.1. Cromatografía plana

La **cromatografía** de líquidos es una técnica basada en la separación de moléculas o compuestos disueltos en una muestra. Dicha separación se lleva a cabo gracias al modo en el que las moléculas interactúan con el medio. Un sistema cromatográfico consta de una fase estacionaria formada por un soporte sólido, o un sólido con un líquido impregnado, a través del cual se desplaza una fase móvil [7].

La **cromatografía plana** es considerada la técnica cromatográfica más sencilla. La fase estacionaria, generalmente sólida, está soportada sobre la superficie de un plano, y la fase móvil es un líquido que fluye a través de ella, bien por capilaridad o por capilaridad y gravedad. En esta técnica, se coloca la muestra de la disolución que se quiere separar, en forma de mancha, en uno de los extremos de la fase estacionaria. Una vez que se ha secado la mancha, se pone en contacto el extremo en el que ésta se encuentra con la fase móvil que, anteriormente, se ha depositado en una cámara de cromatografía. Posteriormente se cierra dicha cámara de manera que, durante desarrollo de la prueba, la atmósfera se encuentra saturada de fase móvil. La separación de los componentes de la muestra problema resulta de la migración diferencial de los mismos en la misma dirección que fluye la fase móvil [8].

Un tipo de cromatografía plana es la cromatografía en papel (Figura 1a), en la que la fase estacionaria es un papel elaborado a partir de celulosa (el más utilizado es el papel Whatman) y la fase móvil un disolvente, que varía según la naturaleza de los solutos que se vayan a separar. La cromatografía se da por terminada cuando el frente de la fase móvil alcanza una altura determinada, generalmente unos dos tercios de la placa. Después, se deja secar y se revela para localizar las manchas en el papel (Figura 1b).



**Figura 1** (a) Cromatografía en papel en curso y (b) placa en proceso de revelado

Esta técnica se puede llevar a cabo para hacer determinaciones tanto cuantitativas como cualitativas. Las determinaciones cualitativas se suelen realizar con el fin de obtener una información aproximada de la movilidad de los solutos y, para ello, se tiene en cuenta el factor de retraso ( $R_F$ ). El valor de este factor se obtiene dividiendo la distancia recorrida por el soluto entre la distancia recorrida por la fase móvil.



Por otro lado, las determinaciones semicuantitativas se llevan a cabo comparando el color o las dimensiones de la mancha obtenida por el soluto problema, con los obtenidos en las manchas de distintas muestras patrón en las que se conoce la concentración de los solutos [8].

## **3.2. Análisis de componentes principales**

Cuando se estudia un sistema en el que se contemplan muchas variables, es probable que muchas de ellas no se tengan en cuenta por la complejidad del mismo. Para facilitar el estudio y poder considerar la información de todas las variables, se aplica el análisis de componentes principales (PCA).

El análisis de componentes principales [9] es una técnica estadística de análisis de datos que, reduciendo la dimensionalidad del sistema y estableciendo relaciones entre muestras (*u objetos*) y variables (*variables predictoras*), facilita la búsqueda de posibles tendencias en un conjunto de datos multivariante. Cuando se dispone de múltiples variables para cada muestra, las muestras se distribuyen en el espacio formando una nube de tantas dimensiones como variables se estudian. El análisis de componentes principales trata de reducir la dimensionalidad de este espacio, creando un nuevo sistema de coordenadas en el que las variables predictoras se sustituyen por las llamadas *componentes principales*.

Las componentes principales (para  $q = 1, \dots, q$ ) se obtienen como combinaciones lineales de las  $p$  variables originales:

$$CP_q = I_{q1}X_1 + I_{q2}X_2 + \dots + I_{qp}X_p,$$

donde  $I_{ij}$  son los coeficientes o *pesos*, que acompañan a cada variable, e indican su aportación a cada componente principal. La primera componente principal se construye en la dirección de máxima variabilidad de la nube de puntos; la segunda, en la siguiente dirección de máxima variabilidad, pero ortogonal a la anterior; y así sucesivamente. Es decir, las componentes principales, por cómo se construyen, no están correlacionadas.

Es habitual, para evitar el efecto de escala de las variables originales, que éstas se autoescalen (a cada valor se le resta la media de la variable correspondiente y se divide por su desviación típica), de modo que los pesos de todas las variables sean comparables. Por otro lado, las coordenadas de cada muestra en el espacio vectorial determinado por las componentes principales se denominan *puntuaciones*.

Para el diagnóstico de datos anómalos se utilizan dos índices, los estadísticos  $Q$  y  $T^2$  de Hotelling. La suma de cuadrados residual (estadístico  $Q$ ) indica el residuo ortogonal de cada objeto al espacio definido por las variables latentes consideradas en el modelo, mientras que el estadístico  $T^2$  de Hotelling denota la distancia al centroide de ese espacio multidimensional. Un objeto se considera anómalo si, para un nivel de confianza determinado, los valores de ambos índices superan simultáneamente los valores críticos correspondientes.

### 3.3. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

Cuando se dispone de varios parámetros en cada muestra, y se desea establecer una relación entre las variables predictoras y una variable respuesta, se debe recurrir a técnicas de calibración multivariante. Una regresión lineal múltiple de la concentración del analito de interés (*variable respuesta*) sobre las variables predictoras suele llevar a un sobreajuste al hacer máxima la correlación entre éstas últimas y la respuesta. Además, si existen correlaciones y colinealidades entre las variables predictoras se corre el riesgo de obtener modelos inestables y con poca capacidad de predicción.

Como alternativa, las técnicas de regresión sobre variables latentes posibilitan utilizar diversas variables predictoras aunque se encuentren muy correlacionadas. Entre éstas se encuentran la regresión sobre componentes principales (principal component regression, PCR) y la regresión por mínimos cuadrados parciales (partial least squares regression, PLS). Estos métodos construyen modelos de regresión utilizando la información de todas las variables predictoras para obtener unas nuevas variables, las variables latentes, buscando tener una alta capacidad predictiva.

PCR obvia los problemas originados por la correlación y la colinealidad y, además, reduce el ruido en el modelo de calibrado. Pero en este caso, al no existir relación alguna entre la obtención de las variables latentes (las componentes principales) y la variable respuesta, se corre el riesgo de subajustar el modelo. De modo que es posible que dicho modelo no tenga en cuenta información útil para explicar la respuesta, no necesariamente relacionada con las componentes principales de mayor varianza.

Otra opción es utilizar modelos de regresión PLS, contruidos con variables latentes en direcciones de máxima variabilidad en el espacio de las variables predictoras, pero evitando las no correlacionadas con la respuesta [10]. También en este caso, las variables latentes se construyen como combinaciones lineales de las variables originales, pero con este criterio, distinto del que se utiliza en PCR.

Existen diferentes estrategias para determinar el número de variables latentes que deben constituir el modelo, entre ellas se encuentra la *validación cruzada*, que consiste en predecir la respuesta en algunas muestras con un modelo PLS estimado a partir de las muestras restantes, repitiéndose el procedimiento con todas las muestras. Las variables latentes seleccionadas serán aquellas que proporcionen el modelo con la mejor capacidad predictiva, es decir, el que conduzca al menor error de predicción estimado a través del error cuadrático medio en predicción (root mean squares error of cross-validation, RMSECV). Cuando se utilizan el método *persianas venecianas*, las muestras a predecir se seleccionan en bloques con una alternancia determinada (cada muestra test se determina seleccionando cada objeto k-ésimo del conjunto de datos, comenzando por los objetos entre 1 y k).

Para la detección de datos anómalos, además de los dos índices descritos anteriormente, Q y  $T^2$  de Hotelling, se consideran los residuos estudentizados que dan una idea de la diferencia entre los valores de respuesta reales y los calculados y que, por provenir de una distribución normal con varianza uno, deben variar entre 2.5 y -2.5.

## 4. Experimental

### 4.1. Reactivos

Para la preparación de las muestras de calibrado se utilizan tres ácidos orgánicos: ácido L-málico 99% (Alfa Aesar); ácido tartárico 100% (Merck); y ácido L-láctico 85-90% (Merck). Para la fase móvil de la cromatografía en papel, se utiliza N-butanol 99.5% (Panreac); ácido acético 99.9% (VWR); y azul de bromofenol (Merck). En la determinación de la acidez total, se usa hidróxido sódico (NaOH) 99% (Panreac).

### 4.2. Disoluciones y muestras

Se dispone de tres muestras de vino iniciales (I1, I2 e I3), uno blanco, otro tinto y otro rosado, para análisis previos mediante cromatografía en papel. Asimismo, se dispone también de otra muestra de vino comercial rosado (vino D).

Para el seguimiento de la fermentación maloláctica, se parte de tres muestras de vino tinto etiquetadas como A, B y C, cada una de las cuales se somete a diferentes condiciones durante el desarrollo de la fermentación.

La muestra **A** se reparte en recipientes de 25 mL tapados y perforados con un tubo que permite la salida de gases, los cuales se recogen en un recipiente con agua. Se guardan en una caja cerrada, en la oscuridad, a una temperatura que oscila entre 19 y 23 °C. Con la muestra **B** se procede de la misma forma, pero se introduce en un armario, con un rango de temperaturas entre 20 y 25 °C. La muestra **C** se guarda en un único recipiente, también tapado y con salida de gases como en A y B, pero a temperaturas entre 16 y 20 °C.

Se recogen muestras con una frecuencia aproximada de 3-4 días, excepto en casos puntuales, y se congelan hasta el momento de su análisis. En el caso del vino C, a medida que se extraen muestras, el volumen liberado se completa con bolas de vidrio, para evitar el contacto con el oxígeno.

Se preparan disoluciones de calibrado de los ácidos tartárico, málico y láctico con las concentraciones que se muestran en la tabla 1:

**Tabla 1** Concentraciones de los diferentes ácidos de las muestras patrón.

Muestra	C <sub>ác. málico</sub> (g/L)	C <sub>ác. láctico</sub> (g/L)	C <sub>ác. tartárico</sub> (g/L)
1	0	0	0
2	0,5	1	0,5
3	1	2	1
4	2	4	2
5	3	6	3
6	4	8	4
7	5	10	5
8	3	12	6
9	7	14	7
10	8	16	8

Se preparan también muestras enriquecidas a partir de un vino tinto comercial, vino E, añadiendo una cantidad determinada de ácido málico y láctico. Así se preparan dos muestras enriquecidas: una con las concentraciones de ácido málico y ácido láctico de la muestra patrón 2; y otra con las concentraciones de la muestra patrón 4.

La preparación de la fase móvil de la cromatografía se lleva a cabo en dos pasos. En primer lugar, se prepara una disolución de N-butanol con azul de bromofenol. La fase móvil se completa añadiendo a esta disolución ácido acético al 50%.

Para llevar a cabo la medida de la acidez total, se prepara una disolución de hidróxido sódico 0.1332 M.

### **4.3. Materiales y equipos**

Los materiales y equipos empleados en este estudio, divididos por técnicas, son:

- Para el desarrollo de la cromatografía, se usa papel Whatman de celulosa 1CHR en el que se depositan las muestras utilizando una micropipeta (2-20  $\mu$ L) y una cámara cromatográfica de vidrio.
- Una vez realizada la cromatografía, para la cuantificación de los ácidos, se utiliza una cámara oscura para hacer fotografías de la placa cromatográfica con un teléfono móvil iPhone 4s con una cámara fotográfica de 8 MP.
- En la determinación del grado alcohólico se usa un vinómetro (0-25%, de Alla).
- Por último, tanto para la determinación del pH como de la acidez total se emplea un pH-metro (Hanna). Además, para la determinación de la acidez total se necesita una bureta para realizar la valoración.

### **4.4. Procedimiento experimental**

#### **4.4.1. Determinación del grado alcohólico**

La determinación del grado alcohólico se lleva a cabo mediante el empleo de un vinómetro. El vinómetro es un pequeño aparato, generalmente de vidrio, que se basa en el fenómeno de capilaridad para medir el grado alcohólico. Es menos preciso que otros métodos, ya que tiene una precisión de  $\pm 1^\circ$ , pero es muy rápido y requiere de muy poca cantidad de muestra, lo que hace que resulte un método adecuado para los objetivos de este trabajo.

Un vinómetro está compuesto por un pequeño tubo capilar graduado, con un extremo en forma de embudo por el que se introduce el vino, y otro terminado en punta (Figura 2a). La medición del grado alcohólico debe realizarse a  $15^\circ\text{C}$ , ya que la escala del capilar está graduada para la medición del vino a dicha temperatura.



**Figura 2** (a) Vinómetro y (b) llenado del vinómetro

Se añade vino por el extremo en forma de embudo hasta que salga por el otro extremo (Figura 2b). Cuando el vino está repartido por todo el capilar, se gira el vinómetro, de forma que el extremo con forma de embudo queda hacia abajo, y se dispone sobre una superficie plana. El grado alcohólico del vino se corresponde con el nivel que alcanza el mismo en la escala graduada del capilar.

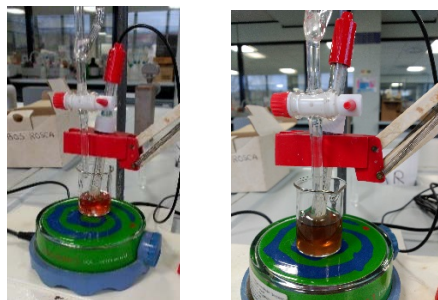
Este hecho se produce gracias al fenómeno de capilaridad. El vino es una mezcla de agua y alcohol. El agua presente en el vino tiende a subir a través de las paredes del tubo por capilaridad, mientras que el alcohol tiene la capacidad de modificar este fenómeno. Cuanto mayor sea la concentración de alcohol, la capilaridad de la mezcla será menor y, por lo tanto, el vino desciende más a través del tubo.

### 4.4.2. Determinación del pH

El pH, concentración de iones hidrógeno, se determina mediante el empleo de un pH-metro y un electrodo de vidrio. El pH-metro se calibra previamente introduciendo el electrodo en dos soluciones tampón, una de pH 4 y la otra de pH 7. Una vez calibrado, se procede a la medición del pH del vino. Para ello, se introduce el electrodo en el vino, que se encuentra en agitación para mantener la muestra homogénea. El valor de pH se obtendrá una vez que se haya estabilizado la medida.

### 4.4.3. Determinación de la acidez total

La acidez total se determina mediante una valoración de la muestra de vino con hidróxido sódico (NaOH) [11]. En primer lugar, se prepara una solución de NaOH 0.1332M la cual se dispone en una bureta. Las muestras de vino que se van a medir se colocan en un pequeño vaso de precipitados y se someten a agitación con el fin de que la muestra sea homogénea durante toda la medida. A continuación, se introduce el electrodo del pH-metro (previamente calibrado, como se explica en el apartado 4.3.2) en la muestra de vino y se añade NaOH hasta que el pH llegue a 7 (Figura 3).



**Figura 3** Medida de la acidez total mediante valoración con NaOH

Cuando se llega a este punto y la medida se estabiliza, se anota el volumen de NaOH gastado en la valoración y se calcula la acidez total mediante la siguiente ecuación:

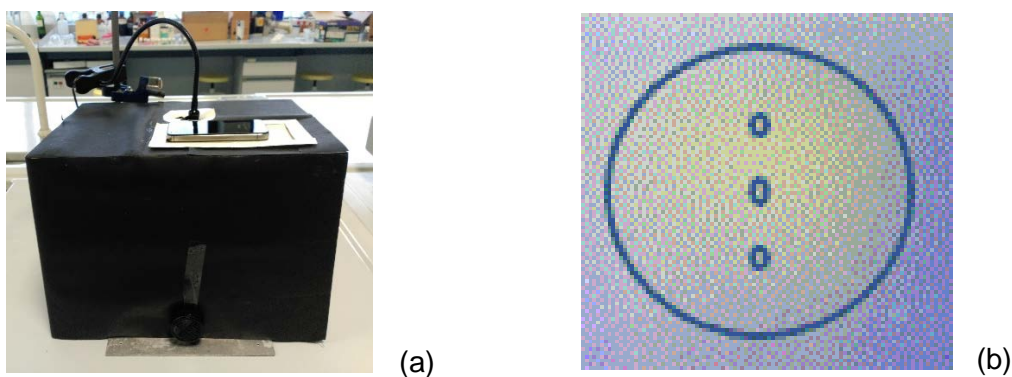
$$\text{Acidez total (g/L)} = \frac{V \times 0.1332 \times 75}{v} \quad [11]$$

donde  $V$  es el volumen (mL) de NaOH 0.1332M gastado en la valoración y  $v$  es el volumen (mL) de la muestra de vino que se ha valorado.

#### **4.4.4. Determinación de ácidos orgánicos mediante cromatografía en papel**

Para llevar a cabo cada análisis se deposita un volumen determinado de muestra en una placa de papel Whatman de celulosa 1CHR, de dimensiones 20 × 20 cm, y se deja secar. De las muestras de calibrado y las muestras enriquecidas se realiza una única inyección de 5  $\mu$ L, mientras que, en el caso de muestras de vino, se realizan cinco inyecciones de 5  $\mu$ L, secando el papel entre cada una de ellas. La placa cromatográfica se introduce en una cámara de desarrollo de vidrio en la que se dispone en el fondo un volumen de fase móvil suficiente para que alcance una altura de 1 cm. Se tapa la cámara de desarrollo y, una vez que el frente del disolvente alcanza aproximadamente el 75-80% de la longitud de la placa, ésta se saca y se deja secar al aire durante 24 horas, para que se produzca el revelado de las manchas.

Para la determinación semicuantitativa de los ácidos, se hace una fotografía digital con el teléfono móvil en la cámara oscura (Figura 4a) cuyo interior es de color blanco. Se coloca la placa revelada sobre un soporte a una altura fija y se ilumina con un foco LED de 2 W con luz de color blanco cálido (3000 Kelvin). Posteriormente, en cada mancha de la imagen digital se traza un ovalo abarcando la superficie de la mancha, y se cuantifica la altura y anchura del mismo. Se marcan tres puntos equiespaciados entre el extremo superior y el inferior del óvalo (Figura 4b) y, en cada uno de ellos, con ayuda del programa Paint, se cuantifican los valores de matiz, saturación y luminosidad, así como las coordenadas RGB, rojo, verde y azul.



**Figura 4** (a) Cámara oscura para realizar las fotografías digitales de las placas cromatográficas y (b) puntos para el análisis cuantitativo de cada mancha.

#### **4.5. Software**

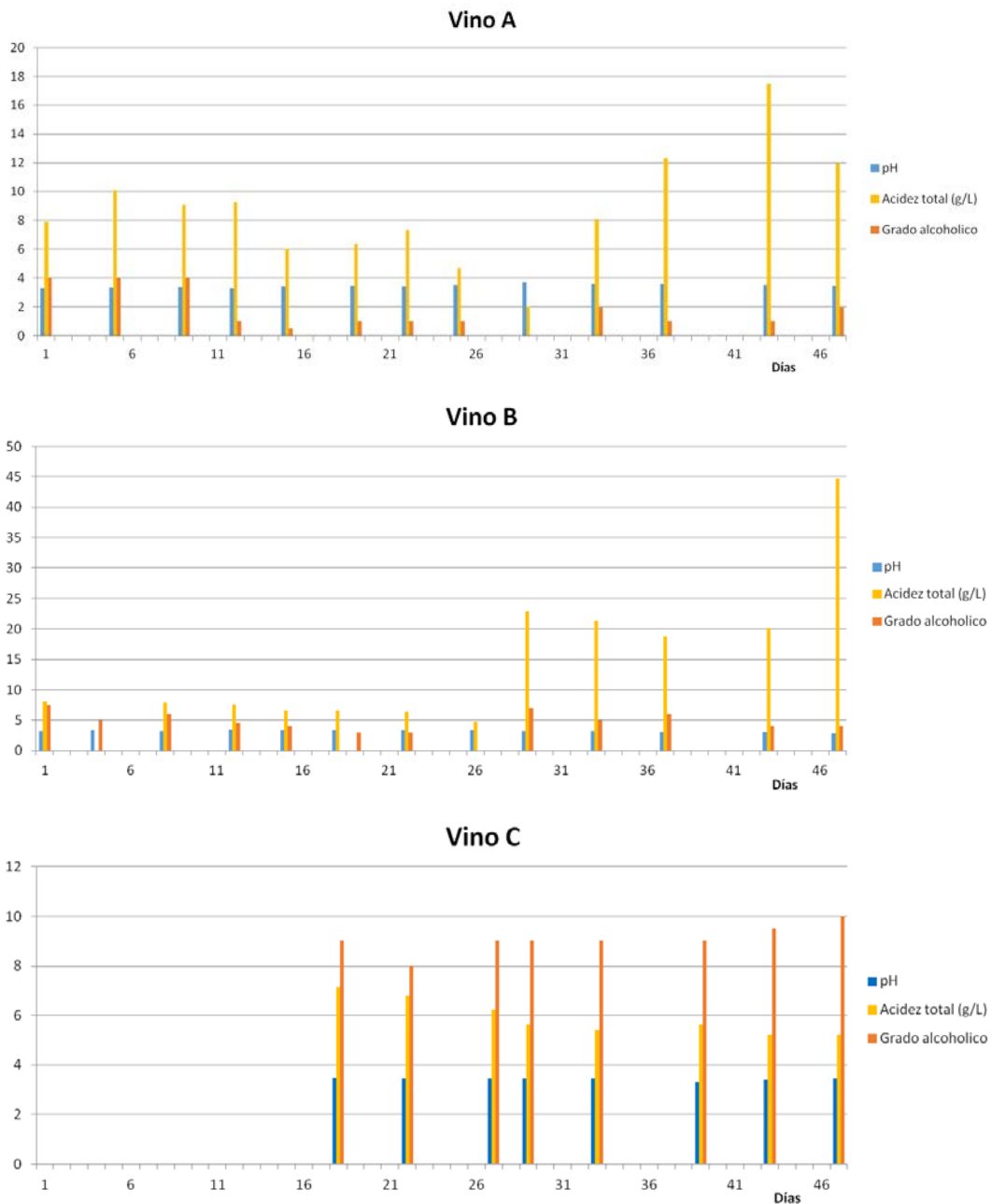
Las regresiones univariantes y el análisis de componentes principales se realiza utilizando el programa Statgraphics [12], y los modelos de regresión por mínimos cuadrados parciales se obtienen con el PLS Toolbox [13] de Matlab 7.0 [14].

## 5. Resultados y discusión

### 5.1. Determinación de grado alcohólico, pH y acidez total en muestras de vino

En primer lugar, se determina el grado alcohólico, el pH y la acidez total en las muestras de vino A, B, C y D, utilizando los procedimientos experimentales detallados en el apartado 4.4.

En la Figura 5 se muestra la evolución de estos tres parámetros en los vinos A, B y C durante el desarrollo de la fermentación maloláctica.



**Figura 5** Evolución del pH, acidez total y grado alcohólico de los vinos A, B y C durante la fermentación maloláctica.



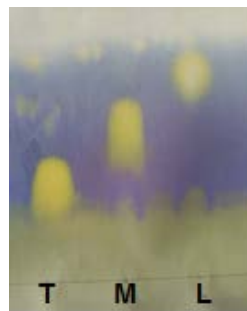
En el vino A (Figura 5), el pH se mantiene prácticamente constante durante todo el proceso; el grado alcohólico parece que tiende a disminuir, mientras que la acidez total proporciona valores más altos al final del período considerado, aunque estos dos últimos parámetros fluctúan bastante. Esto podría deberse al deterioro de la muestra y a una falta de homogeneidad de unas muestras a otras. En este caso es posible que el vino no hubiera completado la fermentación alcohólica al comenzar este experimento.

Del mismo modo que en el caso anterior, en el vino B (Figura 5), el pH apenas varía a lo largo del desarrollo de la fermentación maloláctica; lo mismo ocurre con el grado alcohólico, que no sufre grandes variaciones. Por último, se ve cómo la acidez total se mantiene constante hasta un punto en el que aumenta considerablemente. Dicho punto se corresponde con día 29, fecha en la que el vino se cambió a otro lugar de almacenamiento y, por tanto, cambiaron las condiciones de fermentación, con temperaturas ligeramente más bajas.

Por último, en el vino C (Figura 5), se puede observar que el valor del grado alcohólico es mayor que en los vinos A y B. Esto es debido a que, a diferencia de los dos vinos anteriores, probablemente éste ya había terminado la fermentación alcohólica en el momento de ser sometido a las condiciones necesarias para el desarrollo de la fermentación maloláctica. El pH no sufre desviaciones notables; y, por último, la acidez va disminuyendo paulatinamente, a pesar de que también se cambia la ubicación de la muestra a partir de la quinta medida. El descenso en la acidez total se debe a que parte de la acidez fija se transforma, a medida que pasa el tiempo, en gas carbónico, que se desprende.

## **5.2. Determinación de ácido málico, láctico y tartárico en vino mediante PLS**

Todas las muestras en estudio se pinchan en placas cromatográficas siguiendo el procedimiento experimental descrito en el apartado 4.4.4. La identificación de cada ácido analizado se lleva a cabo comparando la posición de la mancha cromatográfica correspondiente con la obtenida a partir de un patrón conocido (figura 6).



**Figura 6** Placa cromatográfica de patrones. El ácido láctico (mancha de la derecha) avanza más deprisa, seguido del málico (mancha central) y a continuación el tartárico (izquierda).

Como muestras de calibrado se consideran las diez muestras patrón indicadas en la tabla 1, más tres muestras patrón que se pinchan en cada placa cromatográfica para recoger en el modelo de calibrado la variabilidad debida al cambio de placa. Se pinchan las muestras 1, 3 y 10 en todas las placas cromatográficas, salvo en la placa de las muestras enriquecidas en la que se pinchan las muestras 1, 2 y 4. En total se



dispone de 34 muestras de calibrado. Las concentraciones de ácido málico y tartárico se encuentran entre 0 y 8 g/L, mientras que las de ácido láctico van de 0 a 16 g/L, debido a la menor sensibilidad de la técnica cromatográfica para este último ácido.

Los modelos de calibrado multivariantes se construyen a partir de las variables experimentales especificadas en el apartado 4.4.4. En cada una de las muestras se consideran 20 variables predictoras: la altura y anchura de la mancha cromatográfica, y los seis parámetros de color en cada uno de los tres puntos seleccionados en dicha mancha.

Las matrices de calibrado tienen de dimensión 34x20, mientras que la variable respuesta, la concentración del ácido correspondiente, es un vector de dimensión 34x1. Los modelos PLS se construyen con los datos autoescalados y utilizando ventanas venecianas (k=4) como método de validación cruzada.

### 5.2.1. Determinación de ácido tartárico

En primer lugar, se construye el modelo de calibrado para el ácido tartárico. La tabla 2 muestra los porcentajes de varianza explicada de las variables predictoras y la respuesta, así como los errores cuadráticos medios en calibración (root mean squared error of calibration, RMSEC) y en predicción (RMSECV), en función del número de variables latentes que se consideren.

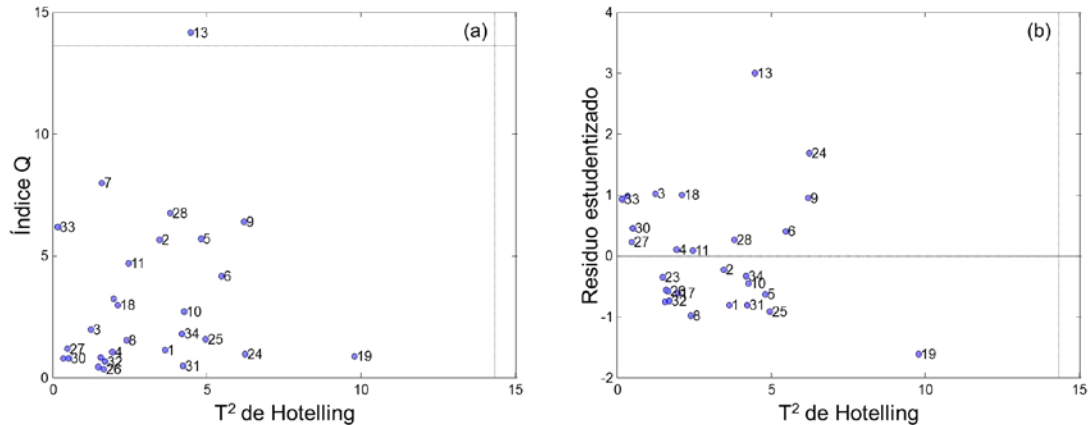
**Tabla 2** Varianzas explicadas por los distintos modelos en el análisis de ácido tartárico y errores cuadráticos medios en predicción (RMSECV) y en calibrado (RMSEC).

Modelo	Variabes latentes (V.L)	Varianza explicada X (%)	Varianza explicada Y (%)	RMSECV	RMSEC
Con todos los datos	1	51,90	78,91	1,59	1,49
	2	81,03	88,34	1,31	1,11
	3	85,06	93,02	1,27	0,86
	4	92,68	94,42	1,31	0,77
	5	93,85	96,36	1,47	0,62
	6	95,36	96,89	1,47	0,57
Sin el dato 13	1	52,47	82,58	1,48	1,37
	2	81,47	93,28	0,96	0,85
	3	90,06	95,31	0,85	0,71
	4	93,53	97,16	0,79	0,55
	5	94,41	97,95	0,92	0,47
	6	95,50	98,10	0,90	0,45
Sin los datos 13 y 5	1	54,56	82,95	1,52	1,38
	2	81,56	93,64	0,98	0,84
	3	89,57	96,18	0,79	0,65
	4	94,09	98,36	0,61	0,43
	5	95,41	99,10	0,56	0,32
	6	97,05	99,19	0,57	0,30

El modelo obtenido con todos los datos debe constar de tres variables latentes ya que es el que conduce a un valor mínimo del error en predicción, RMSECV (tabla 2). Este modelo explica el 93.02% de la variabilidad de la respuesta. No se encuentra ningún dato anómalo que supere simultáneamente los valores umbral establecidos, con un nivel de confianza del 99%, para los índices Q y T<sup>2</sup> de Hotelling (figura 7a). Sin

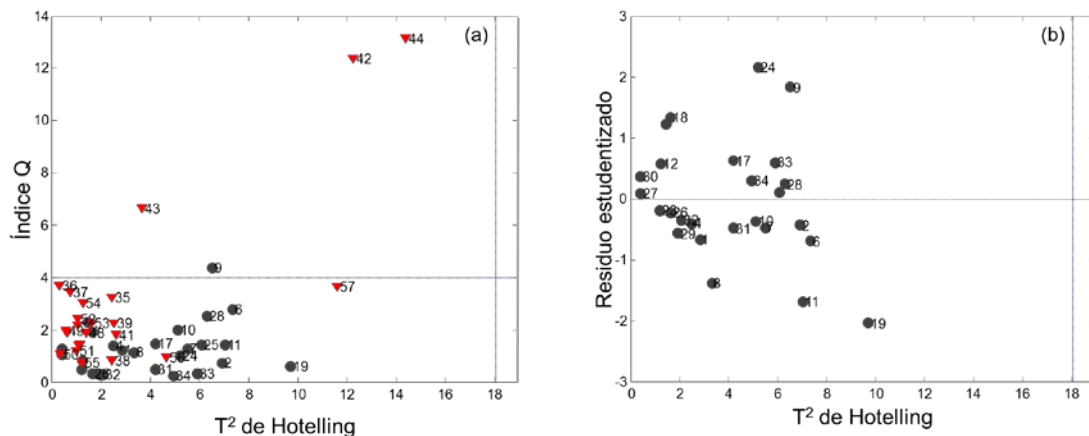
embargo, al considerar los residuos estudentizados se observa que el dato 13 tiene un residuo de 3.01 (figura 7b), que supera el umbral de  $|2.5|$ , por lo que debe ser eliminado.

Se construye un nuevo modelo sin ese dato anómalo, que consta de cuatro variables latentes y explica un 97.16% de la varianza de la respuesta (tabla 2). En este modelo se encuentra que el dato 5 tiene un residuo estudentizado de -2.42, muy próximo a -2.5, y que difiere mucho de los residuos del resto de datos, por lo que se decide eliminarlo también.



**Figura 7** (a) Índices Q y T<sup>2</sup> de Hotelling, a un nivel de confianza del 99%, y (b) residuos estudentizados del modelo de calibrado construido con todos los datos en la determinación de ácido tartárico.

El modelo de calibrado final (puntos negros en la figura 8), en el que no se encuentran ya datos anómalos, tiene cuatro variables latentes y explica el 98.36% de la varianza de la concentración de ácido tartárico (tabla 2).



**Figura 8** (a) Índices Q y T<sup>2</sup> de Hotelling, a un nivel de confianza del 99%, y (b) residuos estudentizados del modelo de calibrado construido sin los dos datos anómalos en la determinación de ácido tartárico. En negro, muestras de calibrado; en rojo, muestras test.

Este modelo se utiliza para predecir la concentración de ácido tartárico en las muestras de vino. En muchas de ellas no se observan manchas cuantificables, como ocurre con los vinos A, C y D. La matriz de las muestras problema en este caso tiene

de dimensión 23x20 y está constituida por 7 medidas replicadas del vino E (cuatro de ellas enriquecidas con los otros dos ácidos), las 3 muestras de los vinos I1, I2 e I3, y 13 muestras del vino B que fueron recogidas y almacenadas entre el 28 de octubre y el 13 de diciembre.

En primer lugar, se comprueba la idoneidad del conjunto test respecto del conjunto de calibrado mediante el cálculo de los índices Q y T<sup>2</sup> de Hotelling de las muestras problema en el espacio vectorial definido por las variables latentes del modelo, con un nivel de confianza del 99%. La figura 8a muestra los valores encontrados de estos dos índices para las muestras problema, que aparecen en rojo. Algunas muestras (42, 43 y 44) superan el umbral para el índice Q, lo cual indica que presentan un residuo ortogonal al espacio definido por las variables latentes del modelo grande, pero el índice T<sup>2</sup> de Hotelling no supera el valor umbral correspondiente, por lo que se considera que son compatibles con las muestras de calibrado.

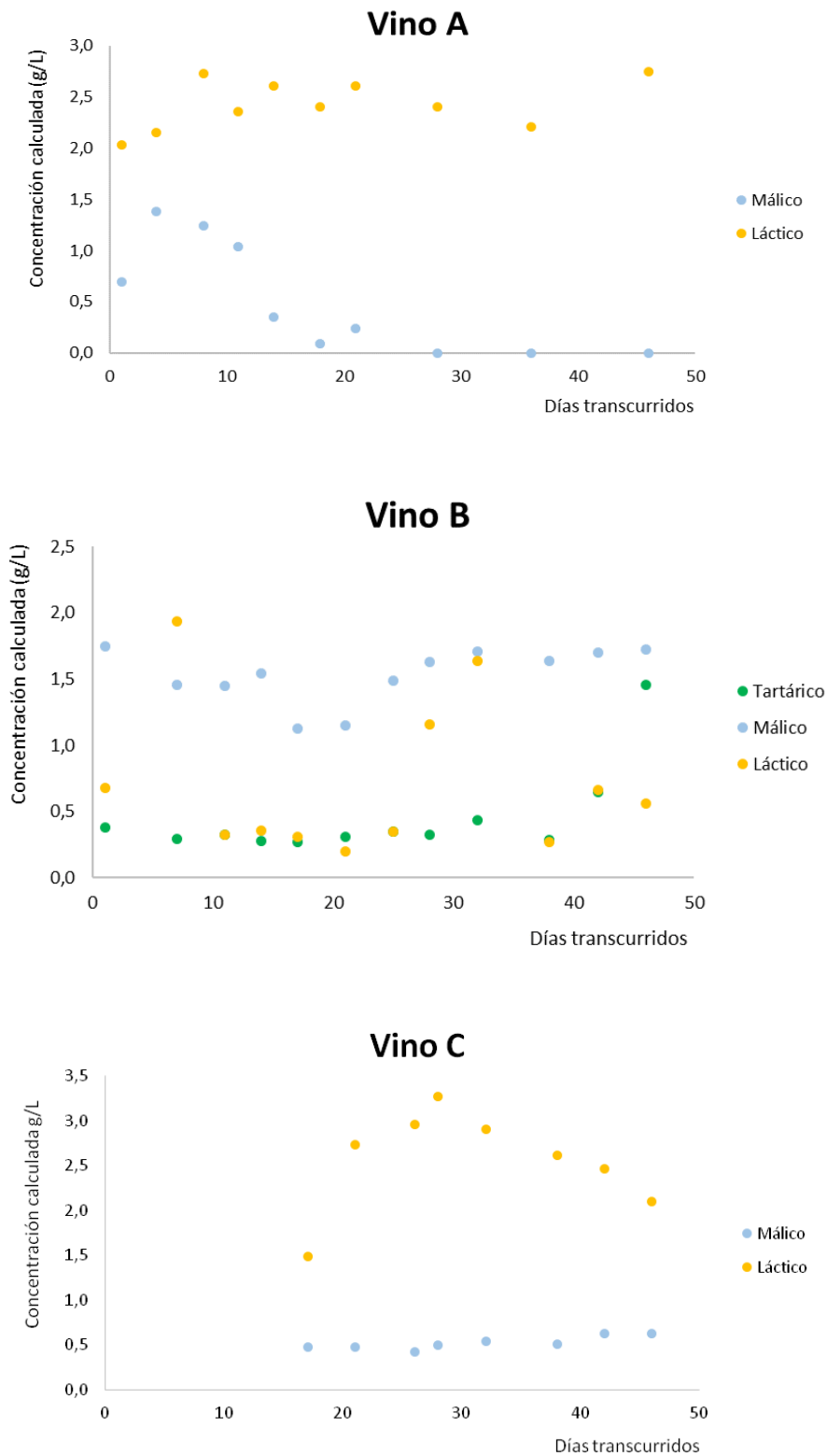
Como ya se ha indicado anteriormente, no se ha encontrado ácido tartárico en los vinos A, C y D. Las concentraciones halladas en las muestras del vino B se muestran en la figura 9.

### **5.2.2. Determinación de ácido málico**

A continuación, se estima el modelo PLS para el ácido málico. Para que el valor de RMSECV sea mínimo, el modelo calculado, teniendo en cuenta todos los datos, debe constar de dos variables latentes (tabla 3). De este modo, el modelo explica un 86.36% de la varianza de la respuesta.

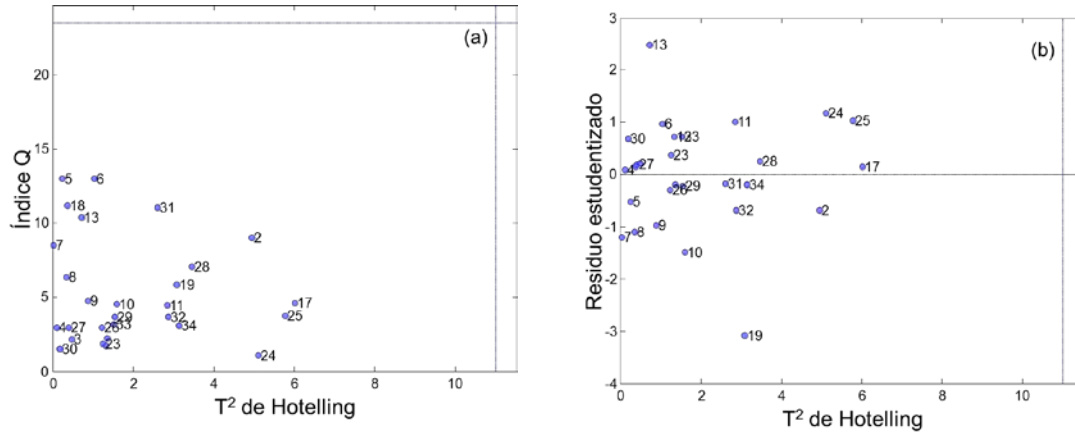
**Tabla 3** Varianzas explicadas por los distintos modelos en el análisis de ácido málico y errores cuadráticos medios en predicción (RMSECV) y en calibrado (RMSEC)

Modelo	Variabes latentes (V.L)	Varianza explicada X (%)	Varianza explicada Y (%)	RMSECV	RMSEC
Con todos los datos	1	47,93	74,79	1,63	1,80
	2	72,98	86,36	1,20	1,38
	3	76,29	91,13	0,97	1,35
	4	83,08	92,75	0,87	1,38
	5	91,20	93,97	0,80	1,34
	6	93,35	95,14	0,71	1,32
Sin el dato 19	1	49,91	80,52	1,40	1,49
	2	73,49	90,23	0,99	1,08
	3	76,66	93,34	0,82	1,19
	4	88,72	93,83	0,79	1,10
	5	90,33	95,80	0,65	1,05
	6	92,80	96,16	0,62	1,05
Sin los datos 19 y 13	1	50,61	82,63	1,45	1,34
	2	74,27	92,93	0,99	0,86
	3	81,57	94,18	1,03	0,78
	4	90,13	94,81	1,04	0,73
	5	91,47	96,22	1,19	0,63
	6	93,25	96,90	1,20	0,57



**Figura 9** Concentraciones calculadas de ácido tartárico, málico y láctico (en g / L) para los vinos A, B y C en función del tiempo transcurrido.

Considerando los índices Q y  $T^2$  de Hotelling, con un nivel de confianza del 99%, no se encuentra ningún dato anómalo que supere simultáneamente los valores umbral correspondientes (figura 10a). En cambio, cuando se tienen en cuenta los residuos estudentizados (figura 10b), el dato 19 tiene que ser eliminado ya que obtiene un residuo de -3.45, valor muy superior al umbral de  $|2.5|$ .

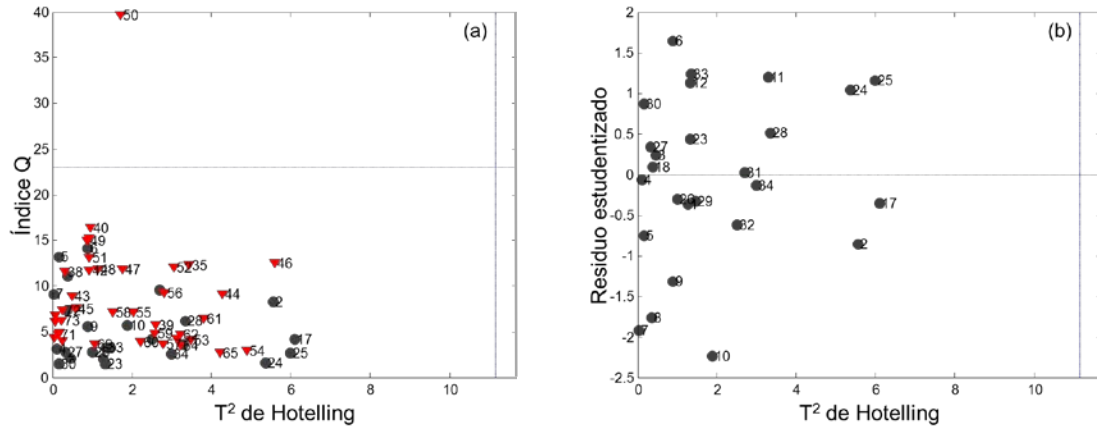


**Figura 10** (a) Índices Q y  $T^2$  de Hotelling, a un nivel de confianza del 99%, y (b) residuos estudentizados del modelo de calibrado construido con todos los datos en la determinación de ácido málico.

Tras eliminar el dato anómalo, se construye un nuevo modelo que se encuentra constituido por dos variables latentes y con el que se explica un 90.23% de la varianza de la concentración de ácido málico. No existen datos anómalos que superen los valores umbral determinados para los índices Q y  $T^2$  de Hotelling, con un nivel de confianza del 99%. Al tener en cuenta los residuos estudentizados, aparece un dato anómalo, el 13, cuyo residuo tienen un valor de 2.76, superior al umbral de  $|2.5|$ .

Después de eliminar todos los datos anómalos se obtiene el modelo final de calibrado, que consta de dos variables latentes y explica el 92.93% de la variabilidad de la respuesta. Este modelo se utiliza, como en el caso anterior, para determinar las concentraciones de ácido málico en las muestras del conjunto test, que tiene dimensión  $42 \times 20$  y está constituido por las 7 muestras del vino E, 3 de los vinos I1, I2 e I3, el vino D, 10 muestras del vino A, las 13 del vino B y 8 del vino C.

En la figura 11a se puede ver cómo ninguna de las muestras supera simultáneamente los valores umbral establecidos para los índices Q y  $T^2$  de Hotelling con un nivel de confianza del 99%. Las concentraciones calculadas para los vinos A, B y C se muestran en la figura 9.



**Figura 11** (a) Índices Q y T<sup>2</sup> de Hotelling, a un nivel de confianza del 99%, y (b) residuos estudentizados del modelo de calibrado construido sin datos anómalos en la determinación de ácido málico. En negro, muestras de calibrado; en rojo, muestras test.

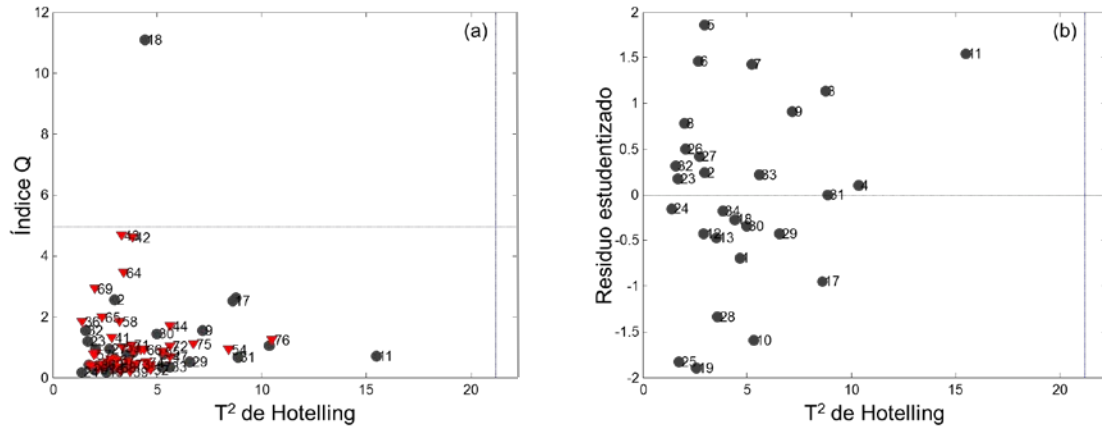
### 5.2.3. Determinación de ácido láctico

Por último, siguiendo el mismo procedimiento que en los dos casos anteriores, se desarrolla el modelo para el ácido láctico. El modelo se obtiene considerando todos los datos, de forma que el valor de RMSECV mínimo se alcanza con 5 variables latentes (tabla 4). Dicho modelo explica el 92.40% de la variabilidad de la respuesta.

**Tabla 4** Varianzas explicadas por los distintos modelos en el análisis de ácido láctico y errores cuadráticos medios en predicción (RMSECV) y en calibrado (RMSEC)

Modelo	Variabes latentes (V.L)	Varianza explicada X (%)	Varianza explicada Y (%)	RMSECV	RMSEC
Con todos los datos	1	41,38	75,54	3,46	3,21
	2	75,45	80,43	3,21	2,87
	3	89,55	85,75	3,08	2,45
	4	92,06	91,01	3,12	1,94
	5	93,71	92,40	2,99	1,79
	6	96,26	92,72	3,05	1,75

No se encuentra ningún dato anómalo que supere los valores umbral establecidos para los índices Q y T<sup>2</sup> de Hotelling, con un nivel de confianza del 99%, y del mismo modo, tampoco se observa ningún valor anómalo a la hora de considerar los residuos estudentizados (puntos negros en la figura 12). Por lo tanto, éste será el modelo final de calibrado. El conjunto test está constituido en este caso por las mismas 42 muestras que en el apartado 5.2.2. En la figura 12 puede verse como todas las muestras (en rojo, en la figura) son compatibles con el conjunto de calibración.



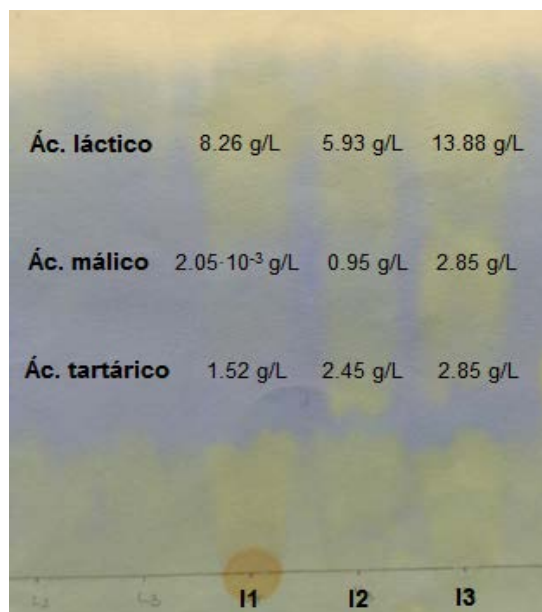
**Figura 12** (a) Índices Q y T<sup>2</sup> de Hotelling, a un nivel de confianza del 99%, y (b) residuos estudentizados del modelo construido con todos los datos en la determinación de ácido málico. En negro, muestras de calibrado; en rojo, muestras test.

Las concentraciones de ácido láctico encontradas para los vinos A, B y C se muestran en la figura 9. En ella se puede ver cómo, para el vino A, se observa que se está desarrollando la fermentación maloláctica, ya que se puede ver un descenso de la concentración de ácido málico a la vez que la concentración de ácido láctico aumenta ligeramente.

En el caso del vino B, hasta el día 30 se desarrolla la fermentación maloláctica, ya que aumenta la concentración de ácido láctico mientras que la de ácido málico parece que disminuye. Pero en los días posteriores se observa que el vino se deteriora ya que la concentración de ácido láctico disminuye rápidamente. Esto mismo se observa también en la figura 5, donde se representa la acidez total del vino en cuestión.

Por otro lado, en el vino C, se percibe cómo se está desarrollando la fermentación maloláctica hasta el día 30, fecha en la que empieza a descender la concentración de ácido láctico. Esto es debido al cambio de ubicación de las muestras de vino, con la modificación de las condiciones externas a las que se ve sometido.

En lo que se refiere a las muestras de vino I1, I2 e I3, sus desarrollos cromatográficos se muestran en la figura 13, junto con las concentraciones calculadas por los distintos modelos. En dicha figura se observa que la concentración menor de ácido málico se corresponde con el vino tinto (I1), puesto que en este tipo de vinos se desarrolla la fermentación maloláctica. En cambio, en el vino blanco (I2), se observa una concentración mayor de ácido málico ya que en este tipo de vinos no se realiza completamente dicha fermentación. El vino rosado (I3), acaba de comenzar la fermentación maloláctica, por lo que la concentración de ácido málico es elevada.



**Figura 13** Desarrollo cromatográfico de las muestras I1, I2 e I3, con las correspondientes concentraciones calculadas de cada uno de los ácidos

## 5.2.4. Validación de los métodos de análisis

### 5.2.4.1 Exactitud: precisión y veracidad

Se evalúa la exactitud en sus dos vertientes, la precisión y la veracidad. Para ello se construye la recta de veracidad que consiste en establecer un modelo de regresión lineal por mínimos cuadrados entre la concentración calculada de cada uno de los ácidos y la concentración puesta. Los parámetros de las rectas de veracidad estimadas para cada método de análisis se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5** Parámetros de las rectas de veracidad de los métodos de análisis (ordenada en el origen,  $b_0$ ; pendiente,  $b_1$ ; coeficiente de correlación,  $\rho$ ; y desviación típica residual de la regresión,  $s_{yx}$ ) y p-valores de los test de hipótesis para la pendiente y el término independiente.  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  son el límite de decisión y la capacidad de detección para  $\alpha = \beta = 0.05$ .

Analito	$b_0$	$b_1$	$\rho$	$s_{yx}$	P-valor ( $b_0$ )	P-valor ( $b_1$ )	$CC\alpha$ (g/L)	$CC\beta$ (g/L)
Ác. tartárico	0,0497	0,9838	0,9918	0,4383	0,6383	0,4908	0.44	0.85
Ác. málico	0,2033	0,9293	0,964	0,8515	0,322	0,1413	0.23	0.45
Ác. láctico	0,4559	0,924	0,9613	1,7713	0,2788	0,1146	1.09	2.12

La desviación típica residual ( $s_{yx}$ ) de la recta de veracidad se puede asimilar a la precisión del método de análisis en el rango de calibración, tabla 5. Así, la precisión sería de 0.438 g/L para el ácido tartárico, de 0.852 g/L para el ácido málico, y de 1.771 g/L para el ácido láctico. El método de análisis es más preciso para determinar ácido tartárico.

Por otro lado, la veracidad de los métodos de medida se puede estimar a partir de los parámetros de la recta de veracidad correspondiente. Si un método es veraz, la



pendiente de dicha recta debe ser uno, y el término independiente ha de ser cero. Para verificar este extremo, se realizan los test de hipótesis correspondientes.

La hipótesis nula ( $H_0$ ) para el test de la pendiente es que la pendiente es igual a uno, y la hipótesis alternativa ( $H_a$ ) es que la pendiente es distinta de uno. En el caso del test de hipótesis para la ordenada en el origen, la hipótesis nula es que la ordenada en el origen es 0, y la hipótesis alternativa es que es distinta de cero. En la tabla 5 se pueden ver los parámetros estimados, así como los valores de probabilidad ( $p$ -valores) de estos tests de hipótesis.

Para el ácido tartárico, ambos  $p$ -valores son mayores de 0.05, con lo que no se tienen evidencias suficientes para rechazar las hipótesis nulas y se debe concluir que la pendiente de la recta de veracidad es uno y la ordenada en el origen es cero, es decir, que el método de determinación del ácido tartárico es veraz a un nivel de significación del 5%. De igual manera, tanto en el caso del ácido málico como en el del ácido láctico, los  $p$ -valores de ambos tests son mayores de 0.05, por lo que también se debe concluir que los métodos de análisis son veraces.

#### **5.2.4.2 Límite de decisión y capacidad de detección**

El límite de decisión, o  $CC\alpha$ , se define como “*el valor de la concentración neta que conduce, para una probabilidad de error dado,  $\alpha$ , a la decisión de que la concentración del analito en el material analizado es mayor que la del blanco*” [15]. Es decir, que el límite de decisión indica la concentración más baja a partir de la cual se puede detectar un analito con una certeza  $1-\alpha$ .

Por otro lado, la capacidad de detección, o  $CC\beta$ , ha sido definida como “*la verdadera concentración del analito en el material analizado que conduce, con probabilidad  $1-\beta$ , a la conclusión correcta de que la concentración en el material analizado es diferente de la del blanco analítico, para una probabilidad de falso positivo dada*” [15].

Para la determinación de la capacidad de detección se debe recurrir a la recta de calibrado [15,16], pero como en este caso se han utilizado modelos de calibración multivariante, se considera la regresión lineal univariante entre la concentración calculada, que no es más que una transformación lineal de las señales experimentales, y la concentración real [17].

En la tabla 5 se muestran los valores de límite de decisión y capacidad de detección encontrados para los métodos de análisis en consideración, con probabilidad de falso positivo y de falso negativo de 0.05. Se puede ver que el método de análisis es más sensible para determinar el ácido málico, ya que corresponde con el valor de concentración más bajo (0.45 g/L) que se pueden diferenciar de un blanco a esos niveles de significación.

#### **5.2.4.3. Recuperación.**

La recuperación de los métodos de análisis se calcula a partir de las muestras de vino enriquecidas con cantidades conocidas de ácido málico y ácido láctico. Las recuperaciones medias encontradas son de un 96.72% para el ácido málico y de un 88.07% para el ácido láctico.

### **5.3. Análisis de componentes principales**

Una vez determinados los parámetros físico-químicos en las muestras de vino, se realiza un análisis de componentes principales para buscar posibles pautas que evidencien los aspectos diferenciadores de las distintas muestras de vino. Se consideran únicamente aquellas muestras en las que se han medido los seis parámetros analíticos en estudio, las concentraciones de ácido tartárico, málico y láctico, el grado alcohólico, la acidez total y el pH. El análisis se realiza con los datos autoescalados.

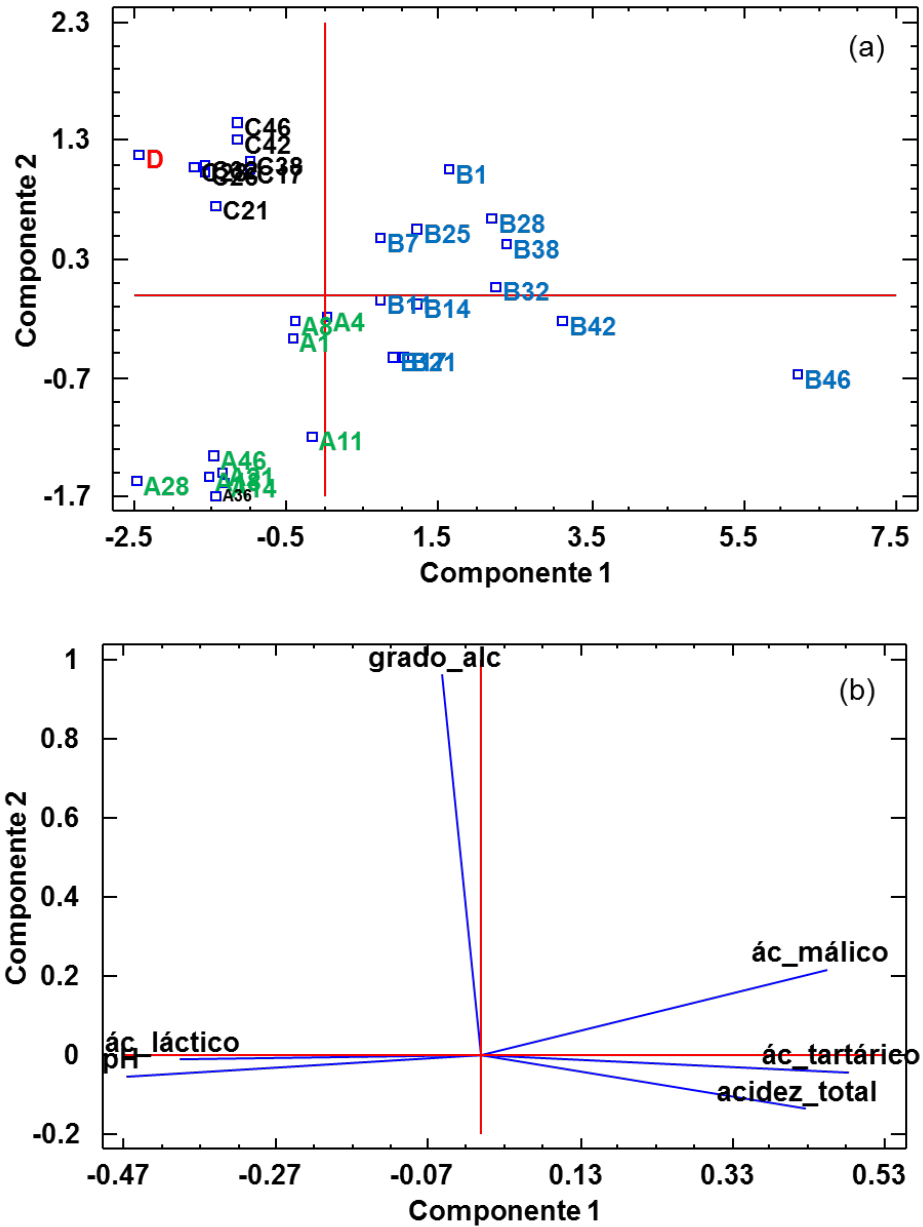
Se dispone de una matriz de datos de dimensión 31×6. Una de las 31 muestras es el vino D (vino embotellado medido inmediatamente tras su apertura), y de las restantes, 10 son muestras de vino A, 12 son muestras de vino B y 8 son del vino C, todas ellas recogidas para su análisis a lo largo de 46 días.

El modelo consta de dos componentes principales, con autovalores mayores de uno, que explican el 78.09% de la variabilidad de las predictoras (la tercera componente principal tiene un autovalor de 0.74, por lo que no se considera). La figura 14a recoge las puntuaciones de las muestras en el espacio vectorial de las dos primeras componentes principales. Se ve cómo las muestras de los distintos vinos aparecen perfectamente separadas unas de otras. Las muestras de vino B tienen valores positivos de la primera componente principal, las de vino C aparecen a valores negativos de la primera componente y positivos de la segunda (al igual que el vino D, que se parece más al vino C que al resto), mientras que las de vino A tienen puntuaciones negativas en las dos componentes.

En cuanto a la evolución de los vinos a lo largo de la fermentación maloláctica, para el vino B se ve cómo las muestras, salvo alguna excepción, tienen puntuaciones más altas en la primera componente principal a medida que avanza el tiempo. Mientras que para el vino A, se observan puntuaciones más bajas de la segunda componente con el tiempo y, por el contrario, valores más altos de esta componente para el vino C. Observando la figura 14b, se deduce que la segunda componente se relaciona directamente con el grado alcohólico, lo cual explica las puntuaciones de los vinos respecto a esta componente.

Si se consideran los pesos de las variables predictoras, figura 14b, se puede concluir que el vino B, con puntuaciones positivas en la primera componente principal, está relacionado con concentraciones más altas de ácido málico y tartárico, así como valores mayores de acidez total, parámetros que se irían incrementando a medida que avanza la fermentación.

Por el contrario, tanto el vino A como los vinos C y D, se relacionan con valores más elevados de ácido láctico y pH, así como, para los dos últimos vinos, mayor grado alcohólico (se ha comentado anteriormente que el vino C ya había completado la fermentación alcohólica, mientras que para el vino D, vino comercial, se da por hecho).



**Figura 14** (a) Puntuaciones y (b) pesos del análisis de componentes principales. Codificación de las puntuaciones: vino [vino A (azul), B (verde), C (negro) y D (rojo)] y número de días.

## 6. Conclusions

From experimental results the following conclusions can be drawn:

- The paper chromatography method developed in this work has proven to be an efficient method for monitoring tartaric, malic and lactic acids during malolactic fermentation.
- The image parameters chosen to characterize the chromatographic spots have provided useful information to build successful multivariate PLS models.
- The validation study of the developed chromatographic analytical methods shows that they are accurate and reach concentrations beyond 0.85 g/L, 0.45 g/L and 2.12 g/L for tartaric, malic and lactic acids, respectively.
- The processes that take place during malolactic fermentation are very sensitive to changes in storage conditions, especially to temperature fluctuations.
- A principal component analysis performed with total acidity, pH, alcoholic strength by volume, and concentrations of tartaric, malic and lactic acids of several wines makes it possible to differentiate the analyzed wines and characterize their evolution during malolactic fermentation.

## 7. Acknowledgements

This work was supported by the Erasmus+ of the European Union programme (Project No. 2016-1-ES01-KA201-024948).

## 8. Bibliografía

- [1] Segarra, O. *La cultura del vino*. Barcelona: Amat, 2012.
- [2] Mesas, J.M., y Alegre, M.T. «El papel de los microorganismos en la elaboración del vino.» *Ciencia y Tecnología Alimentaria* 2, 4 (1999): 174-183.
- [3] Hidalgo Togores, J. *Tratado de enología*. Madrid: Mundi-Prensa, 2011.
- [4] Carbonell Bejerano, P., y Martínez Zapater, J.M. «Estructura y composición de la uva y su contribución al vino.» *SEBBM* (Rubes), 176 (Junio 2013): 5-8.
- [5] Reglamento (CEE) nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino.
- [6] Delanoe, D., Maillard, C., y Maisondieu, D. *El vino: del análisis a la elaboración*. Buenos Aires: Hemisferio Sur, 1988.
- [7] Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H., y Nury, F.S.. *Análisis y producción de vino*. Zaragoza: Acribia, 2001.

- [8] Valcárcel Cases, M., y Gómez Hens, A.. *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona: Reverté, 2003.
- [9] Massart, D.L., Vandeginste, B.G.M., Buydens, L.M.C., Jong, S., y de Smeyers-Verbeke, P.J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. Parte A. Data Handling in Science and Technology*. Amsterdam: Elsevier, 1997.
- [10] Martens, H., y Naes, T. *Multivariate calibration*. Nueva York: John Wiley & Sons, 1989
- [11] García, J., y Xirau, M. *Técnicas usuales de análisis en enología*. Barcelona: Panreac, 2005.
- [12] STATGRAPHICS Centurion XVI (version 16.1.11), StatPoint Technologies, Inc. Herndon, VA, 2010.
- [13] Wise, B.M., Gallagher, N.B., Bro, R., y Shaver, J.M., PLS Toolbox 7.9.5.19417, Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA, 2015.
- [14] MATLAB version 8.4.0.150421 (R2014b), The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA, 2014.
- [15] ISO-11843-1, Capability of detection. Part 1: terms and definitions, Ginebra, 1997
- [16] ISO-11843-2, Capability of detection. Part 2: Methodology in the linear calibration case, Ginebra, 2000
- [17] Ortiz, M.C., Sarabia, L.A., Herrero, A., Sánchez, M.S., Sanz, M.B., Rueda, M.E., Giménez, D., y Meléndez, M.E., «Capability of detection of an analytical method evaluating false positive and false negative (ISO 11843) with Partial Least Squares». *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 69 (2003): 21-33..