



# UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

## TESIS DOCTORAL

Título
<b>Estudio químico-sensorial de la composición no volátil de los vinos. Influencia de técnicas de aclareo en el perfil fenólico y organoléptico de los vinos</b>
Autor/es
<b>Ana Gonzalo Diago</b>
Director/es
Purificación Fernández Zurbano y Marta María Inés Dizy Soto
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Química
Curso Académico
2013-2014



**Estudio químico-sensorial de la composición no volátil de los vinos. Influencia de técnicas de aclareo en el perfil fenólico y organoléptico de los vinos**, tesis doctoral

de Ana Gonzalo Diago, dirigida por Purificación Fernández Zurbano y Marta María Inés Dizo Soto (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

- © El autor
- © Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2014  
publicaciones.unirioja.es  
E-mail: publicaciones@unirioja.es



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
UNIVERSIDAD DE LA RIOJA  
ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**Estudio químico-sensorial de la composición no volátil de los vinos. Influencia de técnicas de aclareo en el perfil fenólico y organoléptico de los vinos.**

**Memoria presentada por  
ANA GONZALO DIAGO  
para optar al grado de Doctor con Mención de Doctor Internacional**

**Mayo 2014**

**Dirigida por los profesores  
Dra. Purificación FERNÁNDEZ ZURBANO  
Dra. Marta DIZY SOTO**

---



---

**INFORME DIRECTORES**  
**PRESENTACIÓN TESIS DOCTORAL**

Dña. Purificación FERNÁNDEZ ZURBANO, Profesora Titular del Departamento de Química, Área Química Analítica, de la Universidad de La Rioja y Dña. Marta DIZY SOTO, Profesora Titular del Departamento de Agricultura y Alimentación, de la Universidad de La Rioja

CERTIFICAN

Que la presente memoria, titulada “**Estudio químico-sensorial de la composición no volátil de los vinos. Influencia de técnicas de aclareo en el perfil fenólico y organoléptico de los vinos**” presentada por Dña. Ana GONZALO DIAGO para optar al grado de Doctor con mención de “Doctor Internacional” por la Universidad de La Rioja, ha sido realizada bajo nuestra dirección autorizando su presentación para proseguir los trámites oportunos y proceder a su calificación por el tribunal correspondiente.

Logroño, Mayo 2014

Fdo: Purificación Fernández Zurbano

Fdo: Marta Dizy Soto

---



---

**Deseo hacer constar mi agradecimiento:**

- A la Universidad de La Rioja por la beca de Formación de Personal Investigador concedida.
  - Al FEDER-MEC por la concesión del proyecto AGL2005-02313/ALI.
  - Al MYCIT/FEDER, por la concesión del proyecto AGL2010-22355-C02-02.
  - A la Agencia de Desarrollo Económico de La Rioja (ADER) por el proyecto 2010-I-ID-00281 concedido.
  - A Bodegas D. Mateos S.L. de Aldeanueva de Ebro (La Rioja) por ofrecernos sus viñedos para experimentación.
  - A la Empresa BASF Española, S.A. por suministrarnos el regulador de crecimiento Regalis®.
-







***A mis padres***





---

# Agradecimientos

*Llegado este momento y dado que la lectura de los agradecimientos siempre parece que suscita un interés especial voy a intentar aunar esfuerzos para recordar todo lo vivido y compartido a lo largo de estos años. Y es que, a pesar de pertenecer al mundo de la ciencia y de la tecnología, la vida está llena de vivencias y emociones y supongo que, será por ello, por lo que en los últimos meses me han animado diciendo “Venga Ana, que ya se ve la luz al final del túnel”, y es que esta tesis como una parte importante de mi vida ha estado llena de luces y sombras.*

*Entre las sombras, la incertidumbre ante un nuevo experimento, ensayos que no salen a la primera a pesar de que sus autores en los artículos de referencia no señalan ningún contratiempo, equipos que se rompen en el momento en el que necesitas utilizarlos y un sin fin más de cosas, que a día de hoy, una vez completado el trabajo se empiezan a ver desde otra perspectiva.*

*Las luces por el contrario sois todos vosotros, los que de una forma u otra habéis compartido conmigo esta experiencia.*

*Gracias a mis directoras de tesis, Puri y Marta, por haber confiado en mí desde el principio, por guiarme y adentrarme en el mundo de la investigación, por compartir conmigo vuestro bagaje científico y personal. El aprendizaje obtenido seguro que en el futuro forma implícitamente parte de mi personalidad.*

*Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, a los que estaban incluso antes de que yo llegara. David, es difícil agradecerte en palabras todo el apoyo que he recibido de tu parte a lo largo de estos años. Gracias por hacerme fácil lo difícil, gracias por tu tiempo, por enseñarme en los inicios, por tu paciencia y por tu amistad. Álvaro, gracias por hacer más distendidas las horas de trabajo en el laboratorio y en el despacho, que sepas que me he convertido en toda una experta resolviendo jeroglíficos. Pilar, gracias por tu disponibilidad, por ser flash resolviendo dudas y contestando mails, no sabes lo que eso se valora. Lauri, gracias por ser una amiga, por contagiar buen rollo, encontrarse con un carácter como el tuyo en el laboratorio hace más*

---

---

*llevadero cualquier trabajo a realizar. Gracias por tu apoyo y tu escucha desde el principio de los principios. Chini, no sabía bien donde ubicarte, porque eres de los de antes, de los de ahora y de los de siempre, así que nunca mejor dicho, gracias por estar siempre ahí con una sonrisa.*

*Gracias a todos los compañeros que estaban de paso pero que han dejado una huella imborrable a su marcha. Gracias a Celia, fue corto pero intenso, es difícil compenetrarse también en tan poco tiempo, solo es posible con un carácter tan cercano como el tuyo. Gracias por tu energía positiva, por tu alegría, por tu saber escuchar y comprender y por tener ese gran corazón. Tao, yīqiān xie xie, por qué? Pues por todo, porque aún no me explico como fuimos capaces de entendernos a la perfección hablando en distinto idioma. Gracias por contagiarme de alegría, por transmitirme parte de tu filosofía de vida oriental, que sepas que me ha servido de mucha ayuda a lo largo de estos años. Gracias por enseñarme tu cultura y por estar siempre a mi lado a pesar de la distancia. En definitiva, gracias por ser tan buen amigo. A Elisa, gracias por tu amistad, dulzura y generosidad, espérame en Cerdeña que en una de estas me dejo caer por allí. Ruti, gracias por las risas y confianzas que hemos compartido tanto en la uni como fuera, tu forma de ser resume lo buena gente que eres. Crespi, gracias por abrirme los ojos, por fin sé “quién es mi papi” 😊. Gracias por tu buen rollo, por saber aunar fiesta de noche y minuciosidad en el labo durante el día, eres todo un crack!*

*Y finalmente, y no por ello menos importante, gracias a los compañeros que me han acompañado hasta el final. Cascan, nos unió la enología y al final el vino y la química han seguido en nuestras vidas. Gracias por tus consejos, tus ánimos, por ofrecerme tu ayuda siempre que lo he necesitado y por ser un amigo. Marivel, vales un montón y por eso creo que he aprendido tanto contigo, como diría José Miguel, incluso hasta hablo un poco de guacamayo. Muchas gracias por tener siempre un ratito para mi y por los ratos de cháchara que hemos pasado, como a ninguna de las dos nos gusta hablar...A Pilar y Cristina, compañeras de labo y de despacho, porque tanto los buenos momentos como los días en que parece que se tuerce todo, cuando se comparten son más llevaderos y vosotras habéis estado ahí. Gracias por vuestro apoyo.*

---

---

*Gracias a Natalia, Tamara, Jesús Ángel y Javi por vuestra ayuda en la realización de una de las partes experimentales de este trabajo. Gracias por vuestra predisposición, ganas de trabajar y hacer las cosas bien.*

*A Rodrigo, Judith, Nieves, Jose, Maite, Jesús y Miguel por vuestros consejos, por preocuparos por mi y por los buenos ratos pasados en la cafetería y en cenas y comidas navideñas...*

*A Federico Echávarri, por ayudarme a trabajar los datos de color y a todos los profesores de química y de enología que me han dado la formación que hoy en día dispongo y a la que he recurrido en muchos momentos a lo largo de esta tesis.*

*A Nines, Ernesto y Pedro Felipe, porque como profesionales sois muy buenos, de eso no hay duda, pero como personas sois excepcionales. Gracias porque me habéis aportado mucho y muy bueno.*

*A mis compañeros de otras áreas, por los ratitos de palique en el pasillo, que han hecho más ameno las idas y venidas del laboratorio al despacho, del despacho a la sala de catas, o del laboratorio a la bodega. Y en especial a Lara y Javi, nos unió la química y desde entonces algún tipo de enlace se creó entre nosotros. Gracias por vuestro apoyo desde la distancia.*

*A todos los panelistas que han participado en las sesiones de cata haciendo posible que una parte importante de este trabajo haya sido realizada. Gracias por vuestra disponibilidad y tiempo.*

*A los compañeros del PAS, gracias por facilitarme el trabajo día a día.*

*Al personal de limpieza y en especial a Ana. Gracias por darme los buenos días siempre con una sonrisa.*

*A mis actuales compañeros del CIDA, por preocuparos por el estado de la tesis, por vivir conmigo los últimos meses previos al depósito y solventarme las dudas trascendentales de última hora.*

---

---

*A mis compañeros de enología, porque el comienzo de esta carrera implicó el inicio de esta tesis. Gracias a Sandra y a Vesna, por seguirme la pista, por animarme y preocuparos por mí.*

*Gracias a mis amigos/as, por vuestros ánimos y comprensión, porque casi para que me pongáis cara os tendría que haber dejado una foto. Raech mil gracias además por tu ayuda en la maquetación y tratamiento de imágenes.*

*A toda mi familia, y en especial a mi hermano Carlos y a Bego, porque es verdad que esta tesis parecía la obra del Pilar, pero finalmente llegó a su fin. Mari Paz, gracias por tu ayuda incondicional a lo largo de todo este tiempo.*

*A mis padres, Conchi y Jose, por vuestra santa paciencia, porque no os habéis apenas quejado aunque durante mucho tiempo la habitación ha estado repleta de libros, artículos, papeles y más papeles. Gracias por animarme siempre, por brindarme todo vuestro apoyo y por quererme como me queréis. Os debo todo lo que soy.*

*A Rodrigo, ya se sabe que siempre al que está más cerca le toca aguantar más el chaparrón, así que gracias por comprenderme, por tener esa capacidad tan grande de escucha, por el tiempo que te he robado y por quererme tal y como soy.*

*Y a todos los demás que no he nombrado y que me habéis acompañado y animado a lo largo de estos años.*

***Muchas gracias a todos!!!***

***Ana Gonzalo Diago***

---

---

# Índice

<b>PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS GENERALES.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>9</b>
<b>1. COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA .....</b>	<b>12</b>
1.1. FENOLES NO FLAVONOIDES .....	13
1.2. FENOLES FLAVONOIDES .....	14
<b>2. FACTORES DETERMINANTES DE LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE LAS UVAS .....</b>	<b>18</b>
<b>3. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS .....</b>	<b>22</b>
3.1. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN LA SALUD .....	22
3.2. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS EN EL VINO .....	22
<b>4. SENSACIONES GUSTATIVAS Y TÁCTILES EN VINOS. COMPUESTOS IMPLICADOS.....</b>	<b>24</b>
4.1. DULZOR .....	24
4.2. ACIDEZ.....	25
4.3. AMARGOR .....	26
4.4. ASTRINGENCIA.....	28
4.5. PERSISTENCIA .....	32
<b>5. INTERACCIONES SENSORIALES.....</b>	<b>33</b>
5.1. “EFECTO <i>DUMPING</i> ” O RESTRICCIÓN DE LA RESPUESTA .....	35
<b>6. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES EN VINO .....</b>	<b>37</b>
6.1. MÉTODOS GENERALES .....	37
6.2. MÉTODOS INSTRUMENTALES.....	38
6.2.1. <i>Separación de compuestos polifenólicos</i> .....	38
6.2.2. <i>Análisis de polifenoles de bajo peso molecular</i> .....	39
6.2.3. <i>Análisis y detección de proantocianidinas</i> .....	39
<b>7. REFERENCIAS.....</b>	<b>43</b>

---

---

<b>CAPÍTULO 1. CARACTERIZACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN VINO MEDIANTE MALDI-TOF MS. ....</b>	<b>63</b>
<b>1.1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>65</b>
<b>1.2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>68</b>
1.2.1. REACTIVOS.....	68
1.2.2. MUESTRAS .....	68
1.2.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	69
1.2.3.1. <i>Fraccionamiento de los vinos</i> .....	69
1.2.4. ANÁLISIS DE PARÁMETROS ENOLÓGICOS EN VINOS.....	70
1.2.4.1. <i>Azúcares reductores, pH, acidez total y grado alcohólico</i> .....	70
1.2.4.2. <i>Color</i> .....	71
1.2.5. ANÁLISIS DE PROANTOCIANIDINAS EN LA FRACCIÓN A ESTUDIO.....	71
1.2.5.1. <i>Análisis cualitativo de proantocianidinas con MALDI-TOF MS</i> .....	71
1.2.5.2. <i>Análisis cuantitativo de proantocianidinas</i> .....	72
1.2.5.2.1. <i>Tiólisis-UPLC-MS</i> .....	72
1.2.5.2.2. <i>Cuantificación de las proantocianidinas totales</i> .....	74
1.2.6. ANÁLISIS SENSORIAL.....	75
1.2.6.1. <i>Panel sensorial</i> .....	75
1.2.6.2. <i>Entrenamiento del panel</i> .....	75
1.2.6.3. <i>Evaluación de los vinos</i> .....	76
1.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	76
<b>1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
1.3.1. CARACTERIZACIÓN ENOLÓGICA DE LOS VINOS .....	77
1.3.2. ANÁLISIS DE PROANTOCIANIDINAS MEDIANTE MALDI-TOF MS .....	78
1.3.2.1. <i>Optimización y consideraciones del método</i> .....	78
1.3.2.2. <i>Determinación estructural de las proantocianidinas</i> .....	79
1.3.3. TIÓLISIS .....	83
1.3.4. RELACIÓN ENTRE MALDI, TIÓLISIS Y PROANTOCIANIDINAS TOTALES .....	85
1.3.5. RELACIÓN ENTRE EL GRADO MEDIO DE POLIMERIZACIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS Y LA AÑADA.....	88
1.3.6. RELACIÓN ENTRE EL GRADO MEDIO DE POLIMERIZACIÓN DE LAS PROANTOCIANIDINAS Y LA VARIEDAD .....	90
1.3.7. ANÁLISIS SENSORIAL EN BOCA DE LOS VINOS.....	91
1.3.8. CORRELACIÓN QUÍMICA Y SENSORIAL.....	92
<b>1.4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>96</b>
<b>1.5. REFERENCIAS .....</b>	<b>97</b>

---



---

## **CAPÍTULO 2. ESTUDIO DEL SABOR Y DE LAS SENSACIONES EN BOCA DE LAS PROANTOCIANIDINAS PRESENTES EN VINOS TINTOS Y SU RELACIÓN CON LA COMPOSICIÓN QUÍMICA.....105**

<b>2.1. ANTECEDENTES .....</b>	<b>107</b>
<b>2.2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>109</b>
2.2.1. REACTIVOS.....	109
2.2.2. MUESTRAS .....	109
2.2.3. PREPARACIÓN DE MUESTRA.....	109
2.2.3.1. <i>Eliminación de los compuestos volátiles de los vinos</i> .....	109
2.2.3.2. <i>Fraccionamiento. Aislamiento de las proantocianidinas</i> .....	110
2.2.4. ANÁLISIS QUÍMICOS .....	111
2.2.4.1. <i>Determinación de parámetros enológicos convencionales</i> .....	111
2.2.4.2. <i>Análisis de proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs)</i> .....	111
2.2.4.3. <i>Análisis de la fracción proantociánica mediante MALDI-TOF MS</i> .....	111
2.2.4.4. <i>Análisis de la fracción proantociánica mediante tiólisis-UPLC UV/Vis-MS</i> .....	112
2.2.4.5. <i>Análisis de las proantocianidinas totales (TPAs)</i> .....	112
2.2.5. ANÁLISIS SENSORIAL .....	112
2.2.5.1. <i>Selección del panel sensorial</i> .....	112
2.2.5.2. <i>Entrenamiento del panel</i> .....	113
2.2.5.3. <i>Evaluación de las muestras</i> .....	114
2.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	114
<b>2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>115</b>
2.3.1. VINOS .....	115
2.3.2. CARACTERIZACIÓN SENSORIAL DE LOS VINOS .....	117
2.3.3. CARACTERIZACIÓN SENSORIAL DE LA FRACCIÓN PROANTOCIÁNICA (PASF)....	118
2.3.4. RELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS VINOS Y LAS FRACCIONES PROANTOCIÁNICAS OBTENIDAS .....	123
2.3.5. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LA FRACCIÓN PROANTOCIÁNICA (PASF) .....	124
2.3.5.1. <i>Análisis cualitativo mediante MALDI-TOF MS</i> .....	124
2.3.5.2. <i>Tiólisis-UPLC-UV/VIS-MS</i> .....	126
2.3.5.3. <i>Contenido total de proantocianidinas (TPAs)</i> .....	128
2.3.5.4. <i>Proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs)</i> .....	128
2.3.6. CORRELACIONES ENTRE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA Y SENSORIAL DE LA FRACCIÓN PROANTOCIÁNICA .....	129
<b>2.4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>132</b>
<b>2.5. REFERENCIAS .....</b>	<b>133</b>

---

---

**CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS COMPUESTOS DE BAJO PESO MOLECULAR EN EL AMARGOR DE LOS VINOS TINTOS. PREDICCIÓN E INTERACCIONES AMARGOR-ASTRINGENCIA.....139**

<b>3.1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>141</b>
<b>3.2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>145</b>
3.2.1. DISOLVENTES Y ESTÁNDARES .....	145
3.2.2. MUESTRAS .....	145
3.2.3. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	146
3.2.3.1. <i>Eliminación de los compuestos volátiles de los vinos</i> .....	146
3.2.3.2. <i>Fraccionamiento: obtención de la fracción de compuestos de bajo peso molecular</i> .....	146
3.2.3.3. <i>Eliminación de ácidos de la fracción de bajo peso molecular</i> .....	146
3.2.4. ANÁLISIS QUÍMICOS.....	147
3.2.4.1. <i>Análisis de ácidos orgánicos</i> .....	147
3.2.4.2. <i>Análisis de compuestos fenólicos</i> .....	148
3.2.4.3. <i>Análisis de parámetros enológicos convencionales</i> .....	149
3.2.5. ANÁLISIS SENSORIAL .....	149
3.2.5.1. <i>Evaluación de las muestras</i> .....	149
3.2.5.2. <i>Estudio sensorial piloto</i> .....	149
3.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	150
<b>3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>151</b>
3.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS VINOS .....	151
3.3.2. CARACTERIZACIÓN SENSORIAL DE LA FRACCIÓN DE BAJO PESO MOLECULAR (LMW-F).....	152
3.3.3. ELIMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS.....	155
3.3.3.1. <i>Estudio sensorial piloto</i> .....	155
3.3.3.2. <i>Eliminación de los ácidos presentes en la fracción</i> .....	156
3.3.4. EVALUACIÓN SENSORIAL DE LAS FRACCIONES SIN ÁCIDOS (F <sub>W/OA</sub> ).....	158
3.3.5. RELACIÓN ENTRE LAS PROPIEDADES SENSORIALES EN BOCA Y LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA F <sub>W/OA</sub> .....	162
3.3.5.1. <i>Amargor</i> .....	162
3.3.5.2. <i>Astringencia</i> .....	168
3.3.5.3. <i>Persistencia</i> .....	169
<b>3.4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>170</b>
<b>3.5. REFERENCIAS.....</b>	<b>171</b>

---

---

## **CAPÍTULO 4. INFLUENCIA DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS DE BAJO Y ALTO PESO MOLECULAR EN LAS PERCEPCIONES GUSTATIVAS DE LOS VINOS.....177**

<b>4.1. ANTECEDENTES.....</b>	<b>179</b>
<b>4.2. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>182</b>
4.2.1. REACTIVOS .....	182
4.2.2. VINOS .....	182
4.2.3. PARÁMETROS ENOLÓGICOS CONVENCIONALES DE LOS VINOS .....	183
4.2.4. DECONSTRUCCIÓN Y RECONSTRUCCIÓN DE LOS VINOS .....	183
4.2.4.1. <i>Preparación de las fracciones no-volátiles</i> .....	183
4.2.4.2. <i>Preparación de la fracción volátil</i> .....	184
4.2.4.3. <i>Muestras reconstituidas</i> .....	184
4.2.5. ANÁLISIS SENSORIAL .....	185
4.2.5.1. <i>Panelistas</i> .....	185
4.2.5.2. <i>Entrenamiento sensorial</i> .....	186
4.2.5.3. <i>Evaluación de las muestras</i> .....	187
4.2.6. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS FRACCIONES DE BAJO PESO MOLECULAR.	187
4.2.7. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE LAS FRACCIONES DE ALTO PESO MOLECULAR	188
4.2.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	188
<b>4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>190</b>
4.3.1. VINOS .....	190
4.3.2. VINOS REFERENCIA Y VINOS RECONSTITUIDOS.....	191
4.3.3. IMPLICACIÓN DE LAS FRACCIONES DE BAJO PESO MOLECULAR EN LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS VINOS. ....	194
4.3.3.1. <i>Propiedades sensoriales en boca de las muestras reconstituidas</i> .....	194
4.3.3.2. <i>Relación entre el contenido de compuestos no-volátiles de bajo peso molecular y los cambios sensoriales percibidos en boca</i> .....	198
4.3.4. IMPLICACIÓN DE LAS FRACCIONES DE ALTO PESO MOLECULAR EN LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DE LOS VINOS. ....	206
<b>4.4. CONCLUSIONES.....</b>	<b>213</b>
<b>4.5. REFERENCIAS.....</b>	<b>214</b>

---

---

**CAPÍTULO 5. EFECTO DEL ACLAREO MANUAL Y DE LA APLICACIÓN DE LA PROHEXADIONA DE CALCIO EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE UVAS Y VINOS. INFLUENCIA EN LAS PROPIEDADES SENSORIALES DE LOS VINOS.....219**

**5.1. ANTECEDENTES..... 221**

**5.2. MATERIAL Y MÉTODOS ..... 224**

5.2.1. VIÑEDOS ..... 224

5.2.2. TRATAMIENTO EN CAMPO ..... 224

5.2.3. PROCESO DE VINIFICACIÓN ..... 225

5.2.4. ANÁLISIS QUÍMICOS..... 226

5.2.4.2. *Análisis de las uvas*..... 226

5.2.4.3. *Análisis de los vinos*..... 228

5.2.5. ANÁLISIS SENSORIAL DE LOS VINOS..... 231

5.2.5.1. *Test Dúo-Trío*..... 232

5.2.5.2. *Entrenamiento sensorial*..... 232

5.2.5.3. *Evaluación de las muestras* ..... 234

5.2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO..... 234

**5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 236**

5.3.1. CONDICIONES CLIMÁTICAS..... 236

5.3.2. PESO Y TAMAÑO DE BAYAS. RENDIMIENTO ..... 236

5.3.3. MADUREZ TECNOLÓGICA ..... 239

5.3.4. MADUREZ FENÓLICA ..... 241

5.3.5. PARÁMETROS CROMÁTICOS ..... 243

5.3.6. EVOLUCIÓN DE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA..... 244

5.3.7. PARÁMETROS ENOLÓGICOS DE LOS VINOS..... 246

5.3.8. COLOR Y COMPOSICIÓN ANTOCIÁNICA DE LOS VINOS..... 249

5.3.9. COMPOSICIÓN FENÓLICA DE LOS VINOS..... 253

5.3.10. ANÁLISIS SENSORIAL ..... 257

**5.4. CONCLUSIONES..... 263**

**5.5. REFERENCIAS ..... 264**

**CONCLUSIONES GLOBALES.....273**

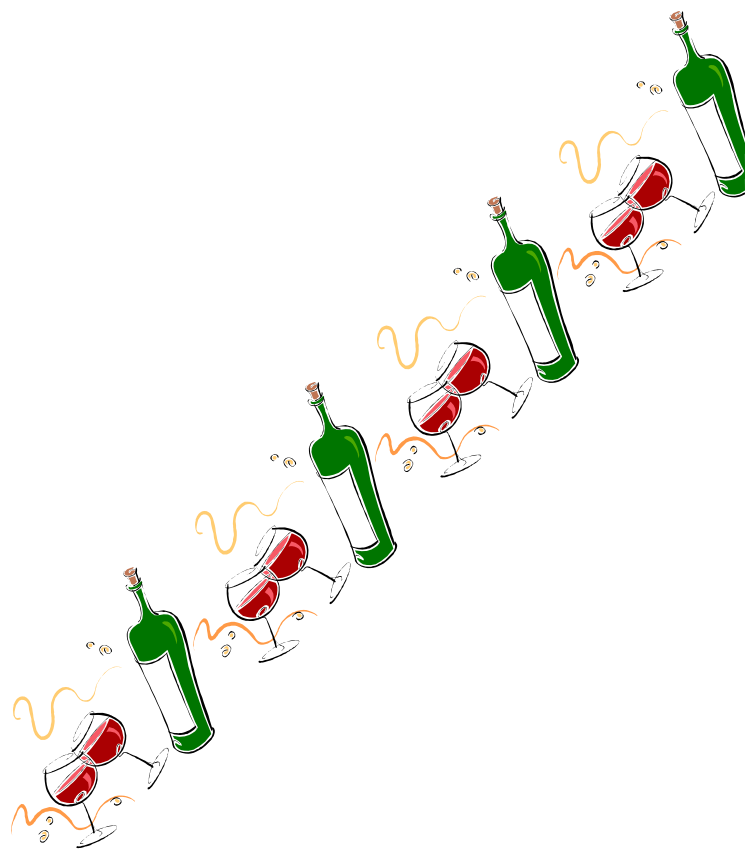
**ANEXOS.....279**

**DIVULGACIÓN CIENTÍFICA.....291**

---



# **PRESENTACIÓN Y OBJETIVOS GENERALES**





# Presentation

Spain is one of the greatest producers of wine in the world and although winemakers and wine experts are continuously tasting and making sensory descriptions of wines, rarely, there is a parallel work of analysing the quantitative chemical composition of each one of them with the purpose of finding the compounds most likely responsible for eliciting each taste or oral sensation.

The present PhD thesis has been developed within the research area of: *Enological Sensory and Chemical Science* at the University of La Rioja, which is aimed at gaining an accurate knowledge about the chemical components that are sensory active in wine, with the final purpose of providing, with rational criteria, useful tools for its control, improvement and future adequacy to the demanding wine market.

Among the many aspects to be studied, this work has been particularly focused on the study of wine phenolic compounds from two different points of view, one the study of the in-mouth sensory properties of red wines and their correlation to their chemical composition, and two the study of the effect of a plant growth regulator on grapes and wines phenolic composition and also on wines organoleptic characteristics.

At the beginning of this PhD dissertation it was known that the wine phenolic compounds are important quality parameters of wines since they contribute to their organoleptic profile, particularly color, astringency and bitterness. However, the relationship between the sensory evaluation and the nonvolatile composition of wines, especially of red wines, is a critical subject in current oenological research. This thesis provides new knowledge concerning the sensory active compounds most responsible for eliciting bitterness and astringency. In this context, the effect that may have the low molecular weight phenols on the in-mouth perception of the high molecular weight phenols and *vice versa* have been studied. The other aim of this PhD thesis was to prove the effect of an experimental plant growth regulator, Prohexadiona of calcium, applied to vineyards for yield control. So far, this product had been used on fruit trees but very few studies had focused on its application on the vineyards, being unknown the influence of this compound in the phenolic composition of Tempranillo and Grenache grapes and wines, and therefore their impact on wine organoleptic properties. Moreover, a comparative study has been carried out highlighting the effect of this product and the

effect of manual cluster thinning, technique widely used in viticulture for regulating vine yield production.

For better understanding, the present dissertation is structured into five different sections as follows:

- **Presentation and Aims.** A brief presentation justifying the topic studied and the general and specific goals proposed during this scientific work are presented.
- **General Introduction.** This section takes into account a brief presentation of the different family of phenolic compounds, highlighting the important role of these compounds in the organoleptic properties of wines, including a thorough description of the different molecules most responsible for eliciting each taste. Besides of this, the different viticulture practices followed in the vineyards to improve the presence of phenolic compounds together with the methods applied to analyse these compounds are also described.
- **Chapters.** The main text of the dissertation is divided into subtopics and organized in five chapters in which are detailed and discussed the work carried out during these years. Each chapter includes an introduction, the methodology used, the results found with the subsequent discussion and conclusions.

In **Chapter 1**, young and aged red wines proanthocyanidins were characterized by means of MALDI-TOF MS and thiolysis. To achieve this goal, wines were fractionated with the purpose of obtaining separately the proanthocyanidin material from the low molecular weight compounds. In this chapter, the qualitative and quantitative content of condensed tannins bringing together the sensory analysis of the wines was studied.

In **Chapters 2 and 3**, young wines and their fractions, containing proanthocyanidins and low molecular weight compounds, were sensory described. Correlations between the sensory data (taste and oral sensations) and the chemical composition were performed, being able to identify the main compounds responsible for eliciting sourness, astringency and bitterness in these wine fractions. Different taste interactions were also pointed out. Once these two wine fractions had been sensory and separately evaluated, in **Chapter 4**, a wine deconstruct and reconstruct methodology was developed in order to obtain reconstituted wine samples, bringing together both



fractions, showing these reconstituted wines sensory properties similar to the reference wines. To achieve such goal, the fractionation was applied to a set of red wines exhibiting marked differences in taste and/or astringency. Furthermore, in **Chapter 5** is tackled the effect of two different types of cluster thinning, manual and chemical, on the phenolic composition of grapes and wines, respectively, in comparison with control vines.

- **Global conclusions.** The most relevant conclusions drawn out of each chapter are presented.

- **Appendix.** Additional tables and figures are shown in this section to extent and facilitate the final comprehension.



## Objetivos

Por las razones expuestas en la presentación de esta memoria se aborda el presente trabajo, cuyos principales objetivos son:

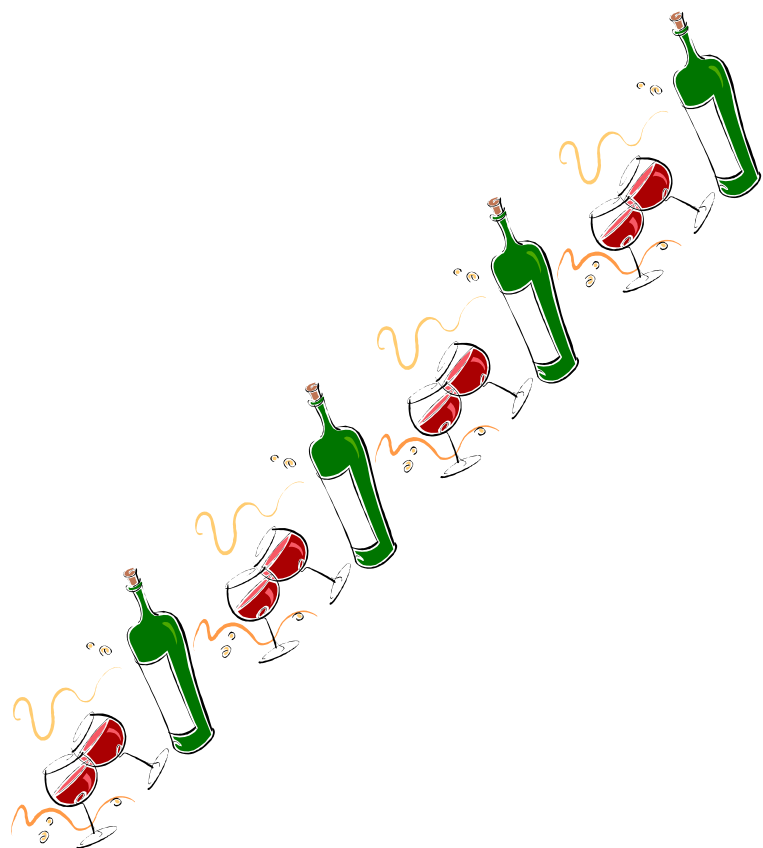
- Evaluar la técnica de MALDI-TOF MS para la determinación del grado medio de polimerización de procianidinas de vinos tintos.
- Evaluar las propiedades organolépticas en boca de fracciones no-volátiles obtenidas de vinos tintos y obtener relaciones con las características sensoriales de los vinos.
- Estudiar la implicación de los compuestos no-volátiles, en especial de los compuestos polifenólicos, en las características sensoriales de las fracciones y vinos.
- Evaluar la implicación de las fracciones de bajo y alto peso molecular en el perfil organoléptico de los vinos mediante:
  1. La obtención de vinos reconstituidos similares a vinos reales cuyas únicas diferencias procedan de la fracción no volátil.
  2. La correlación con la composición química no volátil, en especial la composición polifenólica.
  3. La exploración de interacciones sabor-sabor y sabor-astringencia.
- Determinar la influencia del aclareo manual de racimos y de la aplicación de prohexadiona de calcio en el perfil polifenólico de uvas y vinos y en las propiedades organolépticas de los mismos.





# **INTRODUCCIÓN GENERAL**

# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**





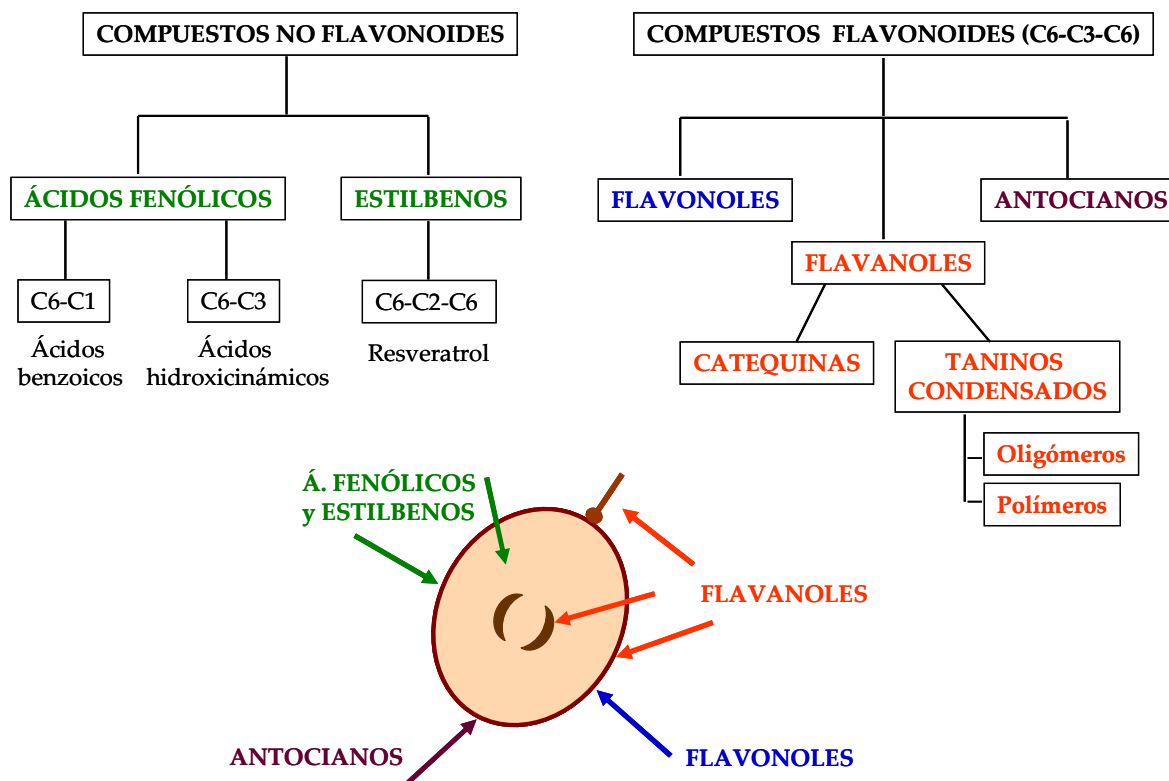
El vino es un producto agroalimentario que desde hace miles de años ha tenido un papel relevante en la cultura mediterránea, formando parte junto con el trigo y el aceite de la llamada “triada alimentaria”. Desde entonces y hasta nuestros días, el vino se ha ido transformando en una bebida que engloba historia, cultura y alimento, siendo un producto inmerso en la economía de muchos países. Por ello, la evolución de los gustos de los consumidores se analiza periódicamente con el fin de entender y conocer a qué se refiere el consumidor cuando denota un vino como un vino de calidad.<sup>1-6</sup>

Citas como “La calidad en un vino es mejor comprobarla que definirla” (Pisani) ò “La calidad de un vino es mejor comprobarla que demostrarla” (Poupon) hacen reflexionar acerca de la importancia de la calidad atribuida al vino, considerado hoy en día como un producto hedónico, y del reto y la dificultad que supone para un enólogo la elaboración de un vino que cumpla las expectativas del consumidor.

El valor dado por los consumidores a un vino depende tanto de factores extrínsecos como de intrínsecos. Los **extrínsecos** engloban múltiples y variados aspectos relacionados con el vino, pero no atribuidos a su degustación, como son la marca o el precio<sup>7</sup>, la etiqueta<sup>8</sup>, el origen del vino<sup>9</sup>, la variedad<sup>10</sup>, la añada<sup>11</sup>, la forma de la botella o color de la misma<sup>9,12</sup>; mientras que los **intrínsecos** incluyen valoraciones realizadas durante su degustación. Estas valoraciones se centran principalmente en la ausencia de defectos organolépticos, en el equilibrio en boca o armonía entre sus componentes y en el color.<sup>13-15</sup> Estos tres últimos parámetros de calidad dependen en su totalidad de la composición química del vino y en particular, los dos últimos parámetros, de la composición polifenólica, compuestos sobre los que se centra el estudio realizado a lo largo de esta tesis doctoral.

## 1. COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA

Los compuestos polifenólicos son considerados uno de los parámetros de calidad más importantes de uvas y vinos.<sup>16,17</sup> Según su estructura química, los compuestos polifenólicos pueden ser divididos en dos grandes grupos: no-flavonoides (ácidos fenólicos y estilbenos) y flavonoides (flavonoles, flavanoles y antocianos).



**Figura 1.** Clasificación de los compuestos polifenólicos y su ubicación en la baya de uva.

Como se observa en la **Figura 1**, en las bayas de uva los compuestos polifenólicos se distribuyen principalmente en los hollejos y en las semillas (no-flavonoides y flavonoides) y en menor proporción en la pulpa (no-flavonoides). Los taninos condensados se localizan en el raspón<sup>18,19</sup> mientras que los antocianos se aglutinan en el hollejo de la baya. Únicamente en variedades tintoreras como la Alicante Bouchet, Pinot Noir y Gamay también se encuentran en la pulpa.



A continuación se hace una breve descripción de los principales fenoles presentes en uvas y vinos, de acuerdo con las revisiones realizadas por Cheynier y col.<sup>20</sup>

### 1.1. Fenoles no flavonoides

Son básicamente ácidos fenólicos de dos tipos, los ácidos hidroxicinámicos, formados por un fenol que porta una cadena lateral insaturada (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) y los ácidos hidroxibenzoicos, formados por un fenol unido a una función ácida (C<sub>6</sub>-COOH). Otros derivados no flavonoides son los estilbenos.

**Ácidos hidroxicinámicos:** los principales son los derivados de los ácidos cafeico, cumárico y ferúlico, los cuales se encuentran esterificados con el ácido tartárico dando lugar a los ácidos caftárico, cutárico y fertárico, respectivamente. Los ácidos caftárico y cutárico son los principales sustratos de la oxidación enzimática de los mostos y química de los vinos. Sus productos de oxidación, las quinonas, tienen una alta reactividad y pueden participar en distintas reacciones.<sup>21,22</sup>

**Ácidos hidroxibenzoicos:** en vinos, el ácido gálico es uno de los compuestos monoméricos más abundantes, mientras que en las uvas se encuentra esterificado con los flavanoles. Otros ácidos hidroxibenzoicos, como el siríngico, el vainílico y el *p*-hidroxibenzoico, se pueden encontrar en vinos que han estado en contacto con madera de roble ya que proceden de la degradación de la lignina de las barricas.

**Estilbenos:** entre los estilbenos destaca el resveratrol, que se encuentra en el hollejo de la uva o en las pepitas, y que es producido por la vid en respuesta a un ataque fúngico.<sup>23</sup> El interés en la ingesta de este compuesto es debido a su actividad biológica antioxidante. Su estructura química se presenta en la **Figura 2**.

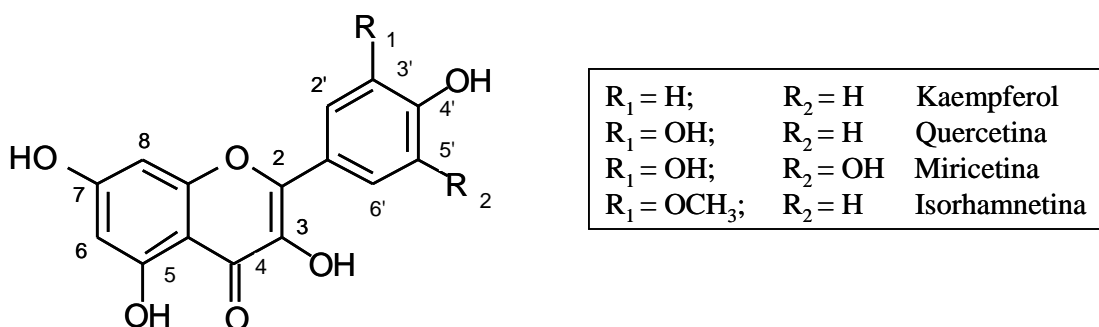


**Figura 2.** Estructura química del resveratrol.

## 1.2. Fenoles flavonoides

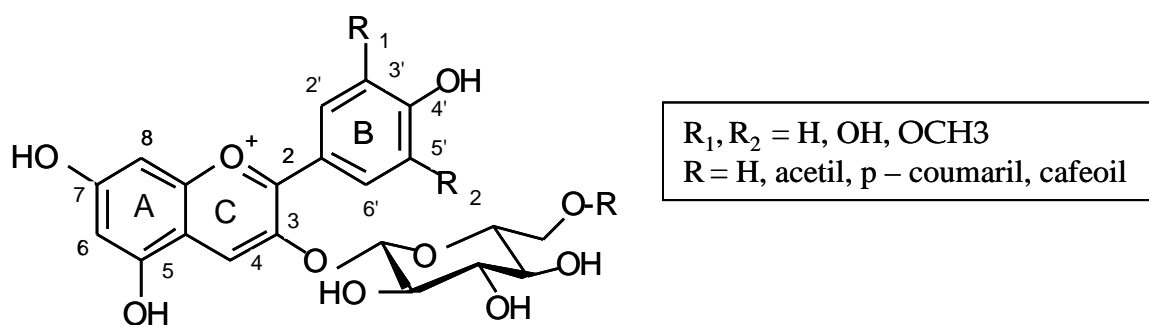
En los vinos tintos, estos compuestos son mucho más importantes por la gran cantidad extraída de los hollejos y de las semillas durante la maceración, a pesar de no estar presentes en la pulpa.

**Flavonoles:** Son pigmentos amarillos y se caracterizan por poseer un enlace insaturado entre el C2 y C3 y un grupo carbonilo en el C4, como puede observarse en la **Figura 3**. Estos flavonoides pueden existir como agliconas y también bajo la forma de glicósidos en la posición C3.<sup>20</sup> Los mayoritarios en la uva son la quercetina, la miricetina y el kaempferol y los glicósidos más comunes son la glucosa y la galactosa, junto con el ácido glucurónico.<sup>24</sup> Se ha descrito la participación de estos compuestos en el color de los vinos tintos ya que pueden actuar como copigmentos de los antocianos.<sup>25</sup>



**Figura 3.** Estructura química de los flavonoles y compuestos mayoritarios presentes en uvas.

**Antocianos:** Químicamente, son glucósidos de núcleo flavilium polihidroxilados y/o metoxilados. El núcleo flavilium comprende un anillo A que es un derivado del floriglucinol encadenado a un anillo pirilo, el cual está unido a un anillo fenólico B. Los antocianos mayoritarios presentes en el género *Vitis* son la cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina y malvidina (**Figura 4**).



#### Antocianos mayoritarios

$R_1 = OH;$	$R_2 = H$	$R = H$	Cianidina-3-glucósido
$R_1 = OCH_3;$	$R_2 = H$	$R = H$	Peonidina-3-glucósido
$R_1 = OH;$	$R_2 = OH$	$R = H$	Delfinidina-3-glucósido
$R_1 = OCH_3;$	$R_2 = OH$	$R = H$	Petunidina-3-glucósido
$R_1 = OCH_3;$	$R_2 = OCH_3$	$R = H$	Malvidina-3 glucósido

**Figura 4.** Estructura química de las antocianos mayoritarios presentes en *Vitis vinífera*.

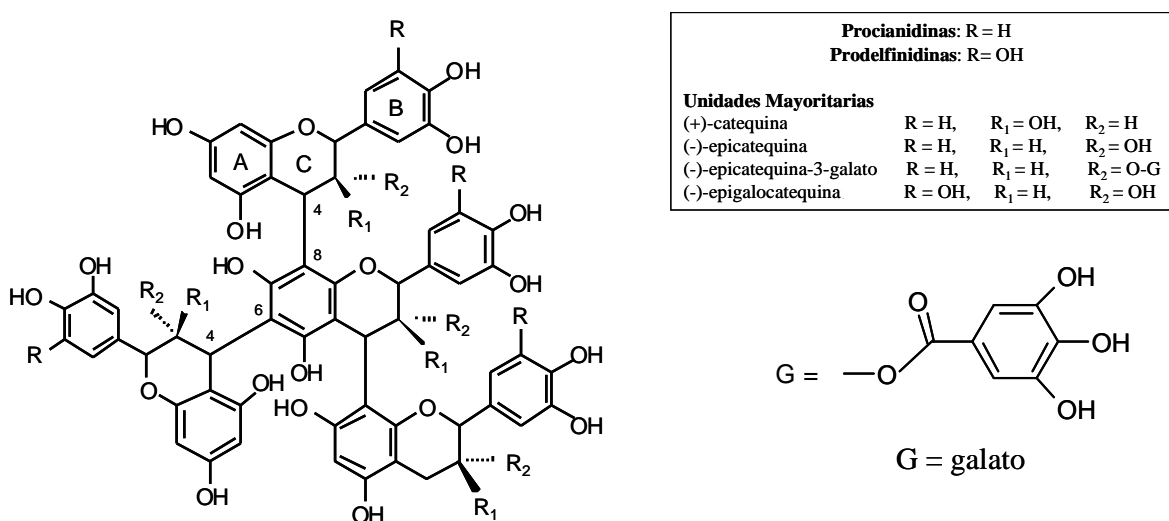
Las formas agliconas, sin unión a una molécula de azúcar<sup>26</sup>, se denominan antocianidinas o antocianidoles y no se encuentran en forma libre en uvas y vinos ya que son muy inestables. En *Vitis vinífera* se encuentran unidos a una molécula de glucosa ya que esta unión les otorga estabilidad.<sup>27</sup> Esta glicosilación sólo se da en la posición 3 (**Figura 4**). La molécula de glucosa puede estar acilada con acético, *p*-cumárico y cafeico en uvas tales como Cabernet Sauvignon, Tempranillo, Garnacha..., aunque variedades como Pinot Noir no contienen antocianos acilados.<sup>28</sup> Especies americanas del género *Vitis*, como *Vitis labrusca*, *Vitis riparia*, *Vitis rupestris* y muchos de sus híbridos contienen antocianos-3,5-diglucósidos.

Durante el envejecimiento del vino, los antocianos están involucrados en reacciones de condensación<sup>29</sup> cicloadición<sup>30</sup> y en asociaciones intra e intermoleculares como la copigmentación.<sup>25</sup> Este conjunto de reacciones junto con el pH y el contenido en SO<sub>2</sub> van a afectar a la expresión del color del vino.

**Flavanoles: catequinas y proantocianidinas (taninos condensados):** Todos estos compuestos tienen un esqueleto común formado por dos anillos bencénicos A y B y un anillo heterocíclico C, sin dobles enlaces, que contiene oxígeno. Este grupo está presente en la uva como monómeros y también en formas más o menos polimerizadas,

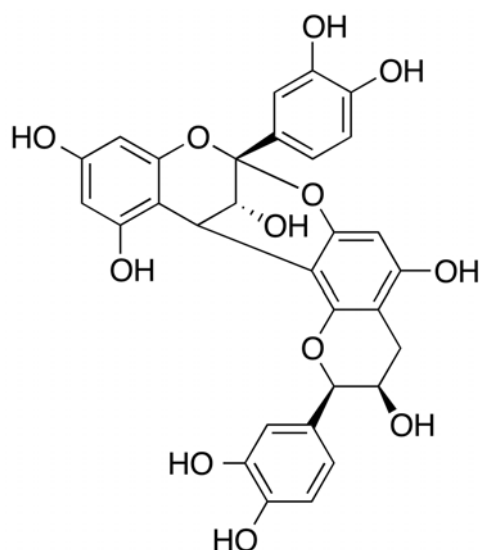
como oligómeros, considerados uniones de 2-5 unidades de monómeros y como polímeros, cadenas largas de más de 5 unidades de monómeros.<sup>31</sup> Los monómeros se conocen genéricamente como 3-flavanoles mientras que a los polímeros se les denota como taninos condensados o proantocianidinas (PAs). El nombre de proantocianidinas proviene de la propiedad que tienen estas moléculas de liberar antocianidinas si se someten a calentamiento en medio ácido por la ruptura de uniones intermonoméricas.

Existen dos grupos de proantocianidinas presentes en la uva: las **procianidinas** formadas por catequina, epicatequina y epicatequina-3-galato y las **prodelfinidinas** formadas por galocatequina, epigalocatequina y epigalocatequina-3-galato (**Figura 5**), encontrándose estas últimas en menor concentración. Las unidades monómeras se unen entre sí mediante enlaces covalentes C-C. Las uniones interflavánicas más usuales son las que se establecen entre el carbono 4 de una unidad flavanol y los carbonos 8 ó 6 de la otra. El enlace interflavánico de tipo C4-C8 está favorecido respecto al C4-C6. La estructura presentada por el dímero muestra cinco centros de asimetría que pueden dar lugar teóricamente a 32 formas ópticamente activas. Los mejor representados son los dímeros denominados de tipo B con enlaces C4-C8 (dímeros B1 a B4) ó C4-C6 (dímeros B5 a B8). En la uva y el vino los taninos condensados más abundantes son las procianidinas formadas por la condensación de unidades de (epi)-catequina.



**Figura 5.** Estructura de una proantocianidina en donde se representan las diferentes uniones de tipo B y los principales flavanoles presentes en uvas y vinos.

Aunque menos frecuentes, existen también proantocianidinas que, además de la unión C4-C8 ó C6, presentan un enlace adicional de tipo éter<sup>32</sup> entre las posiciones C2-C7 denominadas proantocianidinas de tipo A (**Figura 6**). Este tipo de proantocianidinas (PAs) suponen la pérdida de dos hidrógenos respecto de las PAs de tipo B.



**Figura 6.** Estructura química de una proantocianidina de tipo A.

Por tanto, las características químicas de las proantocianidinas (oligómeros y polímeros) vienen dadas por cuatro factores: a) naturaleza de las unidades constitutivas (catequina, epicatequina, galocatequina, epigallocatequina), b) presencia del sustituyente galato (galoilación), c) número de unidades monómeras (grado de polimerización) y d) tipo de unión de las unidades monómeras (tipo A ó tipo B). Debido a las distintas posibilidades que se presentan dentro de cada factor y a las combinaciones posibles entre factores, existen una gran diversidad de formas de proantocianidinas, además, la distribución de estos compuestos varía en función de las partes de la baya. Así, las proantocianidinas de los hollejos difieren de las encontradas en las semillas, en que las de los hollejos contienen (-)-epigallocatequina, y poseen un mayor grado de polimerización y una menor proporción de subunidades galoiladas mientras que las de las semillas poseen subunidades de (-)-epicatequina-3-galato, las cuales apenas se encuentran en los hollejos.<sup>33-35</sup>

## 2. FACTORES DETERMINANTES DE LA COMPOSICIÓN POLIFENÓLICA DE LAS UVAS

Los factores más influyentes de los que depende la presencia y concentración de los compuestos polifenólicos en las uvas son: factores genéticos, ambientales o edafoclimáticos y culturales<sup>36</sup> (**Figura 7**).



**Figura 7.** Factores determinantes de la composición fenólica de las uvas.

Cuando se habla de factores genéticos, en ellos se incluye tanto a la variedad como al portainjerto. Al analizar el efecto de la variedad de uva, diversos estudios han demostrado diferencias significativas en la composición de antocianos, flavonoles y flavanoles entre variedades.<sup>19,37-39</sup> Por su parte, los factores edafoclimáticos definen una determinada zona geográfica. Hoy en día, el término francés “terroir”, engloba en su definición la influencia tanto del suelo como del clima de una región determinada. La luz y la temperatura que caracterizan las diferentes zonas de cultivo también modifican la biosíntesis de estos compuestos ya que inciden directamente sobre la actividad fotosintética de la planta.<sup>40-43</sup>

En esta línea, son los factores culturales o prácticas vitícolas, los únicos sobre los que el viticultor tiene decisión y control, una vez que la vid está arraigada. Algunas de estas prácticas, como la poda en verde o el aclareo de racimos (eliminación parcial de algunos racimos de la cepa), han sido tradicionalmente empleadas en viticultura para la regulación de la producción del viñedo así como para mejorar las condiciones sanitarias y de maduración de la uva.<sup>44-48</sup> En determinados años con exceso de producción, el aclareo puede ser una práctica útil para reducir la cantidad de uva hasta los límites máximos establecidos por cada Denominación de Origen. Así, el aclareo de racimos ha sido descrito como una práctica que mejora la calidad de las uvas, modificando algunos atributos como el contenido de azúcares, pH, la acidez total, los aromas y el color durante la maduración.<sup>44,45,49-52</sup> Sin embargo, en ocasiones se ha observado que la reducción del rendimiento mediante el aclareo manual no conlleva una mejora en la calidad de la uva, mostrando un mayor impacto los factores edafoclimáticos como la temperatura y humedad del suelo.<sup>46,53</sup> Es necesario subrayar que, en general, el aclareo manual de racimos actúa reduciendo únicamente el número de racimos y sólo afecta al tamaño cuando se realiza un aclareo de partes del racimo. Además, el aclareo manual de racimos es una técnica cara, debido al tiempo empleado y a la elevada cantidad de mano de obra requerida, cuyos resultados pueden considerarse en muchos casos irregulares.<sup>49,54</sup> En España, la labor de aclareo manual en viñedos conducidos en espaldera puede conllevar alrededor de 40-50 horas por hectárea.<sup>55</sup> Por ello, en los últimos años se ha intentado probar alternativas para reducir tanto el trabajo como el coste de esta técnica, proponiéndose otras opciones como el aclareo mecanizado<sup>56</sup> o el aclareo químico.<sup>52,57,58</sup>

Los primeros resultados de aclareo mecánico en viñedos en espaldera han apuntado a la posibilidad de reducción de la producción de forma satisfactoria, con una mejora de la calidad de la uva en concentración de azúcares, antocianos y polifenoles, con tiempos de trabajo del orden de 60-90 minutos por hectárea.<sup>59</sup> En el vino, se ha observado un incremento en el grado alcohólico, la intensidad colorante y el contenido en polifenoles, así como un aumento de la astringencia en el plano sensorial.<sup>56</sup>

En relación con el control del rendimiento del viñedo mediante fitohormonas (aclareo químico), los principales estudios se han centrado en el grupo de las giberelinas y del etileno.<sup>60,61</sup> En esta línea, el compuesto químico prohexadiona de calcio (Pro-Ca),

3-óxido-4-propionil-5-oxo-3-ciclohexanocarboxilato de calcio, se presenta como alternativa a compuestos anteriormente utilizados. Este compuesto ha sido registrado como Apogee® (27.5 % Pro-Ca) en Norte América para el empleo en manzanos y en Europa como Regalis® (10 % Pro-Ca) en el caso de manzanos y perales. La utilización de este compuesto en manzanos muestra su potencial en la reducción del número de brotes, lo que se traduce en una disminución en el tiempo de poda.<sup>62</sup>

La prohexadiona de calcio actúa inhibiendo la biosíntesis de las giberelinas, en concreto, reduciendo los niveles de GA<sub>1</sub> (giberelina de gran actividad) y provocando así altas concentraciones de su precursor GA<sub>20</sub> (giberelina inactiva).<sup>63,64</sup> También interfiere en el metabolismo de los flavonoides induciendo en árboles frutales una mayor resistencia a bacterias y a hongos.<sup>65</sup> Además, presenta una gran ventaja al tratarse de un producto de baja toxicidad y persistencia<sup>66</sup>, debido a un proceso muy rápido de degradación, sin constituir riesgo aparente ni en los consumidores ni en el medio ambiente.<sup>67,68</sup>

Los primeros estudios que relacionan la vid con la prohexadiona de calcio fueron llevados a cabo por Disegna y col.<sup>69</sup> en la variedad de uva Tannat. Estos resultados apuntan a que la aplicación de Pro-Ca produce un incremento en el contenido alcohólico, una mayor intensidad colorante, un mayor volumen en boca y una mayor intensidad aromática, incrementándose el contenido de terpenos y norisoprenoides en comparación con los vinos testigo. Se ha estudiado el impacto de este producto en uvas de variedades como Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon, Chardonnay y Seyval observándose una disminución en el tamaño de baya.<sup>70,71</sup> En el caso de la variedad Cabernet Sauvignon, la reducción del tamaño de baya estuvo correlacionada con un incremento en la intensidad colorante y en el contenido de antocianos y fenoles totales de las bayas, pero estos autores no evaluaron los efectos finales en el vino.<sup>71</sup>

En la variedad Tempranillo, la aplicación de este producto en prefloración reduce el rendimiento de producción, así como el peso y el tamaño de las bayas. Los vinos elaborados presentan un mayor contenido en polifenoles totales, taninos e intensidad colorante y son mejor evaluados sensorialmente que los vinos testigo.<sup>58</sup>



Debido a la influencia del resto de factores vitícolas previamente citados, a la hora de demostrar los efectos de la aplicación en campo de un nuevo producto es necesario realizar una investigación que comprenda al menos 2 ó 3 años de trabajo y enfocado al estudio de más de una variedad. Por ello, la aplicación de prohexadiona de calcio en dos variedades mayoritarias de uva tinta, Tempranillo y Garnacha durante dos vendimias consecutivas y el comportamiento de este producto tanto en uvas como en vinos y en sus propiedades organolépticas ha sido abordado en el Capítulo 5 de esta memoria. Estos estudios llevados a cabo en comparación con otra técnica de cultivo ampliamente utilizada como es el aclareo manual, abren camino hacia nuevas alternativas para controlar el rendimiento de producción de forma satisfactoria, sin incidir en el detrimento de la calidad.

### **3. IMPORTANCIA DE LOS COMPUESTOS POLIFENÓLICOS**

El análisis cualitativo y cuantitativo de los compuestos polifenólicos resulta relevante debido a la importancia que suscita su estudio en dos disciplinas de trabajo bien diferenciadas. Por una parte estos compuestos generan interés en el ámbito de la medicina por las propiedades beneficiosas que reportan en la salud humana mientras que en el ámbito de la enología el interés surge de las cualidades organolépticas que estos compuestos imprimen a los vinos.

#### **3.1. Importancia de los compuestos polifenólicos en la salud**

Los polifenoles son los compuestos bioactivos antioxidantes más abundantes que ingerimos en nuestra dieta ya que están presentes en multitud de alimentos como frutas y hortalizas y en bebidas como vino, té y café. Además de sus propiedades antioxidantes<sup>72-74</sup> poseen propiedades antimicrobianas y anticarcinogénicas.<sup>75,76</sup> También son conocidos los efectos de estos compuestos en la reducción de enfermedades cardiovasculares, conocido como la “Paradoja francesa”.<sup>77,78</sup>

Los efectos beneficiosos podrían estar relacionados con la galoilación de catequinas y con la presencia de unidades de galocatequinas en extractos naturales.<sup>79,80</sup> Por lo tanto, se considera a la galoilación y a la polimerización importantes factores estructurales con capacidad antioxidante y propiedades antitumorales, aunque todavía no se puede confirmar una correlación directa entre estructura y función.

#### **3.2. Importancia de los compuestos polifenólicos en el vino**

Los compuestos polifenólicos juegan un papel primordial en las características organolépticas y en la calidad de los vinos ya que participan en el color, en el sabor y en las sensaciones en boca, siendo, en gran medida, responsables del amargor, astringencia, cuerpo y equilibrio de los vinos.<sup>81</sup>

Así, los **ácido fenólicos**, sin características organolépticas particulares en cuanto a olor y sabor, son precursores de los fenoles volátiles, compuestos producidos por la acción de ciertos microorganismos (levaduras del género *Brettanomyces* y bacterias) y

presentes tanto en vinos blancos como en tintos, con incidencia considerable en las características aromáticas de los vinos obtenidos.

Los **antocianos** constituyen la familia de compuestos directamente responsables del color de las uvas y del color de los vinos tintos jóvenes. Tanto los flavonoles como los flavanoles participan en el color a través de reacciones de copigmentación y/o condensación.<sup>25,82</sup> Estudios realizados por Vidal y col.<sup>83</sup> confirman que los antocianos también participan en el incremento de la percepción en boca, otorgando mayor cuerpo a los vinos. Cheynier y col.<sup>84</sup> trabajando con vinos de la variedad Cabernet Franc han observado como una mayor proporción de antocianos respecto a taninos da lugar a vinos más equilibrados sensorialmente y más suaves al paladar. Soares y col.<sup>85</sup> han mostrado la participación de la malvidina-3-glucósido en el sabor amargo.

Los **flavonoles**, tanto glicosilados como sus agliconas, han sido descritos como amargos<sup>86,87</sup> sin embargo, estudios realizados por Hufnagel y Hofmann<sup>88</sup> describen a los flavonoles glicosilados como compuestos astringentes pero no amargos. Los **flavonoles** contribuyen a propiedades sensoriales tales como astringencia, amargor y cuerpo.<sup>13,89,90</sup> Los flavanoles interactúan con proteínas y polisacáridos, y participan activamente en la estabilización del color durante la vinificación y crianza.<sup>91</sup> Según diversos estudios, la astringencia y el amargor dependen de las características estructurales de las proantocianidinas, como el tamaño molecular, la composición monomérica y el grado de galoilación. Así, a medida que aumenta el grado de polimerización y el porcentaje de galoilación parece aumentar la sensación de astringencia.<sup>90,92</sup> Respecto al amargor, esta sensación gustativa es causada principalmente por monómeros y oligómeros de flavanoles y su intensidad también aumenta con el grado de galoilación.<sup>93</sup> Por lo tanto, el conocimiento de la composición polifenólica del vino y en concreto de la composición estructural de las proantocianidinas resulta esencial para la definición de sus características sensoriales.

## 4. SENSACIONES GUSTATIVAS Y TÁCTILES EN VINOS. COMPUESTOS IMPLICADOS.

Las sensaciones gustativas ampliamente aceptadas como sabores son: dulce, ácido, amargo y salado. En la literatura aparece también descrito un quinto sabor, el unami, traducido como “cárnico”, “sabroso”.<sup>94</sup> En el vino, tanto el sabor salado<sup>36,88,95,96</sup> como el unami<sup>88</sup> no juegan un papel relevante ya que no tienen ningún impacto sensorial. Es por ello, que a lo largo de este apartado, sólo resaltaremos los compuestos químicos que están implicados en la percepción de los sabores dulce, ácido y amargo y en la sensación táctil astringencia.

### 4.1. Dulzor

El dulzor es un atributo esperado en vinos dulces pero no especialmente importante en vinos secos. El sabor dulce de los vinos se ha atribuido principalmente a la presencia de glucosa y fructosa<sup>97</sup>, que son los dos azúcares mayoritarios presentes en las uvas, siendo notablemente inferior el contenido en otros azúcares como la sacarosa.<sup>98</sup> Se ha comprobado que el poder edulcorante de la fructosa es más de dos veces superior al de la glucosa<sup>99</sup> sin embargo, ambos azúcares parecen ser sólo responsables del sabor dulce en vinos dulces, ya que no juegan un papel importante en vinos secos. En un estudio llevado a cabo con un set de veinticuatro vinos tintos secos, se observó que el atributo dulce estudiado no era útil para clasificar los vinos, ya que todos fueron evaluados con puntuaciones muy similares.<sup>13</sup> Esto es debido a la baja concentración de glucosa 0.2 - 0.8 g/L y de fructosa 1.2 g/L encontrada en vinos secos. Ambas concentraciones se encuentran por debajo del umbral de percepción detectado para estos compuestos, el cuál es de 3.2 y 1.8 g/L para glucosa y fructosa, respectivamente.<sup>88</sup> Además, en ese estudio, el dulzor no estuvo correlacionado ni con los azúcares reductores (glucosa y fructosa) ni con el contenido en etanol. El etanol ha sido descrito como un compuesto ligeramente dulce en disoluciones sintéticas con un contenido bajo en etanol, entre un 2 - 4 %<sup>100-102</sup>, sin embargo, a las concentraciones en las que se suele encontrar en el vino (>10 % v/v) potencia el amargor y resulta ardiente al paladar.<sup>103</sup>

Hofmann y col.<sup>88</sup> en un estudio sensorial realizado a partir de los compuestos no volátiles identificados en un vino seco, anotan como compuestos sensorialmente dulces, seis aldosas y cetosas (fructosa, glucosa, arabinosa, galactosa, xilosa y ramnosa), ocho alditoles (glicerol, 1,2-propanodiol, inositol, manitol, arabitol, eritritol, sorbitol y ribitol) y seis aminoácidos (L-prolina, L-alanina, glicina, L-metionina, L-serina y L-treonina). Sin embargo, de todos ellos, únicamente la L-fructosa y el glicerol presentan un impacto sensorial en el dulzor del vino de estudio, es decir, la concentración de estos dos compuestos es superior al umbral de percepción o factor DoT (Dose-over-Threshold) (cociente de la concentración del compuesto entre su concentración umbral de percepción sensorial). Ambos compuestos también estuvieron implicados en la percepción del sabor dulce en otro estudio llevado a cabo con vinos blancos.<sup>104</sup> Otros compuestos, como la glucosa, el 1,2-propanodiol, el inositol y la L-prolina podrían jugar también un papel en el dulzor del vino ya que sus concentraciones se encuentran cercanas al umbral de percepción.<sup>88</sup>

## **4.2. Acidez**

Los ácidos orgánicos son los compuestos que intervienen en la acidez del vino aportando frescor y un estímulo agradable<sup>105</sup>, aunque en exceso de concentración pueden resultar desagradables en boca.<sup>81</sup> Este es el caso del ácido tartárico, ácido mayoritario en los vinos<sup>106</sup>, que a altas concentraciones (> 5 g/L) provoca un intenso y desagradable sabor al vino.<sup>107</sup> Además, el ácido tartárico presenta un bajo umbral de percepción, encontrándose en vinos en concentraciones en torno a 10 veces superiores a su umbral de percepción.<sup>88</sup> El ácido tartárico junto con el málico y el cítrico, procedentes todos ellos de las uvas, son los principales responsables del sabor ácido de los vinos. Además de contribuir a la acidez, al ácido málico se le han atribuido notas “verdes” y “duras”, las cuales son reducidas en el transcurso de la fermentación maloláctica, al transformarse el ácido málico en láctico<sup>81</sup> proporcionando un sabor ácido “agradable” o “suave”<sup>108</sup> mientras que el ácido cítrico ha sido descrito como “refrescante”.<sup>108</sup> Los otros dos ácidos procedentes de la fermentación alcohólica, ácido acético y ácido succínico, contribuyen en menor medida a la acidez aportando un carácter o sabor suplementario.<sup>109</sup> Así, la presencia de ácido succínico podría potenciar el amargor de los vinos.<sup>110</sup> Por otra parte, el ácido acético en concentraciones inferiores

a 300 mg/L proporciona una complejidad deseable al vino, tanto en el aroma como en el sabor mientras que en concentraciones superiores presenta un sabor agrio, confiriendo a los vinos un aroma desagradable.<sup>81</sup> Sin embargo, hay otros ácidos como el ácido fumárico y el ácido pirúvico, que al encontrarse en pequeñas concentraciones, no tienen un impacto sensorial en la acidez del vino. Lo mismo ocurre con los ácidos glutámico, isocátrico y aconítico.<sup>88</sup> De acuerdo a estos datos, un estudio publicado por Hofmann y col.<sup>88</sup> mostró que en un vino tinto seco, el ácido L-tartárico y el ácido D-galacturónico son estimulantes importantes del sabor ácido, seguidos del ácido acético, succínico, L-málico y L-láctico.

Los ácidos fenólicos hidroxicinámicos y benzoicos, al poseer una función carboxílica son descritos como ácidos, sin embargo, su presencia en concentraciones inferiores a su umbral de percepción los excluyen de la contribución a este sabor en el vino.<sup>111,112</sup> Verette y col.<sup>112</sup> han comprobado como la adición de ácido cafeico y de sus ésteres al vino en una concentración de 150 mg/L no modifica la percepción de la acidez. Preys y col.<sup>113</sup> tampoco han observado ninguna correlación entre el atributo acidez y la presencia de ácidos fenólicos. Además, los ácidos benzoicos han sido descritos como amargos, dulces, astringentes y picantes, a distintos niveles, en función de su estructura.<sup>114</sup>

### **4.3. Amargor**

Expertos en alimentación reconocen la dificultad de encontrar un nivel óptimo de amargor para cada persona, ya que la respuesta al sabor amargo y el umbral de lo que es aceptado o no varía enormemente de una persona a otra.<sup>89</sup> Los umbrales de percepción para el sabor amargo son extremadamente bajos<sup>115,116</sup>, siendo la quinina detectada en concentraciones de 25  $\mu\text{mol/L}$  y ciertas toxinas son aún detectadas en concentraciones inferiores. A pesar de ello y por cuestiones genéticas, en torno a un 25 % de la población no es capaz de detectar el sabor altamente amargo que denotan compuestos sintéticos como la feniltiocarbamida (PTC) y el 6-n-propiltiouracil (PROP).<sup>117,118</sup> Diversos test<sup>119-122</sup> se han propuesto con el fin de determinar aquellos catadores capaces de percibir el amargor de los que no lo son.

Al igual que en la cerveza o en el café, en el vino tinto se espera un cierto grado de amargor, el cual se suele relacionar con un compuesto deseable en estas bebidas: ácido  $\alpha$ -lupúlico o cafeína, respectivamente.<sup>89,123,124</sup> Por el contrario, en vinos blancos, el amargor es considerado un atributo indeseable.<sup>125</sup> Numerosos estudios señalan a los compuestos polifenólicos responsables de aportar este atributo en los vinos.<sup>88,90,126-128</sup> Compuestos polifenólicos monoméricos, como las agliconas de los flavonoles (miricetina y quercetina) y como los flavanoles (catequina) han sido denotados como amargos.<sup>113,127</sup> Algunos flavonoles también han sido descritos amargos al 5 % de agua/etanol<sup>129</sup>, sin embargo, estudios realizados por Hufnagel y Hofmann<sup>88</sup> describen a los flavonoles glicosilados como compuestos astringentes pero no amargos. La percepción del amargor puede variar en función de la polimerización de los taninos e incluso de la estereoquímica del compuesto. Así, Peleg y col.<sup>90</sup> han demostrado como la (-)-epicatequina es más amarga que el estereoisómero (+)-catequina y que ambos son más amargos que una procianidina dímera y ésta a su vez que una procianidina trímera. Por el contrario, Hufnagel y Hofmann<sup>88</sup> han detectado umbrales de percepción para el amargor inferiores en el caso de procianidinas dímeras y trímeras, estando en torno a 400 - 500  $\mu\text{mol/L}$  que en el caso de los monómeros (+)-catequina y (-)-epicatequina, cuyos umbrales sensoriales son 1000 y 930  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente.

Un estudio llevado a cabo con vinos blancos elaborados con y sin el contacto de los hollejos y de las pepitas y con adición de antocianos reveló que la puntuación dada al atributo amargo estaba correlacionada con la mayor parte de los compuestos fenólicos, pero especialmente con las proantocianidinas y con los fenoles poliméricos<sup>130</sup>, estando de acuerdo con otros resultados previos.<sup>126,131</sup> En esta línea, un estudio centrado en la reconstitución cuantitativa de la fracción no volátil de un vino seco<sup>88</sup>, combinando el aislamiento de los compuestos con el análisis sensorial, engloba como compuestos potencialmente amargos a dos flavanoles monómeros (catequina y epicatequina), a cuatro dímeros (B1, B2, B3 y C1) y a siete ésteres de los ácidos fenólicos (éster etílico del ácido gálico, éster etílico del ácido p-cumárico, éster etílico del ácido sirínico, éster etílico del ácido vanílico, éster etílico del ácido cafeico, éster etílico del ácido ferúlico, éster etílico del ácido protocatéquico). A pesar de presentar todos estos compuestos concentraciones 10 veces inferiores a su umbral de percepción, se ha sido descrito que el amargor puede estar inducido por concentraciones por debajo del umbral de percepción sensorial tanto de los ésteres de los ácidos fenólicos como de los flavanoles.

Por el contrario, los fenoles poliméricos de más de 5 kDa así como los aminoácidos son descritos como compuestos no amargos. Un trabajo sensorial enfocado al estudio de fracciones de vino tinto destacó que el amargor percibido es debido a la presencia de flavanoles monómeros como la catequina y la epigallocatequina, ácidos fenólicos como el cutárico y el caftárico y flavonoles como la miricetina.<sup>132</sup>

Un ensayo reciente<sup>85</sup> centrado en el estudio de polifenoles con capacidad de activar en el ser humano distintos receptores del sabor amargo, establece que la (-)-epicatequina activa tres receptores, TAS2R4, TAS2R5 y TAS2R39, mientras sólo dos receptores TAS2R5 y TAS2R39, responden a la poligalactoglucosa. En contraste, la malvidina-3-glucósido y la procianidina trómera estimulan un único receptor TAS2R7 y TAS2R5, respectivamente.

A pesar de los trabajos enfocados al estudio del sabor amargo en los vinos, aún no ha sido posible obtener un modelo predictivo para este sabor.<sup>113,133</sup> Este hecho puede ser debido, bien a la capacidad genética relacionada con la percepción de este sabor y/o bien a las interacciones sensoriales que enmascaran su percepción.

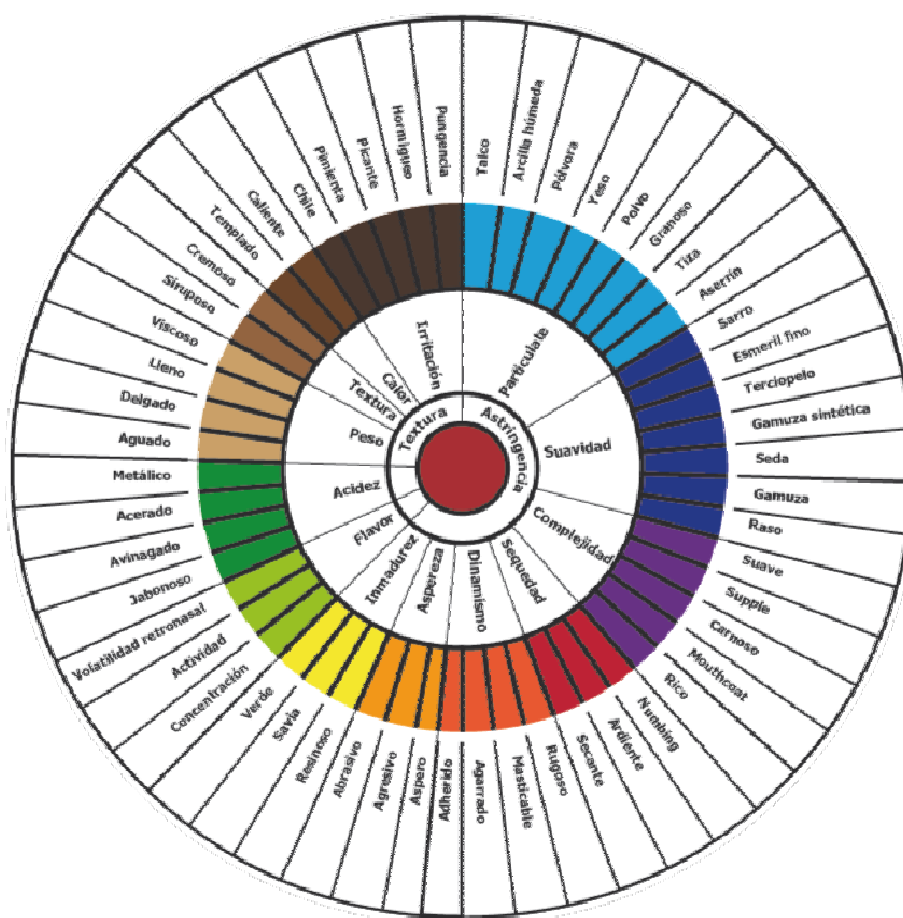
#### **4.4. Astringencia**

La astringencia es principalmente descrita como una sensación táctil<sup>134,135</sup>, debida a la interacción de los taninos con las glicoproteínas salivares, generando la pérdida de lubricación de la cavidad bucal.<sup>136,137</sup> Esta sensación también está condicionada por el caudal salival y la composición de la saliva de cada individuo.<sup>138,139</sup>

La astringencia es la sensación táctil más ampliamente estudiada ya que es una importante característica correlacionada con la calidad de los vinos tintos.<sup>140-142</sup> Un exceso de astringencia puede enmascarar el resto de sabores y sensaciones, mientras que en defecto, los vinos resultan “flojos”, insípidos y poco apreciados.<sup>89</sup> Un estudio realizado con el fin de comparar las preferencias de los consumidores habituales de vino con las preferencias de expertos en vinos, corroboró que los expertos en vino denotan a vinos con marcada astringencia como vinos de más calidad, mientras que esta apreciación no refleja el gusto de los consumidores.<sup>140,143</sup>



Varios autores han descrito distintos términos o subcualidades para definir la astringencia.<sup>83,144</sup> Así, Gawel y col.<sup>145</sup> publicaron “la rueda de las sensaciones en boca” denotado en inglés como “the mouth-feel wheel” que incluye un léxico jerarquizado que permite describir la astringencia con diversos términos tales como rugosidad, sequedad, granulado, constricción, aspereza, dureza, sedosidad...(Figura 8). Algunos de estos términos se han utilizado en diversos trabajos para definir de manera más precisa la sensación táctil percibida.<sup>83,92,146-148</sup> Así también, algunos de ellos son ampliamente empleados por los enólogos para describir la astringencia de los vinos.



**Figura 8.** Sensaciones en boca perceptibles en vinos tintos.

La relación existente entre la composición polifenólica y la astringencia ha sido ampliamente estudiada.<sup>90,92,113,141,146,149-153</sup> Gawel y col.<sup>146</sup> anotan que las subcualidades de la astringencia podrían estar relacionadas con la cantidad o nivel de polifenoles presentes en el vino. Jones y col.<sup>154</sup> postulan que la composición fenólica polimérica está relacionada con atributos como “aspereza y sequedad”. En la misma línea,

Hufnagel y Hofmann<sup>88</sup> describen una fracción polimérica de peso molecular mayor de 5 kDa como astringencia “rugosa”. Se ha observado que tanto el incremento en el grado de polimerización como en la galoilación aumentan la aspereza y la sequedad percibida, mientras que la presencia de epigallocatequina parece disminuir esta percepción.<sup>83,92,113,147</sup> Recientemente se ha establecido que la astringencia de los vinos se encuentra más afectada por la composición química que por la concentración o el grado medio de polimerización.<sup>155</sup> En este contexto, Wollmann y Hofmann<sup>156</sup> encuentran que el grado medio de polimerización y la galoilación no tienen una influencia significativa en la percepción de la astringencia. Sin embargo, algunos trabajos<sup>153,157,158</sup> muestran que la concentración de taninos no es suficiente para explicar la diferente astringencia percibida en los vinos y por lo tanto tampoco lo son los métodos químicos que miden la astringencia a través de la precipitación de taninos con proteínas.<sup>159,160</sup>

Otros compuestos diferentes de las proantocianidinas que parecen contribuir a aumentar la astringencia de los vinos son los antocianos<sup>130,149</sup> y los pigmentos poliméricos grandes (LPP).<sup>133,146,151</sup> No obstante, hay autores que apuntan a que el papel que juegan los antocianos en la astringencia depende de la concentración en la que están presentes las proantocianidinas. Así, a bajas concentraciones de proantocianidinas, los antocianos incrementan la astringencia aterciopelada mientras que a elevadas concentraciones de proantocianidinas parecen disminuirla.<sup>83</sup>

También los compuestos polifenólicos de bajo peso molecular como flavanoles monómeros y ácidos fenólicos han sido descritos principalmente como astringentes.<sup>90,113,149,161-163</sup> De hecho, ácidos fenólicos como el cutárico, caftárico y *cis/trans* aconítico han sido incluidos junto con el contenido de proantocianidinas precipitables con ovoalbumina y el contenido en etanol en dos modelos predictivos realizados para explicar la astringencia percibida.<sup>153</sup> En esta línea, Hofmann y col.<sup>88</sup> observaron como la astringencia causada por la fracción polimérica de más de 5 kDa se ve también amplificada por la presencia de ácidos como el caftárico, el gálico y el ácido carboxílico-2-furano. Al igual que los ácidos fenólicos, los ácidos orgánicos también son considerados amplificadores de la astringencia.<sup>154,164-166</sup> En este sentido, un compuesto que parece ser importante en la astringencia de los vinos jóvenes es el ácido aconítico debido al bajo umbral sensorial que presenta, 0.1 mg/L, para esta sensación.<sup>158</sup>

Los flavonoles glicosilados también contribuyen a la astringencia denotada con la subcualidad de sedosidad.<sup>158</sup> El impacto sensorial en los vinos atribuido a esta familia de compuestos parece ser muy importante, ya que tienen umbrales sensoriales muy bajos (0.1 - 2.1 mg/L).<sup>88</sup> Entre estos compuestos, la quercetina-3-*O*-rutinósido, presente en los vinos, ha sido considerada como un compuesto clave en la astringencia atribuida al té negro ya que es percibida como astringente en muy bajas concentraciones (0.9 µg/L).<sup>167</sup>

Por otra parte, tanto el pH como el etanol parecen tener una gran influencia en la percepción de la astringencia de los vinos. Varios autores han afirmado que una disminución del pH provoca un incremento en la percepción de astringencia de los vinos.<sup>164,168</sup> Sin embargo, respecto al etanol, surgen resultados contradictorios cuando se evalúa su implicación. Trabajos publicados anotan que el etanol incrementa la viscosidad percibida, y que es ese incremento en la viscosidad lo que provoca la reducción de la astringencia percibida.<sup>169,170</sup> Por el contrario, otros estudios apuntan el mínimo o nulo efecto del etanol en la viscosidad y el cuerpo de los vinos.<sup>171,172</sup> Diversos estudios han mostrado que el etanol minimiza la intensidad de la astringencia, atribuyendo este hecho a la habilidad de interferir mediante interacciones hidrofóbicas entre los taninos y las proteínas, causando una reducción de la precipitación de los taninos y una mejor lubricación oral,<sup>83,89,168</sup> esto, siempre y cuando, no exista una elevada concentración tánica.<sup>173</sup> Otro estudio realizado ha reflejado como el incremento de etanol del 8 % al 14 % no modifica la percepción de la astringencia percibida.<sup>174</sup> Vinos tintos con un elevado contenido alcohólico han sido percibidos como menos astringentes pero más complejos, persistentes y con más aromas.<sup>175</sup>

Demiglio y col.<sup>148</sup> llevaron a cabo tratamientos combinados de pH y etanol (pH 3.4 y 3.6; etanol 12 % y 15 %) para ver así la influencia de ambos parámetros en las distintas subcualidades de la astringencia, confirmando que las combinaciones utilizadas no tenían ningún efecto en las subcualidades estudiadas.

## **4.5. Persistencia**

La persistencia es otro atributo comúnmente estudiado en el análisis sensorial de los vinos<sup>57,176,177</sup> ya que es un término que se ha relacionado con la complejidad de los mismos.<sup>178</sup>

La persistencia ha sido definida como la última impresión que deja el vino en la boca, una vez que el amargor y la astringencia han sido detectados<sup>179</sup> o bien como la duración o tiempo que las sensaciones permanecen en la boca.<sup>178</sup> Se ha observado en varios trabajos, que en vinos tintos, la persistencia está correlacionada con la astringencia<sup>140,153</sup>, con el contenido en polifenoles y con la acidez.<sup>153</sup> Meillon y col.<sup>175</sup> han afirmado que un mayor contenido alcohólico proporciona vinos más complejos y persistentes aunque esta observación no ha sido corroborada por otros autores.<sup>57,140</sup> Por el contrario, en vinos blancos, la persistencia depende en gran medida de la composición aromática de los vinos.<sup>176</sup> Como se ha observado en un trabajo publicado recientemente<sup>57</sup> y que forma parte del Capítulo 5 de esta memoria, la persistencia de vinos tintos está positivamente correlacionada con la astringencia, la intensidad retronasal, el amargor y la intensidad aromática (frutas negras y rojas y aromas lácteos).

## 5. INTERACCIONES SENSORIALES

Hasta ahora se ha abordado el estudio de compuestos individuales o familias de compuestos que tienen influencia en las propiedades organolépticas de los vinos. Sin embargo, el vino es una matriz compleja en el que la presencia de uno o varios compuestos puede afectar a las propiedades físico-químicas de otros y en el que ciertos atributos sensoriales pueden afectar a la percepción de otros, produciéndose interacciones de tipo sabor-sabor, sabor-aroma, sabor-astringencia y astringencia-aroma<sup>100,180,181</sup> De entre ellas, las interacciones sabor-aroma han sido las más estudiadas.<sup>154,176,180-188</sup> Por el contrario, un mayor desconocimiento surge en torno a las interacciones sabor-sabor y sabor-astringencia. Varios trabajos abordan el estudio de estas interacciones pero utilizando disoluciones sencillas con combinaciones binarias o ternarias de compuestos sensorialmente activos.<sup>100,189-193</sup> Recientemente, la utilización de vinos reconstituidos<sup>176</sup> y la omisión de grupos de compuestos responsables de un determinado sabor<sup>88</sup> han permitido profundizar en el conocimiento de las interacciones sabor-sabor y sabor-astringencia.

Así, ha sido descrito que el **dulzor** afecta a la percepción de la astringencia y al amargor.<sup>125,194,195</sup> A concentraciones relativamente altas de un compuesto astringente (sulfato de aluminio o ácido tánico), la adición de sacarosa produce una disminución de la astringencia percibida, mientras que para bajas concentraciones, no se observa ningún efecto.<sup>196</sup> En vinos tintos, la adición de sacarosa suprime la intensidad máxima de astringencia percibida.<sup>197</sup> En un vino tinto reconstituido, la omisión de varios compuestos dulces (aldosas, cetosas y alditoles) produce una pérdida significativa de dulzor y de cuerpo y un ligero incremento tanto de la astringencia secante como rugosa, así como del amargor y de la acidez. De forma simultánea, la omisión de compuestos fenólicos claves en la astringencia y considerados no amargos causa un incremento en el dulzor.<sup>88</sup>

Respecto a la **acidez**, la omisión de los ácidos orgánicos de una solución modelo de vino tinto provoca la disminución de la astringencia rugosa, produciéndose un incremento de la astringencia percibida con la subcualidad de sedosa, lo cual muestra el importante papel que juegan estos compuestos en la percepción de algunas

subcualidades de la astringencia.<sup>88</sup> Otros autores, han establecido que la acidez y las correspondientes subcualidades de astringencia percibida en bayas de uva puede venir explicada por el cociente azúcar/acidez más que por el contenido total de ácidos.<sup>198,199</sup>

En relación al **sabor amargo**, éste es reducido por la presencia de azúcares y sustancialmente incrementado por el etanol.<sup>200,201</sup> También el glicerol tiene un efecto supresor sobre este sabor.<sup>154</sup> Scharbert y Hofmann comprobaron como la omisión de flavonoles glicosilados y de catequina disminuye el amargor percibido.<sup>202</sup>

Respecto a la **astringencia** se ha observado como un descenso en el pH y por lo tanto un aumento de la acidez del vino incrementa esta sensación. Esto es debido al descenso del número de iones fenolato y al aumento de moléculas no cargadas que son susceptibles de formar puentes de hidrógeno con las proteínas y por lo tanto de que éstas precipiten generando un aumento en la astringencia.<sup>168,203</sup> El dulzor también se ha comprobado que mitiga la percepción de la astringencia<sup>125,194,195</sup>, al igual que el etanol, aunque ya se han comentado anteriormente las contradicciones existentes respecto a este compuesto. En un experimento centrado en la omisión de compuestos astringentes y no amargos se observa como la eliminación de este grupo de compuestos produce una disminución de la astringencia pero también una disminución de la puntuación dada al atributo amargo, lo que parece apuntar a la existencia de una interacción entre el amargor y esta sensación táctil.<sup>202</sup>

Un trabajo realizado con vinos sintéticos preparados a partir de la combinación de la fracción volátil y no volátil de distintos vinos y enfocado al estudio de la interacción aroma-astringencia, señala que un aumento de notas aromáticas frutales provoca un aumento del dulzor, lo que genera un descenso en la percepción de la astringencia y del amargor.<sup>182</sup> Este hecho, ha sido relacionado con la presencia de interacciones cognitivas y se ha descrito como un fenómeno de aprendizaje asociativo ya que un aumento en el aroma frutal hace que el vino sea percibido como más dulce y por lo tanto menos astringente.<sup>204-206</sup>

Los conocimientos hasta ahora recogidos en el campo de las interacciones se muestran en la **Figura 9** y sirven de base a la hora de enfocar nuevos trabajos de investigación en este campo.

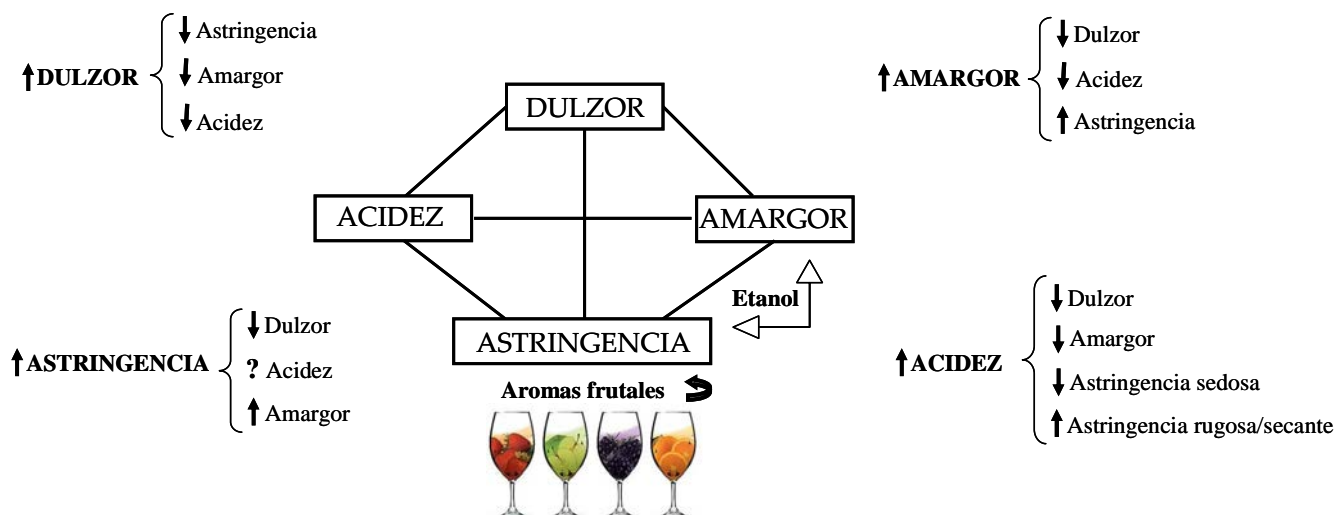


Figura 9. Interacciones sabor-sabor y sabor-astringencia en vinos.

Diversos autores están abordando este tema con matrices lo más similares posibles al vino, en unos casos, mediante operaciones de deconstrucción/reconstrucción de fracciones vínicas<sup>88</sup> y en otros casos, fijando las variables que pueden modificar estos estímulos, como el aroma y el etanol, estudio que se aborda en esta tesis doctoral, para así poder conocer más en profundidad la influencia del resto de percepciones y abrir nuevos caminos en el mundo de las interacciones.

### 5.1. “Efecto *Dumping*” o restricción de la respuesta

La elección de los atributos a considerar en un panel sensorial a la hora de evaluar una muestra es un factor determinante a la hora de evitar una sobrevaloración o infravaloración de la respuesta. Se denomina efecto *dumping* o restricción de la respuesta al uso incorrecto de las escalas sensoriales de respuesta. Este efecto se ha observado en el caso del dulzor, encontrando un incremento en la puntuación del atributo dulce en presencia de un aroma frutal cuando el único atributo puntuable era el dulzor.<sup>193</sup> Cuando se permite la puntuación de ambos atributos, dulzor y aroma frutal, no se observa un incremento en el dulzor. El mismo efecto se observa entre el dulzor y el aroma a vainilla<sup>207</sup>, por lo que la selección de un número apropiado de atributos puede solucionar el problema de incrementos ilusorios o irreales.

En el caso del estudio llevado a cabo por Van Der Klaauw y col.<sup>208</sup> se confirma como la presencia de numerosos atributos puede ocasionar una deflación o infravaloración de las puntuaciones dadas. En este estudio se compararon las puntuaciones de dulzor de una solución de sacarosa con un aroma frutal añadido. Cuando sólo se evaluó el dulzor, la puntuación fue mayor que cuando se evaluó dulzor y aroma frutal, pero cuando la intensidad total y seis atributos más se evaluaron, la puntuación de dulzor fue significativamente más baja que en las otras dos condiciones. Este efecto parece ser una deflación debido a la exigencia de sobre partición de las sensaciones en demasiadas categorías. Aunque este efecto no ha sido exhaustivamente estudiado, sirve como base científica de que un número muy amplio de atributos a evaluar, sobre todo, por consumidores no entrenados puede afectar a los resultados obtenidos. Incluso trabajando con panelistas entrenados es difícil predefinir el número correcto de atributos que eviten que se pueda producir este efecto “*dumping*”. En cualquier caso, la discusión de los diferentes términos utilizados así como la utilización de un vocabulario preciso y el evitar introducir términos irrelevantes podrían ayudar a solventar este problema.<sup>209</sup>



## 6. DETERMINACIÓN DE POLIFENOLES EN VINO

La cuantificación del contenido polifenólico presente en vinos o en fracciones vínicas se puede llevar a cabo bien empleando métodos generales con su posterior determinación espectrofotométrica o bien mediante la separación de los compuestos y su posterior detección.

### 6.1. Métodos generales

El método más empleado para obtener una estimación del contenido polifenólico de vinos o de fracciones de vinos es la medida a 280 nm, conocido como el índice de polifenoles totales (IPT).<sup>210</sup> Debido a su sencillez y rapidez es la medida que más se utiliza en las bodegas para conocer de forma aproximada el contenido polifenólico de los vinos. Además, diversos autores han establecido en vinos una correlación positiva entre el IPT y la astringencia, la intensidad global y la persistencia percibida.<sup>153</sup>

Un ensayo más específico, ya que permite estimar el contenido total de taninos condensados o proantocianidinas, es el método de la vainillina<sup>211</sup> el cual mide la cantidad de taninos presentes en los vinos mediante la reacción con un aldehído aromático como es la vainillina. Otros métodos basados en la precipitación de taninos con proteínas, como la ovoalbumina<sup>160</sup> permiten obtener una información lo más comparable posible con la astringencia percibida por un panel sensorial. Así, un estudio realizado con el fin de explicar la astringencia percibida en los vinos, ha incluido la determinación de las proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs) en el modelo propuesto, debido a la influencia significativa que proporciona esta determinación en la astringencia final.<sup>153</sup>

Para la estimación de los antocianos libres presentes en un vino un método sencillo y muy utilizado ha sido su determinación mediante la decoloración con sulfuroso.<sup>212</sup>

Debido a la rápida e interesante información que aporta la realización de estas medidas a la hora de disponer de una primera caracterización de los vinos, fueron los seleccionados y utilizados en esta memoria.

## **6.2. Métodos instrumentales**

### **6.2.1. Separación de compuestos polifenólicos**

El análisis de compuestos polifenólicos en matrices como el vino tinto no resulta una tarea fácil debido al gran número y variedad de compuestos polifenólicos presentes, lo que dificulta el análisis directo a pesar de disponer de técnicas cromatográficas de alta resolución como la cromatografía líquida. Por ello, en los últimos años, se ha procedido a la separación del material polimérico del no polimérico, facilitando así su determinación.

Comúnmente, las técnicas que han sido utilizadas para separar el vino en fracciones, utilizan sorbentes cromatográficos de baja presión como el LH-20<sup>213-216</sup>, Toyopearl<sup>217-221</sup> o cartuchos de extracción en fase sólida usando como relleno cromatográfico una fase C18.<sup>222-225</sup>

Si el principal objetivo es la separación de las proantocianidinas o taninos condensados en base a su grado de polimerización, diferentes técnicas como la cromatografía en capa fina<sup>226</sup>, la cromatografía líquida en fase normal<sup>227,228</sup>, la cromatografía líquida semi-preparativa con una fase diol<sup>229</sup> y la cromatografía en contra corriente de alta velocidad<sup>230</sup> han sido descritas. De las cuatro, la cromatografía en fase normal usando como fase estacionaria gel de sílice o una fase diol<sup>231</sup> y como detector el ultravioleta-visible o bien un detector de fluorescencia,<sup>232</sup> se propone como la técnica más resolutive y efectiva en la separación de proantocianidinas de semillas y hollejos de uva, cacao y lichi.<sup>233,234</sup> La cromatografía en fase normal permite por tanto la separación de formas “galoiladas” de “no galoiladas”, ya que los galoilados eluyen más tarde que sus equivalentes no galoilados.<sup>235</sup> Sin embargo, esta estrategia también tiene limitaciones ya que las formas galoiladas pueden eluir en la región de otros oligómeros y además las formas galoiladas pueden dar una mayor respuesta en la región del ultravioleta-visible que las formas no galoiladas.<sup>227,235</sup> Debido a la abundancia y al grado de complejidad que presentan las proantocianidinas presentes en vinos, al incluir

además de formas galoiladas y no galoiladas, la presencia de prodelfinidinas, la realización de una cuantitativa y completa separación en base al grado de polimerización de estos compuestos en una matriz como el vino todavía no ha sido posible. Además la falta de procianidinas oligómeras como patrones purificados dificulta aún más una posible cuantificación.

### **6.2.2. Análisis de polifenoles de bajo peso molecular**

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a un detector ultravioleta-visible (HPLC-UV/Vis) ó a un detector de masas (HPLC-MS/MS) es la técnica comúnmente utilizada en el análisis de compuestos polifenólicos de bajo peso molecular como antocianos, ácidos fenólicos, flavonoles y flavanoles.

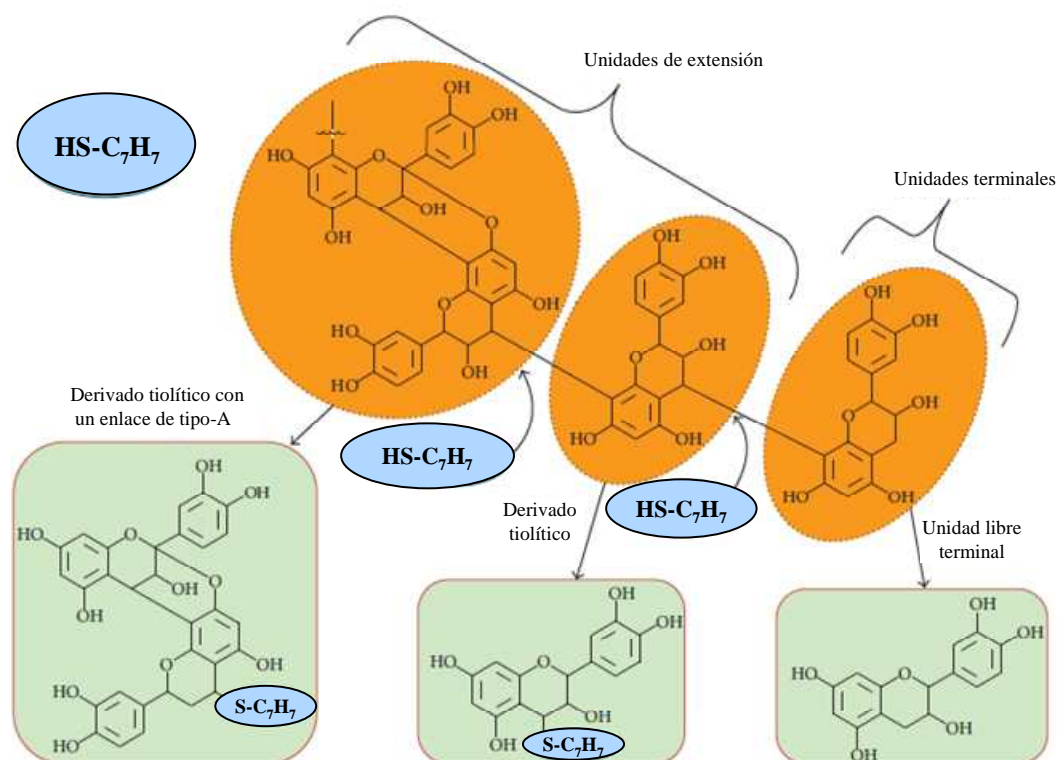
Sin embargo, la cuantificación mediante HPLC queda restringida a muestras que presentan una pequeña proporción de taninos polimerizados, ya que los polímeros generalmente eluyen sin resolverse observándose montañas anchas sin picos cromatográficos bien resueltos. En particular, la resolución empeora a medida que incrementa el peso molecular debido al gran número de posibles regio y estereoisómeros formados y a la menor cantidad de cada uno de los compuestos presentes de forma individual. Hasta el momento ha sido posible una buena resolución hasta un grado de polimerización de cinco unidades.<sup>236</sup> Por ello, en general, la caracterización del contenido proantocianico en los vinos implica la utilización de otros métodos analíticos como los que se detallan a continuación.

### **6.2.3. Análisis y detección de proantocianidinas**

#### ***6.2.3.1. Determinación de la composición y concentración utilizando agentes nucleófilos***

Las proantocianidinas presentes en matrices como el vino, son generalmente analizadas después de una reacción de depolimerización catalizada en medio ácido en presencia de un agente nucleófilo. Así las unidades terminales (flavanol) y las unidades de extensión (flavanol + agente derivatizante) obtenidas mediante la denominada reacción de tiólisis cuando se emplea  $\alpha$ -tolueno tiol<sup>237,238</sup>, pueden ser cuantificadas mediante el análisis con HPLC-UV/VIS.<sup>33,233</sup> Por el contrario, si como nucleófilo se usa el 1,3,5-trihidroxibenceno (floroglucinol), esta reacción recibe el nombre de

floroglucinólisis.<sup>239,240</sup> En ambas reacciones, el agente catalítico es capaz de romper enlaces simples como los enlaces tipo-B, pero proantocianidinas con dobles enlaces como las de tipo-A son resistentes a la tiólisis, resultando por tanto unidades de extensión mediante tioeter derivados y unidades terminales libres<sup>241</sup> (**Figura 10**). Además, como confirman diversos autores<sup>242</sup> no resulta posible la cuantificación de derivados tiolíticos de proantocianidinas tipo-A mediante cromatografía en fase reversa debido a la baja resolución del producto formado y también probablemente a la escasa concentración de estos compuestos en los vinos. No obstante, estas reacciones permiten determinar tanto la composición estructural como el grado medio de polimerización de las proantocianidinas. Diversos trabajos han mostrado la contribución de las distintas unidades terminales y de extensión a la astringencia percibida, obteniéndose resultados contradictorios. Así, Quijada-Morín y col.<sup>155</sup> establecen una correlación significativa positiva entre las unidades ECe y GCt con la astringencia mientras que las unidades de EGC tanto de extensión como terminales reducen la astringencia percibida. En ese estudio no se encontraron correlaciones entre las unidades galoilados y la astringencia. Sin embargo, en un trabajo posterior<sup>243</sup>, la ECGt si que mostró correlación con la astringencia.



**Figura 10.** Reacción de depolimerización mediante  $\alpha$ -tolueno tiol de proantocianidinas que presentan series de catequinas y epicatequinas con enlaces interflavanoles de tipo-A y de tipo-B.

### 6.2.3.2. *Determinación de la composición utilizando MALDI-TOF MS*

En la actualidad, esta técnica espectrométrica de ionización suave, (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz y acoplada a un analizador de tiempo de vuelo); cuyo nombre procede de sus siglas en inglés “Matrix Assisted Laser Desorption Ionization” y “Time-Of-Flight”, aporta una rápida e interesante información cualitativa del contenido proantociánico presente en una muestra de vino sin necesidad de una exhaustiva preparación de la muestra.

Esta técnica tiene un pasado reciente en el análisis de compuestos polifenólicos ya que fue a principios de los años 90 cuando Karas y col.<sup>244</sup> la utilizaron por primera vez en el análisis de polifenoles de uvas. Grados de polimerización de diez<sup>245,246</sup>, quince<sup>247</sup> o veinte<sup>248</sup> han sido detectados mediante MALDI-TOF MS. Una característica básica de esta técnica es la mezcla del analito con una matriz adecuada, seguida de la aplicación de esta mezcla en una platina o porta muestras, produciéndose entonces la irradiación a través de un láser de pulsos. Durante esta irradiación tiene lugar la vaporización e ionización del analito.<sup>249</sup> Este proceso ocurre mediante la absorción de energía por parte de la matriz utilizada, la cual transfiere parte de esa energía a las moléculas de analito que se encuentran en sus proximidades. Por lo tanto, uno de los requisitos que deben cumplir los compuestos que actúan como matrices en esta técnica, es que deben absorber luz a la longitud de onda emitida por el láser utilizado.<sup>250</sup>

Las matrices más frecuentemente usadas para la detección de polifenoles son las derivadas del ácido benzoico como el ácido 2,5-dihidroxibenzoico, (2,5-DHB)<sup>251,252</sup>, aunque estudios recientes llevados a cabo por Nunes-Miranda y col.<sup>253</sup> han verificado problemas a la hora de trabajar con esta matriz, siendo descartada debido a que la mezcla tardaba más de 24 horas en secarse, centrando su estudio en otras matrices como el ácido sinápico y el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA). Esta técnica reporta múltiples ventajas respecto a la ionización mediante electrospray incluyendo una gran tolerancia ante las impurezas, la detección de iones predominantemente monocargados y la posibilidad de reanalizar la muestra.

Hoy en día, MALDI-TOF MS es una técnica empleada en la clasificación<sup>253</sup> y trazabilidad de vinos blancos.<sup>254</sup> Además, mediante esta técnica, se ha conseguido obtener una rápida identificación de antocianos presentes en uvas y vinos sin necesidad de llevar a cabo una previa purificación de la muestra.<sup>255</sup> Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, esta técnica apenas se ha aplicado en el análisis de proantocianidinas en una matriz como es el vino tinto.<sup>156</sup>

---

## 7. REFERENCIAS

- (1) Charters, S.; Pettigrew, S. Product involvement and the evaluation of wine quality. *Qualitative Market Research* **2006**, *9*, 181-193.
- (2) Cox, D. Predicting consumption, wine involvement and perceived quality of Australian red wine. *Journal of Wine Research* **2009**, *20*, 209-229.
- (3) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Sutan, A.; Ballester, J.; Valentin, D. Perception of wine quality according to extrinsic cues: The case of Burgundy wine consumers. *Food Quality and Preference* **2013**, *27*, 44-53.
- (4) Corduas, M.; Cinquanta, L.; Ievoli, C. The importance of wine attributes for purchase decisions: A study of Italian consumers' perception. *Food Quality and Preference* **2013**, *28*, 407-418.
- (5) D'Alessandro, S.; Pecotich, A. Evaluation of wine by expert and novice consumers in the presence of variations in quality, brand and country of origin cues. *Food Quality and Preference* **2013**, *28*, 287-303.
- (6) Verdú Jover, A.J.; Lloréns Montes, F.J.; Fuentes Fuentes, M.M. Measuring perceptions of quality in food products: The case of red wine. *Food Quality and Preference* **2004**, *15*, 453-469.
- (7) Mueller, S.; Osidacz, P.; Francis, I.L.; Lockshin, L. Combining discrete choice and informed sensory testing in a two-stage process: Can it predict wine market share? *Food Quality and Preference* **2010**, *21*, 741-754.
- (8) Mueller, S.; Lockshin, L.; Saltman, Y.; Blanford, J. Message on a bottle: The relative influence of wine back label information on wine choice. *Food Quality and Preference* **2010**, *21*, 22-32.
- (9) Mueller, S.; Szolnoki, G. The relative influence of packaging, labelling, branding and sensory attributes on liking and purchase intent: Consumers differ in their responsiveness. *Food Quality and Preference* **2010**, *21*, 774-783.
- (10) Chrea, C.; Melo, L.; Evans, G.; Forde, C.; Delahunty, C.; Cox, D.N. An investigation using three approaches to understand the influence of extrinsic product cues on consumer behavior: An example of Australian wines. *Journal of Sensory Studies* **2011**, *26*, 13-24.
- (11) Mtimet, N., & Albisu, J.M. Spanish wine consumer behaviour: A choice experiment approach. *Agrobusiness* **2006**, *22*, 343-361.
- (12) Raz, C.; Piper, D.; Haller, R.; Nicod, H.; Dusart, N.; Giboreau, A. From sensory marketing to sensory design: How to drive formulation using consumers' input? *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 719-726.
- (13) Sáenz-Navajas, M.P.; Tao, Y.S.; Dizey, M.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium

---

Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, 58, 12407-12416.

(14) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Avizcuri, J.M.; Valentin, D.; Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V. Contribution of non-volatile and aroma fractions to in-mouth sensory properties of red wines: Wine reconstitution strategies and sensory sorting task. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 732, 64-72.

(15) Cadot, Y.; Caillé, S.; Samson, A.; Barbeau, G.; Cheynier, V. Sensory representation of typicality of Cabernet franc wines related to phenolic composition: Impact of ripening stage and maceration time. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 732, 91-99.

(16) Fragoso, S.; Guasch, J.; Aceña, L.; Mestres, M.; Busto, O. Prediction of red wine colour and phenolic parameters from the analysis of its grape extract. *International Journal of Food Science and Technology* **2011**, 46, 2569-2575.

(17) Pérez-Magariño, S.; González-San José, M.L. Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry* **2006**, 96, 197-208.

(18) Monagas, M.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Review in Food Science and Nutrition* **2005**, 45, 85-118.

(19) Rodríguez Montealegre, R.; Romero Peces, R.; Chacón Vozmediano, J.L.; Martínez Gascueña, J.; García Romero, E. Phenolic compounds in skins and seeds of ten grape *Vitis vinifera* varieties grown in a warm climate. *Journal of Food Composition and Analysis* **2006**, 19, 687-693.

(20) Cheynier, V.; Moutounet, M.; Sarni-Manchado, P. Les composés phénoliques. In *Oenologie, fondements scientifiques et technologiques*, Flanzy, C., Ed.; Lavoissier Tec&Doc: Paris, **1998**; pp. 124-164.

(21) Cheynier, V.F.; Van Hulst, M.W.J. Oxidation of trans-caftaric acid and 2-S-glutathionylcaftaric acid in model solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1988**, 36, 10-15.

(22) Cilliers, J.J.L.; Singleton, V.L. Nonenzymic autoxidative phenolic browning reactions in a caffeic acid model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1989**, 37, 890-896.

(23) Aguamah, G.E.; Langcake, P.; Leworthy, D.P.; Page, J.A.; Pryce, R.J.; Strange, R.N. Two novel stilbene phytoalexins from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry* **1981**, 20, 1381-1383.

(24) Price, S.F.; Breen, P.J.; Valladao, M.; Watson, B.T. Cluster sun exposure and quercetin in Pinot noir grapes and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **1995**, 46, 187-194.



- (25) Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* **2001**, *52*, 67-87.
- (26) Mazza, G.; Brouillard, R. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry* **1987**, *25*, 207-225.
- (27) Furtado, P.; Figueiredo, P.; Chaves das Neves, H.; Pina, F. Photochemical and thermal degradation of anthocyanidins. *Journal of Photochemistry and Photobiology, A: Chemistry* **1993**, *75*, 113-118.
- (28) Wulf, L.W.; Nagel, C.W. High-Pressure Liquid Chromatographic Separation of Anthocyanins of *Vitis Vinifera*. *American Journal of Enology and Viticulture* **1978**, *29*, 42-49.
- (29) Rivas-Gonzalo, J.C.; Bravo-Haro, S.; Santos-Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 1444-1449.
- (30) Fulcrand, H.; Cameira Dos Santos, P.J.; Sarni-Manchado, P.; Cheynier, V.; Favre-Bonvin, J. Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1* **1996**, 735-739.
- (31) Monagas, M.; Hernández-Ledesma, B.; Garrido, I.; Martín-Álvarez, P.J.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Quality assessment of commercial dietary antioxidant products from *Vitis vinifera* L. grape seeds. *Nutrition and Cancer* **2005**, *53*, 244-254.
- (32) Le Roux, E.; Doco, T.; Sarni-Manchado, P.; Lozano, Y.; Cheynier, V. A-type proanthocyanidins from pericarp of *Litchi chinensis*. *Phytochemistry* **1998**, *48*, 1251-1258.
- (33) Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 781-784.
- (34) Souquet, J.M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 509-512.
- (35) Cheynier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, *81*, 223S-229S.
- (36) Jackson, D.I.; Lombard, P.B. Environmental and management-practices affecting grape composition and wine quality - A review. *American Journal of Enology and Viticulture* **1993**, *44*, 409-430.
- (37) Núñez, V.; Monagas, M.; Gomez-Cordovés, M.C.; Bartolomé, B. *Vitis vinifera* L. cv. Graciano grapes characterized by its anthocyanin profile. *Postharvest Biology and Technology* **2004**, *31*, 69-79.
- (38) Otteneder, H.; Marx, R.; Zimmer, M. Analysis of the anthocyanin composition of Cabernet Sauvignon and Portugieser wines provides an objective assessment of the grape varieties. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2004**, *10*, 3-7.

- (39) Obreque-Slier, E.; Peña-Neira, Á.; López-Solís, R.; Zamora-Marín, F.; Ricardo-Da Silva, J.M.; Laureano, O. Comparative study of the phenolic composition of seeds and skins from carménère and cabernet sauvignon grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 3591-3599.
- (40) Nicholas, K.A.; Matthews, M.A.; Lobell, D.B.; Willits, N.H.; Field, C.B. Effect of vineyard-scale climate variability on Pinot noir phenolic composition. *Agricultural and Forest Meteorology* **2011**, *151*, 1556-1567.
- (41) La Iacona, T.; Sanna, M.; Spanna, F.; Schubert, A. Berry polyphenols and climatic variability in 'Nebbiolo' grapes. *Acta Horticulturae* **2012**, *931*, 287-298.
- (42) Peña-Neira, A.; Hernández, T.; García-Vallejo, C.; Estrella, I.; Suarez, J.A. A survey of phenolic compounds in Spanish wines of different geographical origin. *European Food Research and Technology* **2000**, *210*, 445-448.
- (43) Ferrer-Gallego, R.; Hernández-Hierro, J.M.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Influence of climatic conditions on the phenolic composition of *Vitis vinifera* L. cv. Graciano. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *732*, 73-77.
- (44) Chapman, D.M.; Matthews, M.A.; Guinard, J.-. Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different crop yields. *American Journal of Enology and Viticulture* **2004**, *55*, 325-334.
- (45) Guidoni, S.; Allara, P.; Schubert, A. Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *American Journal of Enology and Viticulture* **2002**, *53*, 224-226.
- (46) Keller, M.; Mills, L.J.; Wample, R.L.; Spayd, S.E. Cluster thinning effects on three deficit-irrigated *Vitis vinifera* cultivars. *American Journal of Enology and Viticulture* **2005**, *56*, 91-103.
- (47) Garcia-Escudero El aclareo de racimos como herramienta adecuada para el manejo del potencial productivo en el cultivo de la vid. *La prensa del Rioja* **2006**, *161*, 12-17.
- (48) Gatti, M.; Bernizzoni, F.; Civardi, S.; Poni, S. Effects of cluster thinning and preflowering leaf removal on growth and grape composition in cv. Sangiovese. *American Journal of Enology and Viticulture* **2012**, *63*, 325-332.
- (49) Ough, C.S.; Nagaoka, R. Effect of cluster thinning and vineyard yields on grape and wine composition and wine quality of Cabernet Sauvignon. *American Journal of Enology and Viticulture* **1984**, *35*, 30-34.
- (50) Guidoni, S.; Ferrandino, A.; Novello, V. Effects of seasonal and agronomical practices on skin anthocyanin profile of Nebbiolo grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **2008**, *59*, 22-29.
- (51) Valdés, M.E.; Moreno, D.; Gamero, E.; Uriarte, D.; Prieto, M.D.H.; Manzano, R.; Picon, J.; Intrigliolo, D.S. Effects of cluster thinning and irrigation amount on water relations, growth, yield and fruit and wine composition of tempranillo grapes in

---

extremadura (Spain). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **2009**, *43*, 67-76.

(52) Gonzalo-Diago, A.; Avizcuri, J.M.; Ortigosa, N.; Dizey, M.; Martínez-Soria, M.T.; Sanz-Asensio, J.; Echavarrri-Granado, F.J.; Fernández-Zurbano, P. Prohexadione-Calcium as a Regulator of Vine Growth: Effect on the Physical-Chemical Characteristics of Wine Grapes, In *Grapes: Cultivation, Varieties and Nutritional Uses*, Ralph P. Murphy and Christopher K. Steifler, Ed.; Nova Science Publishers, Inc: **2012**; pp. 133-154.

(53) Keller, M.; Smithyman, R.P.; Mills, L.J. Interactive effects of deficit irrigation and crop load on cabernet sauvignon in an arid climate. *American Journal of Enology and Viticulture* **2008**, *59*, 221-234.

(54) Reynolds, A.G.; Molek, T.; De Savigny, C. Timing of shoot thinning in *Vitis vinifera*: Impacts on yield and fruit composition variables. *American Journal of Enology and Viticulture* **2005**, *56*, 343-356.

(55) Martínez de Toda, F.; Tardaguila, J. Meccanizzazione e fabbisogni di manodopera dei diversi sistemi di allevamento. In *Forme di allevamento della vite e modalità di distribuzione dei fitofarmaci*, Balsari, P. and Scienza, A., Eds.; Bayer CropScience: Milán, Italia, **2003**; pp. 143-158.

(56) Diago, M.P.; Vilanova, M.; Blanco, J.A.; Tardaguila, J. Effects of mechanical thinning on fruit and wine composition and sensory attributes of Grenache and Tempranillo varieties (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2010**, *16*, 314-326.

(57) Avizcuri-Inac, J.-.; Gonzalo-Diago, A.; Sanz-Asensio, J.; Martínez-Soria, M.-.; López-Alonso, M.; Dizey-Soto, M.; Echavarrri-Granado, J.-.; Vaquero-Fernández, L.; Fernández-Zurbano, P. Effect of cluster thinning and prohexadione calcium applications on phenolic composition and sensory properties of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 1124-1137.

(58) Vaquero-Fernandez, L.; Fernandez-Zurbano, P.; Sanz-Asensio, J.; Lopez-Alonso, M.; Martinez-Soria, M.T. Treatment of grapevines with prohexadione calcium as a growth regulator, the influence on production, winemaking and sensory characteristics of wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **2009**, *43*, 149-157.

(59) Tardaguila, J.; Petrie, P.R.; Poni, S.; Diago, M.P.; De Toda, F.M. Effects of mechanical thinning on yield and fruit composition of Tempranillo and Grenache grapes trained to a vertical shoot-positioned canopy. *American Journal of Enology and Viticulture* **2008**, *59*, 412-417.

(60) Wolf, T.K., Zoecklein, B.W., Cook, M.K., Cottingham, C.K. Shoot tipping and ethephon effects on white Riesling grapes and grapevines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1990**, *41*, 330-341.

- (61) Weyand, K.M.; Schultz, H.R. Regulating yield and wine quality of minimal pruning systems through the application of gibberellic acid. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **2006**, *40*, 151-163.
- (62) Petri, J.L.; Berenhauser-Leite, G.; Hawerroth, F.J.; Basso, C. Reduction of shoot growth and winter pruning in apple trees treated with prohexadione calcium. *Acta Horticulturae* **2011**, *903*, 873-877.
- (63) Evans, J.R.; Evans, R.R.; Regusci, C.L.; Rademacher, W. Mode of action, metabolism, and uptake of BAS 125W, prohexadione-calcium. *HortScience* **1999**, *34*, 1200-1201.
- (64) Graebe, J.E. Gibberellin biosynthesis and control. A review. *Annual Review of Plant Physiology* **1987**, *38*, 419-465.
- (65) Gosch, C.; Puhl, I.; Halbwirth, H.; Schlangen, K.; Roemmelt, S.; Andreotti, C.; Costa, G.; Fischer, T.C.; Treutter, D.; Stich, K.; Forkmann, G. Effect of prohexadione-Ca on various fruit crops: Flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. *European Journal of Horticultural Science* **2003**, *68*, 144-151.
- (66) Owens, C.L.; Stover, E. Vegetative growth and flowering of young apple trees in response to prohexadione-calcium. *HortScience* **1999**, *34*, 1194-1196.
- (67) Rademacher, W.; Kober, R. Efficient use of prohexadione-Ca in pome fruits. *European Journal of Horticultural Science* **2003**, *68*, 101-107.
- (68) Ilias, I.F.; Rajapakse, N. Prohexadione-calcium affects growth and flowering of petunia and impatiens grown under photosensitive films. *Scientia Horticulturae* **2005**, *106*, 190-202.
- (69) Disegna, E.; Disegna, E.; Boido, E.; Carrau, F.; Fariña, L.; Medina, K.; Méndez, M.; Rodríguez, P.; Dellacassa, E. Efectos de la aplicación del regulador de crecimiento 3,5-Dioxo-4-propionilciclohexancarboxilato de calcio (BAS 125) en la producción de uvas, composición del vino y aroma del cv. "Tannat". XIII Jornadas Groupe d'Étude des Systems de Conduite de la Vigne GESCO, **2003**, Montevideo, Uruguay.)
- (70) Lo Giudice, D.; Wolf, T.K.; Marini, R.P. Vegetative Response of *Vitis vinifera* to Prohexadione-calcium. *HortScience* **2003**, *38*, 1435-1438.
- (71) Lo Giudice, D.; Wolf, T.K.; Zoecklein, B.W. Effects of prohexadione-calcium on grape yield components and fruit and wine composition. *American Journal of Enology and Viticulture* **2004**, *55*, 73-83.
- (72) Koga, T.; Moro, K.; Nakamori, K.; Yamakoshi, J.; Hosoyama, H.; Kataoka, S.; Ariga, T. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 1892-1897.

- (73) Plumb, G.W.; De Pascual-Teresa, S.; Santos-Buelga, C.; Cheynier, V.; Williamson, G. Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation. *Free Radical Research* **1998**, *29*, 351-358.
- (74) Actis-Goretta, L.; Romanczyk, L.J.; Rodriguez, C.A.; Kwik-Urbe, C.; Keen, C.L. Cytotoxic effects of digalloyl dimer procyanidins in human cancer cell lines. *Journal of Nutritional Biochemistry* **2008**, *19*, 797-808.e2.
- (75) Renaud, S.; De Lorgeril, M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* **1992**, *339*, 1523-1526.
- (76) Shrikhande, A.J. Wine by-products with health benefits. *Food Research International* **2000**, *33*, 469-474.
- (77) Rasmussen, S.E.; Frederiksen, H.; Krogholm, K.S.; Poulsen, L. Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition and Food Research* **2005**, *49*, 159-174.
- (78) Murphy, K.J.; Chronopoulos, A.K.; Singh, I.; Francis, M.A.; Moriarty, H.; Pike, M.J.; Turner, A.H.; Mann, N.J.; Sinclair, A.J. Dietary flavanols and procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition* **2003**, *77*, 1466-1473.
- (79) Siddiqui, I.A.; Asim, M.; Hafeez, B.B.; Adhami, V.M.; Tarapore, R.S.; Mukhtar, H. Green tea polyphenol EGCG blunts androgen receptor function in prostate cancer. *FASEB Journal* **2011**, *25*, 1198-1207.
- (80) Santos-Buelga, C.; Scalbert, A. Proanthocyanidins and tannin-like compounds - Nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, *80*, 1094-1117.
- (81) Jackson, R.S. *Wine Science: Principles, Practice, Perception*. Academic press: San Diego, California, **2000**; pp. 665.
- (82) Monagas, M.; Bartolomé, B. Anthocyanins and Anthocyanin-Derived Compounds. In *Wine Chemistry and Biochemistry*, Moreno-Arribas, M.V. and Polo, M.C., Eds.; Springer: New York, **2009**; pp. 439-456.
- (83) Vidal, S.; Courcoux, P.; Francis, L.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Williams, P.; Waters, E.; Cheynier, V. Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference* **2004**, *15*, 209-217.
- (84) Cheynier, V.; Fulcrand, H.; Brossaud, F.; Asselin, C.; Moutounet, M. Phenolic composition as related to red wine flavor, In *Chemistry of Wine Flavor*, Andrew L. Waterhouse, Susan E. Ebeler, Ed.; American Chemical Society: California, Davis, **1998**; Vol.714 pp. 124-141.

- (85) Soares, S.; Kohl, S.; Thalmann, S.; Mateus, N.; Meyerhof, W.; De Freitas, V. Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 1525-1533.
- (86) Dadic, M.; Belleau, G. Proceedings of American Society of Brewing Chemists *American Society of Brewing Chemists* **1973**, 107.
- (87) Preys, S.; Mazerolles, G.; Courcoux, P.; Samson, A.; Fischer, U.; Hanafi, M.; Bertrand, D.; Cheynier, V. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *563*, 126-136.
- (88) Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 9190-9199.
- (89) Gawel, R. Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1998**, *4*, 73-95.
- (90) Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science and Food Agriculture* **1999**, *79*, 1123-1128.
- (91) Terrier, N., Poncet-Legrand, C., & Cheynier, V. Flavanols, Flavonols and Dihydroflavonols In *Wine Chemistry and Biochemistry* M.V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo, Ed.; Springer: New York, USA, **2009**; pp. 463-496.
- (92) Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E.J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science and Food Agriculture* **2003**, *83*, 564-573.
- (93) Santos-Buelga, C.; De Freitas, V. Influence of phenolics on wine organoleptic properties, In *Wine Chemistry and Biochemistry* M.V. Moreno-Arribas, & M. C. Polo, Ed.; Springer: New York, USA, **2009**; pp. 529-560.
- (94) Bradbury, J. Taste perception: Cracking the code. *PLoS Biology* **2004**, *2*,
- (95) Lopez, R.; Mateo-Vivaracho, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Optimization and validation of a taste dilution analysis to characterize wine taste. *Journal of Food Science* **2007**, *72*, S345-S351.
- (96) Thorngate III, J.H. The physiology of human sensory response to wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture* **1997**, *48*, 271-279.
- (97) Ough, C.S.; Amerine, M.A. *Methods for analysis of musts and wines*. New York, **1988**; pp. 377.

- (98) Viljakainen, S.; Visti, A.; Laakso, S. Concentrations of organic acids and soluble sugars in juices from nordic berries. *Acta Agriculturae Scandinavica Section B: Soil and Plant Science* **2002**, *52*, 101-109.
- (99) Krause M.V, M.L.K. *Food, nutrition and diet therapy*. WB Saunders Company: Philadelphia, **1998**; pp. 1360.
- (100) Zamora, M.C.; Goldner, M.C.; Galmarini, M.V. Sourness-sweetness interactions in different media: White wine, ethanol and water. *Journal of Sensory Studies* **2006**, *21*, 601-611.
- (101) Amerine, M.A.; Roessler, E.B. *Wines: Their sensory evaluation*. Freeman, W.H.: New York, **1983**; pp. 432.
- (102) Peynaud, E. *The taste of wine*. John Wiley and Sons: New York, **1996**.
- (103) Thorngate, J.H. Flavan-3-ols and their polymers in grapes and wines: chemical and sensory properties. *PhD dissertation. University of California, Davis*, **1992**.
- (104) Blackman, J.; Rutledge, D.N.; Tesic, D.; Saliba, A.; Scollary, G.R. Examination of the potential for using chemical analysis as a surrogate for sensory analysis. *Analytica. Chimica Acta* **2010**, *660*, 2-7.
- (105) Ebeler, S.E. Analytical chemistry: Unlocking the secrets of wine flavor. *Food Reviews International* **2001**, *17*, 45-64.
- (106) Margalit, Y. *Concepts in wine chemistry*. The Wine Appreciation Guild: San Francisco, CA, USA, **2004**; pp. 263.
- (107) Sass-Kiss, A.; Kiss, J.; Havadi, B.; Adányi, N. Multivariate statistical analysis of botrytised wines of different origin. *Food Chemistry* **2008**, *110*, 742-750.
- (108) Whiting, G.C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages-A review. *Journal of the Institute of Brewing* **1976**, *82*, 84-92.
- (109) Ribereau-Gayon, P. Botrytis, Advantages and disadvantages for producing quality wines. In: Proceedings of the 2nd International Symposium for Cool Climate Viticulture and Oenology (R. E. Smart et al., eds.), **1988**, pp. 319-323. New Zealand Society of Viticulture and Oenology, Auckland, New Zealand.
- (110) Ribereau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Handbook of Enology: Chemistry of Wine - Stabilization and Treatments v. 2: Stabilization and Treatments - The Chemistry of Wine* John Wiley & Sons Ltd: **2006**; pp. 450.
- (111) Nagel, C.W.; Herrick, I.W.; Graber, W.R. Is chlorogenic acid bitter. *Journal of Food Science* **1987**, *52*, 213-313.
- (112) Verette, E.; Noble, A.C.; Somers, T.C., Hydroxycinnamates of Vitis-vinifera - sensory assessment in relation to bitterness in white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1988**, *45*, 267-272.

- (113) Preys, S.; Mazerolles, G.; Courcoux, P.; Samson, A.; Fischer, U.; Hanafi, M.; Bertrand, D.; Cheynier, V. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 126-136.
- (114) Peleg, H.; Noble, A.C. Perceptual properties of benzoic acid derivatives. *Chemical Senses* **1995**, *20*, 393-400.
- (115) Hladik, C.M.; Simmen, B. Taste perception and feeding behavior in nonhuman primates and human populations. *Evolutionary Anthropology* **1996**, *5*, 58-71.
- (116) McBurney, D.H. Psychological dimensions and perceptual analyses of taste. In *Handbook of perception: tasting and smelling*. Carterette, E.C. and Friedman, M.P., Eds.; Academic Press: New York, **1978**; Vol.6A
- (117) Kim, U.K.; Breslin, P.A.S.; Reed, D.; Drayna, D. Genetics of human taste perception. *Journal of Dental Research* **2004**, *83*, 448-453.
- (118) Tepper, B.J.; White, E.A.; Koelliker, Y.; Lanzara, C.; D'Adamo, P.; Gasparini, P. Genetic variation in taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil and its relationship to taste perception and food selection. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**, *1170*, 126-139.
- (119) Bartoshuk, L.M.; Duffy, V.B.; Miller, I.J. PTC/PROP tasting. Anatomy, psychophysics, and sex effects. *Physiology and Behavior* **1994**, *56*, 1165-1171.
- (120) Drewnowski, A.; Henderson, S.A.; Hann, C.S.; Berg, W.A.; Ruffin, M.T. Genetic taste markers and preferences for vegetables and fruit of female breast care patients. *Journal of the American Dietetic Association* **2000**, *100*, 191-197.
- (121) Tepper, B.J.; Nurse, R.J. Fat perception is related to PROP taster status. *Physiology and Behavior* **1997**, *61*, 949-954.
- (122) Tepper, B.J.; Christensen, C.M.; Cao, J. Development of brief methods to classify individuals by PROP taster status. *Physiology and Behavior* **2001**, *73*, 571-577.
- (123) Mattes, R.D. Influences on acceptance of bitter foods and beverages. *Physiology and Behavior* **1994**, *56*, 1229-1236.
- (124) Guinard, J.X.; Zoumas-Morse, C.; Dietz, J.; Goldberg, S.; Holz, M.; Heck, E.; Amoros, A. Does consumption of beer, alcohol, and bitter substances affect bitterness perception? *Physiology and Behavior* **1996**, *59*, 625-631.
- (125) Fischer, U.; Noble, A.C. The Effect of Ethanol, Catechin Concentration, and pH on Sourness and Bitterness of Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **1994**, *45*, 6-10.
- (126) Arnold, R.A.; Noble, A.C.; Singleton, V.L. Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1980**, *28*, 675-678.



- (127) Robichaud, J.L.; Noble, A.C. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1990**, *52*, 343-353.
- (128) Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M.N. Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution. *Journal of Sensory Studies* **1997**, *12*, 25-37.
- (129) Singleton, V.L.; Noble, A.C. Wine flavor and phenolics substances, in *Advance in Food Research Suppl.* 3.vol. 26 (ed. C O Chichester). Washington, DC: American Chemical Society **1976**, 47-70.
- (130) Oberholster, A.; Francis, I.L.; Iland, P.G.; Waters, E.J. Mouthfeel of white wines made with and without pomace contact and added anthocyanins. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2009**, *15*, 59-69.
- (131) Leach, E.J.; Noble, A.C. Comparison of bitterness of caffeine and quinine by a time-intensity procedure. *Chemical Senses* **1986**, *11*, 339-345.
- (132) Sáenz-Navajas, M.P.; Ferreira, V.; Dizey, M.; Fernández-Zurbano, P. Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *673*, 151-159.
- (133) Boselli, E.; Boulton, R.B.; Thorngate, J.H.; Frega, N.G. Chemical and sensory characterization of DOC red wines from Marche (Italy) related to vintage and grape cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 3843-3854.
- (134) Breslin, P.A.S.; Gilmore, M.M.; Beauchamp, G.K.; Green, B.G. Psychophysical evidence that oral astringency is a tactile sensation. *Chemical Senses* **1993**, *18*, 405-417.
- (135) Vivas, N.; Glories, Y.; Lagune, L.; Saucier, C.; Augustin, M. Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au *p*-diméthylaminocinnamaldéhyde. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **1994**, *28*, 319-336.
- (136) Kallithraka, S.; Barker, J.; Clifford, M.N. Evidence that salivary proteins are involved in astringency. *Journal of Sensory Studies* **1998**, *13*, 29-43.
- (137) Green, B.G. Oral astringency: A tactile component of flavor. *Acta Psychologica* **1993**, *84*, 119-125.
- (138) Guinard, J.X.; Zoumas-Morse, C.; Walchak, C. Relation between parotid saliva flow and composition and the perception of gustatory and trigeminal stimuli in foods. *Physiology and Behavior* **1997**, *63*, 109-118.
- (139) Condelli, N.; Dinnella, C.; Cerone, A.; Monteleone, E.; Bertuccioli, M. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds II: Criteria for panel selection and preliminary application on wine samples. *Food Quality and Preference* **2006**, *17*, 96-107.

- (140) Varela, P.; Gámbaro, A. Sensory descriptive analysis of Uruguayan Tannat wine: Correlation to quality assessment. *Journal of Sensory Studies* **2006**, *21*, 203-217.
- (141) Lesschaeve, I.; Noble, A.C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, *81*, 330S-335S.
- (142) Sáenz-Navajas, M.P.; Martín-López, C.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2011**, *17*, 9-19.
- (143) Lattey, K.A.; Bramley, B.R.; Francis, I.L. Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2010**, *16*, 189-202.
- (144) Gawel, R.; Iland, P.G.; Francis, I.L. Characterizing the astringency of red wine: A case study. *Food Quality and Preference* **2001**, *12*, 83-94.
- (145) Gawel, R.; Oberholster, A.; Francis, I.L. A 'Mouth-feel Wheel': Terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2000**, *6*, 203-207.
- (146) Gawel, R.; Francis, L.; Waters, E.J. Statistical correlations between the in-mouth textural characteristics and the chemical composition of Shiraz wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 2683-2687.
- (147) Vidal, S.; Francis, L.; Noble, A.; Kwiatkowski, M.; Cheynier, V.; Waters, E. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 57-65.
- (148) DeMiglio, P., Pickering, G.J., and Reynolds, A.G. Astringent sub-qualities elicited by red wine: the role of ethanol and pH. In *Proceedings of the International Bacchus to The Future Conference*, Cullen, C.W., Pickering, G.J., and Phillips, R, Ed.; St Catharines, Ontario, **2002**; pp. 31-52.
- (149) Brossaud, F.; Cheynier, V.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2001**, *7*, 33-39.
- (150) Monteleone, E.; Condelli, N.; Dinnella, C.; Bertuccioli, M. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference* **2004**, *15*, 761-769.
- (151) Landon, J.L.; Weller, K.; Harbertson, J.F.; Ross, C.F. Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington State red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2008**, *59*, 153-158.
- (152) Chira, K.; Pacella, N.; Jourdes, M.; Teissedre, P.L. Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1971-1977.

- (153) Sáenz-Navajas, M.P.; Avizcuri, J.M.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chemistry* **2012**, *134*, 1484-1493.
- (154) Jones, P.R.; Gawel, R.; Francis, I.L.; Waters, E.J. The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 596-607.
- (155) Quijada-Morín, N.; Regueiro, J.; Simal-Gándara, J.; Tomás, E.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12355-12361.
- (156) Wollmann, N.; Hofmann, T. Compositional and sensory characterization of red wine polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 2045-2061.
- (157) Ishikawa, T.; Noble, A.C. Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality and Preference* **1995**, *6*, 27-33.
- (158) Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 1376-1386.
- (159) Harbertson, J.F.; Picciotto, E.A.; Adams, D.O. Measurement of Polymeric Pigments in Grape Berry Extracts and Wines Using a Protein Precipitation Assay Combined with Bisulfite Bleaching. *American Journal of Enology and Viticulture* **2003**, *54*, 301-306.
- (160) Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, J.M.; Rozés, N.; Arola, L.; Zamora, F. New Method for Evaluating Astringency in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 742-746.
- (161) Cliff, M.A.; King, M.C.; Schlosser, J. Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International* **2007**, *40*, 92-100.
- (162) Jaffré, J.; Valentin, D.; Dacremont, C.; Peyron, D. Burgundy red wines: Representation of potential for aging. *Food Quality and Preference* **2009**, *20*, 505-513.
- (163) Naish, M.; Clifford, M.N.; Birch, G.G. Sensory astringency of 5-O-Caffeoylquinic acid, tannic acid and grade-seed tannin by a time-intensity procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1993**, *61*, 57-64.
- (164) Sowalsky, R.A.; Noble, A.C. Comparison of the effects of concentration, pH and anion species on astringency and sourness of organic acids. *Chemical Senses* **1998**, *23*, 343-349.
- (165) Rubico, S.M.; McDaniel, M.R. Sensory evaluation of acids by free-choice profiling. *Chemical Senses* **1992**, *17*, 273-289.

- 
- (166) Lawless, H.T.; Horne, J.; Giasi, P. Astringency of organic acids is related to pH. *Chemical Senses* **1996**, *21*, 397-403.
- (167) Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 3498-3508.
- (168) Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P.L.; Glories, Y. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 286-291.
- (169) Smith, A.K.; June, H.; Noble, A.C. Effects of viscosity on the bitterness and astringency of grape seed tannin. *Food Quality and Preference* **1996**, *7*, 161-166.
- (170) Smith, A.K.; Noble, A.C. Effects of increased viscosity on the sourness and astringency of aluminum sulfate and citric acid. *Food Quality and Preference* **1998**, *9*, 139-144.
- (171) Gawel, R.; Van Sluyter, S.; Waters, E.J. The effects of ethanol and glycerol on the body and other sensory characteristics of Riesling wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2007**, *13*, 38-45.
- (172) Runnebaum, R.C.; Boulton, R.B.; Powell, R.L.; Heymann, H. Key constituents affecting wine body - an exploratory study. *Journal of Sensory Studies* **2011**, *26*, 62-70.
- (173) Obreque-Sl ier, E.; Peña-Neira,  .; López-Solís, R. Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 3729-3735.
- (174) Fischer, U.; Boulton, R.B.; Noble, A.C. Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Quality and Preference* **1994**, *5*, 55-64.
- (175) Meillon, S.; Viala, D.; Medel, M.; Urbano, C.; Guillot, G.; Schlich, P. Impact of partial alcohol reduction in Syrah wine on perceived complexity and temporality of sensations and link with preference. *Food Quality and Preference* **2010**, *21*, 732-740.
- (176) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Fern andez-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 1139-1149.
- (177) Tardaguila, J.; Diago, M.P.; De Martinez Toda, F.; Poni, S.; Vilanova, M. Effects of timing of leaf removal on yield, berry maturity, wine composition and sensory properties of CV. grenache grown under non irrigated conditions. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **2008**, *42*, 221-229.
- (178) Medel, M., Viala, D., Meillon, S., Urbano, C., Schlich, P. A questionnaire for assessing the perceived complexity of wine: Application to the study of the effect of expertise on perception of wine complexity, oral presentation, 8<sup>th</sup> Pangborn Sensory Science Symposium, Florence, Italy, 26–30 July: Elsevier. **2009**.
-

- (179) Sancho, J., Bota, E.; De Castro, J.J. *Introducción Al Análisis Sensorial de Alimentos*. Edicions Universitat de Barcelona, Barcelona, España. **1999**, pp.336.
- (180) Hewson, L.; Hollowood, T.; Chandra, S.; Hort, J. Taste-aroma interactions in a citrus flavoured model beverage system: Similarities and differences between acid and sugar type. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 323-334.
- (181) Pfeiffer, J.C.; Hort, J.; Hollowood, T.A.; Taylor, A.J. Taste-aroma interactions in a ternary system: A model of fruitiness perception in sucrose/acid solutions. *Perception and Psychophysics* **2006**, *68*, 216-227.
- (182) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Culleré, L.; Fernández-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 5574-5585.
- (183) Fujimaru, T.; Lim, J. Effects of stimulus intensity on odor enhancement by taste. *Chemosensory Perception* **2013**, *6*, 1-7.
- (184) Dufour, C.; Bayonove, C.L. Influence of wine structurally different polysaccharides on the volatility of aroma substances in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 671-677.
- (185) Dufour, C.; Bayonove, C.L. Interactions between wine polyphenols and aroma substances. An insight at the molecular level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 678-684.
- (186) Jung, D.M.; De Ropp, J.S.; Ebeler, S.E. Study of interactions between food phenolics and aromatic flavors using one- and two-dimensional <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 407-412.
- (187) Ferreira, V.; Jarauta, I.; López, R.; Cacho, J. Quantitative determination of sotolon, maltol and free furaneol in wine by solid-phase extraction and gas chromatography-ion-trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1010*, 95-103.
- (188) Aronson, J.; Ebeler, S.E. Effect of polyphenol compounds on the headspace volatility of flavors. *American Journal of Enology and Viticulture* **2004**, *55*, 13-21.
- (189) Keast, R.S.J.; Canty, T.M.; Breslin, P.A.S. The influence of sodium salts on binary mixtures of bitter-tasting compounds. *Chemical Senses* **2004**, *29*, 431-439.
- (190) Lawless, H.T. Evidence for neural inhibition in bittersweet taste mixtures. *Journal of Comparative Physiological Psychology* **1979**, *93*, 538-547.
- (191) Rochman, D.; Guinard, J.X.; O'Mahony, M. Eliminating artifacts in the study of singularity/mixedness of taste stimuli. *Journal of Sensory Studies* **1997**, *12*, 181-193.
- (192) Frank, R.A.; Mize, S.J.S.; Carter, R. An assessment of binary mixture interactions for nine sweeteners. *Chemical Senses* **1989**, *14*, 621-632.

- (193) Frank, R.A.; van der Klaauw, N.J.; Schifferstein, H.N.J. Both perceptual and conceptual factors influence taste-odor and taste-taste interactions. *Perception and Psychophysics* **1993**, *54*, 343-354.
- (194) Bartoshuk, L.M. The biological basis of food perception and acceptance. *Food Quality and Preference* **1993**, *4*, 21-32.
- (195) Ares, G.; Barreiro, C.; Deliza, R.; Gámbaro, A. Alternatives to reduce the bitterness, astringency and characteristic flavour of antioxidant extracts. *Food Research International* **2009**, *42*, 871-878.
- (196) Brannan, G.D.; Setser, C.S.; Kemp, K.E. Interaction of astringency and taste characteristics. *Journal of Sensory Studies* **2001**, *16*, 179-197.
- (197) Valentová, H.; Skrovánková, S.; Panovská, Z.; Pokorný, J. Time-intensity studies of astringent taste. *Food Chemistry* **2002**, *78*, 29-37.
- (198) Tang, X.; Kälviäinen, N.; Tuorila, H. Sensory and Hedonic Characteristics of Juice of Sea Buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) Origins and Hybrids. *LWT - Food Science and Technology* **2001**, *34*, 102-110.
- (199) Tiitinen, K.M.; Hakala, M.A.; Kallio, H.P. Quality components of sea buckthorn (*Hippophaë rhamnoides*) varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 1692-1699.
- (200) Noble, A.C. Why Do Wines Taste Bitter and Feel Astringent? *ACS Symposium Series* **1998**, *714*, 156-165.
- (201) Noble, A.C. Bitterness in wine. *Physiology and Behavior* **1994**, *56*, 1251-1255.
- (202) Scharbert, S.; Hofmann, T. Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 5377-5384.
- (203) Siebert, K.J.; Euzen, C. The relationship between expectorant ph and astringency perception. *Journal of Sensory Studies* **2008**, *23*, 222-233.
- (204) Bonnans, S.; Noble, A.C. Effect of sweetener type and of sweetener and acid levels on temporal perception of sweetness, sourness and fruitiness. *Chemical Senses* **1993**, *18*, 273-283.
- (205) Prescott, J. Flavour as a psychological construct: Implications for perceiving and measuring the sensory qualities of foods. *Food Quality and Preference* **1999**, *10*, 349-356.
- (206) Zamora, M.C.; Guirao, M. Analysing the contribution of orally perceived attributes to the flavor of wine. *Food Quality and Preference* **2002**, *13*, 275-283.

- (207) Clark, C.C.; Lawless, H.T. Limiting response alternatives in time-intensity scaling: An examination of the halo-dumping effect. *Chemical Senses* **1994**, *19*, 583-594.
- (208) Van Der Klaauw, N.J.; Frank, R.A. Scaling component intensities of complex stimuli: The influence of response alternatives. *Environment International* **1996**, *22*, 21-31.
- (209) Lawless, H.T.; Heymann, H. *Sensory Evaluation of Food. Principles and practices*. Springer-Verlag: New York, **2010**; pp. 619.
- (210) Ribereau-Gayon, P. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique* **1970**, *52*, 627-631.
- (211) Sun, B.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Spranger, I. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 4267-4274.
- (212) Ribereau-Gayon, P.; Stonestreet, E. Le dosage des anthocyanes dans le vin rouge. *Bulletin de la Société Chimique de France* **1965**, *9*, 2649-2652.
- (213) Haslam, E. In *Vino Veritas: Oligomeric procyanidins and the ageing of red wines*. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2577-2582.
- (214) Kantz, K.; Singleton, V.L. Isolation and determination of polymeric polyphenols in wines using Sephadex LH-20. *American Journal of Enology and Viticulture* **1991**, *42*, 309-316.
- (215) Gu, L.; Kelm, M.A.; Hammerstone, J.F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R.L. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LCMS/MS and thiolytic degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 7513-7521.
- (216) Sanchez-Moreno, C.; Cao, G.; Ou, B.; Prior, R.L. Anthocyanin and proanthocyanidin content in selected white and red wines. Oxygen radical absorbance capacity comparison with nontraditional wines obtained from highbush blueberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 4889-4896.
- (217) Sarni-Manchado, P.; Deleris, A.; Avallone, S.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. *American Journal of Enology and Viticulture* **1999**, *50*, 81-86.
- (218) Remy, S.; Fulcrand, H.; Labarbe, B.; Cheynier, V.; Moutounet, M. First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2000**, *80*, 745-751.
- (219) Atanasova, V.; Fulcrand, H.; Cheynier, W.; Moutounet, M. Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta* **2002**, *458*, 15-27.

- (220) Guadalupe, Z.; Soldevilla, A.; Sáenz-Navajas, M.P.; Ayestarán, B. Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel permeation chromatography fractionation. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112*, 112-120.
- (221) Sun, B.; Leandro, M.C.; de Freitas, V.; Spranger, M.I. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1128*, 27-38.
- (222) Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo Da Silva, J.M. Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 6475-6481.
- (223) Oszmianski, J.; Ramos, T.; Bourzeix, M. Fractionation of phenolic compounds in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **1988**, *39*, 259-262.
- (224) Sun, B.; Leandro, C.; Ricardo Da Silva, J.M.; Spranger, I. Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 1390-1396.
- (225) Pinelo, M.; Laurie, V.F.; Waterhouse, A.L. A simple method to separate red wine nonpolymeric and polymeric phenols by solidphase extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 2839-2844.
- (226) Lea, A.G.H. The phenolics of ciders: oligomeric and polymeric procyanidins. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1978**, *29*, 471-478.
- (227) Rigaud J, Escribano-Bailon MY, Prieur C, Souquet JM, Cheynier V. Normal-phase high performance liquid chromatographic separation of proanthocyanidins from cacao beans and grape seeds. *Journal of Chromatography A* **1993**, *654*, 255-260.
- (228) Yanagida, A.; Kanda, T.; Takahashi, T.; Kamimura, A.; Hamazono, T.; Honda, S. Fractionation of apple procyanidins according to their degree of polymerization by normal-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2000**, *890*, 251-259.
- (229) Hanlin, R.L.; Kelm, M.A.; Wilkinson, K.L.; Downey, M.O. Detailed characterization of proanthocyanidins in skin, seeds, and wine of Shiraz and Cabernet Sauvignon wine grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 13265-13276.
- (230) Putman, L.J.; Butler, L.G. Fractionation of condensed tannins by counter-current chromatography. *Journal of Chromatography A* **1985**, *318*, 85-93.
- (231) Kelm, M.A.; Johnson, J.C.; Robbins, R.J.; Hammerstone, J.F.; Schmitz, H.H. High-performance liquid chromatography separation and purification of cacao (*Theobroma cacao* L.) procyanidins according to degree of polymerization using a diol stationary phase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 1571-1576.



- (232) Khanal, R.C.; Howard, L.R.; Prior, R.L. Procyanidin Content of Grape Seed and Pomace, and Total Anthocyanin Content of Grape Pomace as Affected by Extrusion Processing. *Journal of Food Science* **2009**, *74*, H174-H182.
- (233) Rigaud, J.; Perez-Illzarbe, J.; Ricardo da Silva, J.M.; Cheynier, V. Micro method for the identification of proanthocyanidin using thiolysis monitored by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* **1991**, *540*, 401-405.
- (234) Hammerstone, J.F.; Lazarus, S.A.; Mitchell, A.E.; Rucker, R.; Schmitz, H.H. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 490-496.
- (235) Waterhouse, A.L.; Ignelzi, S.; Shirley, J.R. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. *American Journal of Enology and Viticulture* **2000**, *51*, 383-389.
- (236) Pati, S.; Losito, I.; Gambacorta, G.; La Notte, E.; Palmisano, F.; Zambonin, P.G. Simultaneous separation and identification of oligomeric procyanidins and anthocyanin-derived pigments in raw red wine by HPLC-UV-ESI-MSn. *Journal of Mass Spectrometry* **2006**, *41*, 861-871.
- (237) Thompson, R.S.; Jacques, D.; Haslam, E.; Tanner, R.J.N. Plant proanthocyanidins. Part I. Introduction; the isolation, structure, and distribution in nature of plant procyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **1972**, 1387-1399.
- (238) Foo, L.Y.; Porter, L.J. Prodelphinidin polymers: Definition of structural units. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions I* **1978**, 1186-1190.
- (239) Jorgensen, E.M.; Marin, A.B.; Kennedy, J.A. Analysis of the Oxidative Degradation of Proanthocyanidins under Basic Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 2292-2296.
- (240) Kennedy, J.A.; Jones, G.P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 1740-1746.
- (241) Gu, L.; Kelm, M.; Hammerstone, J.F.; Beecher, G.; Cunningham, D.; Vannozzi, S.; Prior, R.L. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 4852-4860.
- (242) Yokota, K.; Kimura, H.; Ogawa, S.; Akihiro, T. Analysis of A-type and B-type highly polymeric proanthocyanidins and their biological activities as nutraceuticals. *Journal of Chemistry* **2013**,
- (243) Quijada-Morín, N.; Williams, P.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Doco, T.; Escribano-Bailón, M.T. Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of

---

Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry* **2014**, *154*, 44-51.

(244) Karas, M.; Bahr, U.; Gießmann, U. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews* **1991**, *10*, 335-357.

(245) Ishida, Y.; Kitagawa, K.; Goto, K.; Ohtani, H. Solid sampling technique for direct detection of condensed tannins in bark by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2005**, *19*, 706-710.

(246) Xiang, P.; Lin, Y.; Lin, P.; Xiang, C. Effects of Adduct Ions on Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry of Condensed Tannins: A Prerequisite Knowledge. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2006**, *34*, 1019-1022.

(247) Mané, C.; Sommerer, N.; Yalcin, T.; Cheynier, V.; Cole, R.B.; Fulcrand, H. Assessment of the molecular weight distribution of tannin fractions through MALDI-TOF MS analysis of protein-tannin complexes. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 2239-2248.

(248) Karas, M.; Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons [1]. *Analytical Chemistry* **1988**, *60*, 2299-2301.

(249) Dreisewerd, K. The desorption process in MALDI. *Chemical Reviews* **2003**, *103*, 395-425.

(250) Berkers, C.R.; Verdoes, M.; Lichtman, E.; Fiebiger, E.; Kessler, B.M.; Anderson, K.C.; Ploegh, H.L.; Ovaa, H.; Galaray, P.J. Activity probe for in vivo profiling of the specificity of proteasome inhibitor bortezomib. *Nature Methods* **2005**, *2*, 357-362.

(251) Juhasz, P.; Costello, C.E.; Biemann, K. Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry with 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid matrix. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **1993**, *4*, 399-409.

(252) Carpentieri, A.; Marino, G.; Amoresano, A. Rapid fingerprinting of red wines by MALDI mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2007**, *389*, 969-982.

(253) Nunes-Miranda, J.D.; Santos, H.M.; Reboiro-Jato, M.; Fdez-Riverola, F.; Igrejas, G.; Lodeiro, C.; Capelo, J.L. Direct matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry-based analysis of wine as a powerful tool for classification purposes. *Talanta* **2012**, *91*, 72-76.

(254) Chambery, A.; del Monaco, G.; Di Maro, A.; Parente, A. Peptide fingerprint of high quality Campania white wines by MALDI-TOF mass spectrometry. *Food Chemistry* **2009**, *113*, 1283-1289.

(255) Ivanova, V.; Dörnyei, Á.; Stefova, M.; Stafilov, T.; Vojnoski, B.; Kilár, F.; Márk, L. Rapid MALDI-TOF-MS Detection of Anthocyanins in Wine and Grape Using Different Matrices. *Food Analytical Methods* **2011**, *4*, 108-115.



# **CAPITULO 1.**

## **CARACTERIZACIÓN DE PROANTOCIANIDINAS EN VINO MEDIANTE MALDI-TOF MS.**





## 1.1. ANTECEDENTES

Las proantocianidinas (PAs) o taninos condensados son polímeros formados por unidades de flavan-3-oles. En las uvas, estos compuestos, tanto monómeros como polímeros se encuentran mayoritariamente en los hollejos y en las semillas. La presencia de estos compuestos en los vinos es debida a la extracción que tiene lugar durante la vinificación. Así, si no se ha realizado un despalillado previo, el raspón también puede aportar proantocianidinas al vino final.<sup>1,2</sup> Los flavanoles juegan un papel muy importante en los vinos debido a su elevada reactividad, participando en reacciones de polimerización, condensación y oxidación<sup>3,4</sup>, además de aportar astringencia, amargor y cuerpo a los vinos. Por otra parte, las proantocianidinas están implicadas en la calidad de los vinos ya que son responsables de propiedades organolépticas tales como la astringencia<sup>5,6</sup>, participando también durante el envejecimiento en la estabilidad del color de los vinos.<sup>1</sup>

La estructura de las proantocianidinas varía de acuerdo a la hidroxilación de los anillos A y B, a la estereoquímica de los carbonos C2, C3 y C4 del anillo central, y a las uniones que tienen lugar entre flavanoles. Los flavanoles pueden también encontrarse esterificados con el ácido gálico.<sup>7,8</sup> Las proantocianidinas constituidas exclusivamente por (epi)catequina se designan como procianidinas (PC) mientras que las que contienen (epi)galocatequina son denominadas prodelfinidinas (PD). Estas últimas suelen estar también unidas a las procianidinas. Los taninos presentes en las semillas de las uvas están únicamente compuestos por procianidinas<sup>9,10</sup>, mientras que los taninos de los hollejos presentan tanto procianidinas como prodelfinidinas.<sup>9,11</sup> Uniones de dos a cinco unidades de monómeros reciben el nombre de oligómeros mientras que son considerados polímeros cadenas largas de más de cinco unidades de monómeros.<sup>12</sup>

Debido a la diversidad y a la complejidad estructural de las proantocianidinas, el análisis y la caracterización de éstas resulta una tarea difícil.<sup>13</sup> Así, a medida que aumenta el peso molecular alcanzando un grado de polimerización mayor de cuatro, el número posible de regio y estereoisómeros se incrementa tanto que resulta muy difícil la separación mediante cromatografía líquida en fase reversa. Sin embargo, esta técnica puede ser aplicada para la identificación de unidades terminales y de extensión de proantocianidinas una vez aplicada la reacción de depolimerización de éstas en

presencia de un agente nucleófilo tal como el floroglucinol<sup>14</sup> o el tolueno  $\alpha$ -tiol.<sup>15</sup> Esta reacción, entre otros parámetros, permite determinar el grado medio de polimerización (mDP) de las muestras. Muchos estudios han utilizado esta reacción para conocer el grado medio de polimerización de proantocianidinas en semillas de uva<sup>5,9,16</sup> (mDP = 2.8 – 17.4), en hollejos de uva<sup>9,17</sup> (mDP = 3.8 – 81.0) y en vinos<sup>9,18-20</sup> (**Tabla 1.1**).

**Tabla 1.1.** Datos de polimerización, porcentaje de galatos y de prodelfinidinas encontrados en vinos elaborados con distintas variedades de uva tinta.

Variedad	Grado medio de polimerización (mDP)	Porcentaje de galatos (%)	Porcentaje de prodelfinidinas (%)	Referencias
Tempranillo	13	2.8	11.3	Monagas y col. <sup>16</sup>
Graciano	6.9	2.8	8.2	
Cabernet Sauvignon	9.0	3.4	10.6	
Cabernet Sauvignon	2.7 – 6.6	4.1 – 8.9	13.3 – 29.2	Cosme y col. <sup>17</sup>
Syrah	2.2 – 8.1	1.3 – 9.5	15.1 – 22.6	
Cabernet Sauvignon	1.8 – 7.13	0.88 – 6.38	8.73 – 28.01	Chira y col. <sup>21</sup>
Merlot	1.25 – 3.43	1.42 – 3.65	4.3 – 19.7	
Syrah	10.3	5.1	19.5	Maury y col. <sup>22</sup>
Merlot	5.8	8.3	12.8	
Tinta Miuda	3.7 – 15.6	1.8 – 8.3	-----	Sun y col. <sup>18</sup>
Tinta Miuda	4.8 – 22.1	3 – 7.3	-----	Sun y col. <sup>23</sup>
Mezcla de: Merlot, Cabernet Sauvignon, Cabernet Franc	5.8 – 10.1	8.4 – 17.3	-----	Wollmann y col. <sup>19</sup>

Las líneas discontinuas (----) dentro de las casillas indican que el porcentaje de prodelfinidinas no ha sido calculado en esos trabajos.

La cromatografía líquida en fase normal también se ha aplicado en la separación de proantocianidinas en función del grado de polimerización tanto en plantas como en alimentos, consiguiéndose una buena separación hasta un grado de polimerización de diez unidades.<sup>24,25</sup> No obstante, en una matriz como el vino, aun no ha sido posible una cuantitativa y completa separación en función del grado de polimerización. Esto es debido a la complejidad de la muestra, ya que contiene además de procianidinas galoiladas y no galoiladas, prodelfinidinas.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica adecuada ya que permite estimar la distribución de la masa molecular de proantocianidinas heterogéneas en mezclas complejas. La ionización mediante electrospray (ESI) proporciona especies

aniónicas y catiónicas con mínima o nula fragmentación y por lo tanto ha sido ampliamente utilizada en la caracterización de este tipo de compuestos en diversos alimentos.<sup>20,26,27</sup> Sin embargo, este método de ionización no resulta adecuado para el análisis de proantocianidinas altamente polidispersas debido a la generación de iones multi-cargados los cuales dificultan la interpretación de los espectros.

La técnica de espectrometría de masas MALDI-TOF, (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo), denotada así por sus siglas en inglés, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight* es una técnica altamente sensible y muy adecuada para el análisis de mezclas complejas sin necesidad de una separación previa mediante cromatografía líquida. Además, permite la detección de iones moleculares intactos ( $MNa^+$ ,  $MK^+$ , o  $MH^+$ ) con una gran precisión y en un amplio rango de masas.<sup>28</sup> MALDI-TOF MS se ha aplicado en la determinación estructural de los taninos ya que proporciona una amplia información (naturaleza de la unidad básica, presencia de galoilación, presencia de prodelfinidinas y rango de masas). Cabe destacar que esta técnica presenta diversas ventajas sobre la espectrometría de masas con ESI, como por ejemplo, una mejor tolerancia ante la presencia de impurezas, la detección predominante de iones moleculares mono-cargados y la posibilidad de reanalizar la muestra. A pesar de la utilidad que parece tener esta técnica son pocos los trabajos que se han realizado utilizando MALDI-TOF para el análisis de proantocianidinas en una matriz como es el vino<sup>19</sup>, no existiendo hasta el momento ningún trabajo en vino en el que se compare el grado medio de polimerización calculado a partir de los datos de los espectros de masas y el calculado a partir de la reacción de tiólisis. Por ello, se ha planteado esta investigación que tiene como objetivo evaluar la técnica de MALDI-TOF MS para la determinación del grado medio de polimerización de PAs presentes en vinos tintos comerciales. Además, mediante este estudio se pretende comparar el grado medio de polimerización observado mediante esta técnica y el obtenido a partir de la reacción de tiólisis. También se ha llevado a cabo el análisis sensorial de estos vinos con el fin de evaluar la influencia del grado de polimerización y de la composición proantocianica analizada en las cualidades organolépticas de los vinos.

## 1.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.2.1. Reactivos

Todos los disolventes utilizados fueron de grado HPLC. Todos los compuestos químicos utilizados fueron de pureza analítica. El agua ultrapura fue obtenida a partir del sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia). El gel TSK Toyopearl HW-50F fue suministrado por TosoHaas (Montgomeryville, PA, U.S.A). Los disolventes metanol, ácido fórmico, etanol, acetonitrilo y ácido sulfúrico fueron adquiridos en Scharlab (Barcelona, España). El sulfato de quinina 2-hidrato (98%) fue obtenido en Alfa Aesor (Karlsruhe, Alemania). El ácido tartárico y el sulfato de potasio y aluminio fueron adquiridos en Panreac (Barcelona, España). Catequina, vainillina, ácido clorhídrico, carbonato de cesio, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y el polietilenglicol 2000 (PEG 2000) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). El ácido trifluoroacético (TFA) fue suministrado por Fluka (Buchs, Suiza).

### 1.2.2. Muestras

En este estudio se utilizaron un total de 26 vinos tintos españoles comerciales elaborados con distintas variedades de uva y procedentes de diversas zonas vitivinícolas. La selección de estos vinos se realizó teniendo en cuenta su etapa de maduración, vinos de las añadas 2007 y 2008, jóvenes, y vinos con permanencia en bodega entre 15 y 24 meses comprendidos entre las añadas 1990 a 2005. En la **Tabla 1.2** se muestra la información referente a los vinos seleccionados. Los análisis de las muestras se llevaron a cabo en noviembre y diciembre de 2008.



**Tabla 1.2.** Origen de procedencia, variedades, añadas y meses de crianza en barrica de las muestras de vinos tintos estudiadas.

Vinos	Origen de procedencia	Variedades de uva	Añada	Crianza en barrica (meses)
W1	Penedés	Cabernet Sauvignon 85 %, Cabernet Franc 15 %	1990	24
W2	Ribera de Duero	Tempranillo 90 %, Cabernet Sauvignon 10 %	1999	15
W3	Jumilla	Monastrell	2000	18
W4	Baleares	Negra Mol	2000	16
W5	Rioja	Garnacha, Tempranillo, Mazuelo, Graciano	2001	16
W6	Ribera de Duero	Tempranillo	2002	15
W7	Vallegarcía	Cabernet Sauvignon 80 %, Merlot 20 %	2002	16
W8	Priorat	Mazuelo 55 %, Garnacha 35 %, Syrah 10 %	2002	13
W9	Ribera de Duero	Tempranillo 90 %, Cabernet Sauvignon 10 %	2003	18
W10	Monsant	Mazuelo 50 %, Syrah 50 %	2003	16
W11	Rioja	Tempranillo 100 %	2003	18
W12	Rioja	Tempranillo 70 %, Garnacha 20 % y otros	2003	24
W13	Ribera de Duero	Tempranillo	2004	14
W14	Bierzo	Mencía	2004	15
W15	Rioja	Tempranillo 80 %, Graciano 15 %, Garnacha 5 %	2004	16
W16	Rioja	Tempranillo	2004	20
W17	Rioja	Graciano	2004	24
W18	Somontano	Syrah	2005	16
W19	Cariñena	Syrah	2005	14
W20	Calatayud	Garnacha 94 %, Merlot 6 %	2005	13
W21	Ribera de Duero	Tempranillo 100 %	2005	15
W22	Rioja	Tempranillo 100 %	2007	0
W23	Rioja	Tempranillo 100 %	2007	0
W24	Rioja	Tempranillo 100 %	2008	0
W25	Rioja	Tempranillo 100 %	2008	0
W26	Rioja	Garnacha 100 %	2008	0

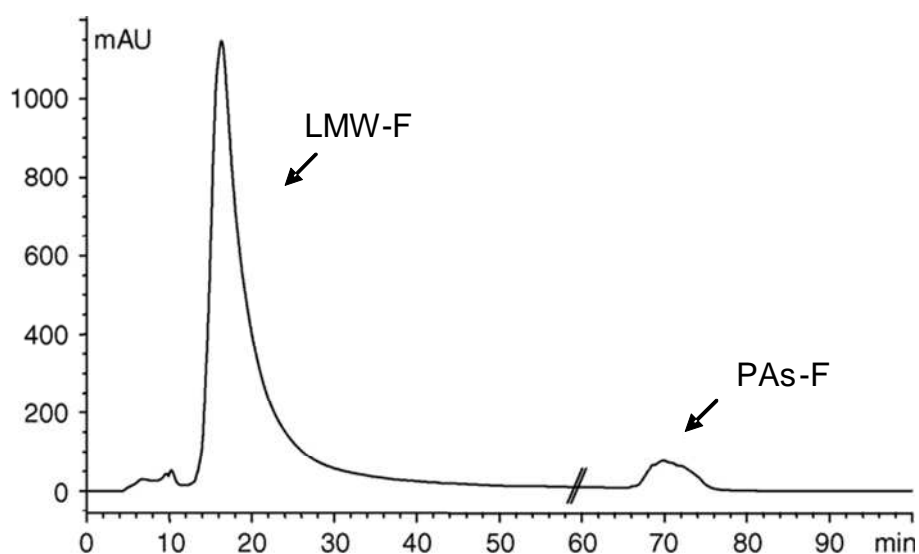
### 1.2.3. Preparación de la muestra

#### 1.2.3.1. Fraccionamiento de los vinos

La fracción proantocianica (PAs-F) se obtuvo por elución en una columna Millipore (Bedford, M.A, U.S.A) Vantage L (120 x 12 mm i.d.) empaquetada a presión atmosférica con el gel TSK HW-50F siguiendo el método descrito por Guadalupe y col.<sup>29</sup> La elución de los compuestos se confirmó conectando la salida de la columna a un detector de fila de diodos (Agilent, G1315B) (Waldbronn, Alemania).

Dos mililitros de vino se inyectaron directamente en la columna y la velocidad de flujo fue regulada a 1 mL/min mediante una bomba peristáltica. Una primera fracción, que contenía los compuestos de bajo peso molecular (LMW-F), fue eluída con 60 mL de una mezcla de etanol/agua/ácido trifluoroacético (55:45:0.05, v/v/v).

La segunda fracción, la cual contenía el material proantocianínico (PAs-F), se recuperó por elución con 50 mL de una mezcla de acetona/agua (60:40, v/v). La **Figura 1.1** muestra el cromatograma obtenido mediante cromatografía de permeación en gel donde se observa la elución de las dos fracciones por separado. La fracción proantocianínica (PAs-F) fue evaporada, liofilizada y posteriormente disuelta en 2 mL de metanol para su posterior análisis. Todos los vinos fueron fraccionados por duplicado y filtrados por 0.45  $\mu\text{m}$  antes del análisis. Las muestras fueron conservadas a 4 °C para sus posteriores análisis.



**Figura 1.1.** Cromatograma obtenido mediante cromatografía de permeación en gel y adquirido a 515 nm en el que se observa la elución de ambas fracciones.

## 1.2.4. Análisis de parámetros enológicos en vinos

### 1.2.4.1. Azúcares reductores, pH, acidez total y grado alcohólico

Los parámetros enológicos convencionales de los vinos, como el contenido en azúcares reductores, alcohol, pH y acidez total se determinaron mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IRTF) con el equipo WineScan<sup>TM</sup> FT 120 (FOSS<sup>®</sup>, Barcelona, España), previamente calibrado de acuerdo a los métodos oficiales de la OIV.<sup>30</sup>

#### 1.2.4.2. Color

La intensidad colorante (IC) fue calculada como la suma de las absorbancias a 420 nm, 520 nm y 620 nm y multiplicada por 10 ya que las medidas se realizaron en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico. La tonalidad (T) se calculó como el cociente entre la absorbancia a 420 nm y la absorbancia a 520 nm.<sup>31</sup>

### 1.2.5. Análisis de proantocianidinas en la fracción a estudio

#### 1.2.5.1. Análisis cualitativo de proantocianidinas con MALDI-TOF MS

La determinación cualitativa de las proantocianidinas se llevó a cabo mediante una técnica rápida de espectrometría de masas de ionización suave denominada MALDI-TOF.

El equipo utilizado fue el MicroFlex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania), equipado con un láser de nitrógeno ( $\lambda = 337$  nm) y dotado con un analizador de tiempo de vuelo tipo reflector y lineal. La adquisición y el tratamiento de datos se llevaron a cabo utilizando el programa *Compass for Flex series 1.2. Flex control*, versión 3.0 se utilizó en la adquisición y *Flex análisis* versión 3.0 para el tratamiento de datos.

La matriz utilizada para el análisis de proantocianidinas presentes en las muestras fue el DHB (ácido 2,5- dihidroxibenzoico) y la placa portamuestras empleada fue la MSP 96 *target ground steel* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). La disolución matriz se preparó a una concentración de 10 mg/L en acetona. La relación muestra/matriz fue de 2:10, (v/v). Posteriormente, 0.5  $\mu$ L de la mezcla se depositaron en la placa de MALDI y se secaron al aire. El análisis fue realizado en modo positivo. El espectro fue adquirido en modo reflector y en un rango de masas de 800 - 4060 Da con supresión hasta 800 Da y variando la potencia del láser en función de las muestras. La calibración del espectrómetro de masas se llevó a cabo con polietilenglicol 2000 (PEG 2000). El espectro final se obtuvo mediante la suma de 900 disparos efectuados con el láser. A partir del espectro de masas de MALDI se obtuvo el grado medio de polimerización mediante el cálculo de la mediana entre las unidades observadas.

## 1.2.5.2. Análisis cuantitativo de proantocianidinas

### 1.2.5.2.1. Tiólisis-UPLC-MS

La determinación del grado medio de polimerización, de la composición y concentración de las proantocianidinas se llevó a cabo mediante la reacción de depolimerización catalizada en medio ácido y en presencia de tolueno- $\alpha$ -tiol usando para ello el método propuesto por Labarbe y col.<sup>9</sup> pero incluyendo algunas modificaciones. Posteriormente las unidades monoméricas terminales y de extensión fueron analizadas mediante UPLC-MS adaptando el método de HPLC descrito previamente por Monagas y col.<sup>16</sup>

*Preparación de la muestra.* Se mezclaron 100  $\mu$ L de la fracción proantociánica con el reactivo tiolítico, 5 % (v/v) de tolueno- $\alpha$ -tiol en metanol acidificado con HCl (0.2 N) en una proporción 1:1. Una vez que el vial estuvo sellado, la mezcla se agitó y se calentó en un baño de agua a 60 °C durante 10 min. Antes de analizar la muestra mediante UPLC, se añadieron 150  $\mu$ L de agua milli-Q a la mezcla de reacción para evitar así la aparición de picos asimétricos.

*Condiciones cromatográficas.* El equipo utilizado fue un UPLC Acquity (Waters, Milford, MA, U.S.A) con detector de masas (MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Alemania). La separación se llevó a cabo en una columna en fase reversa Waters Nova-Pak C18 (100 mm x 2.1 mm, d.i. 1.7  $\mu$ m) a 30 °C. Las fases móviles utilizadas fueron: eluyente A (agua/ácido fórmico, 98:2, v/v) y eluyente B (acetonitrilo/agua/ácido fórmico, 80:18:2, v/v/v) a un flujo constante de 0.45 mL/min. Las condiciones de gradiente de elución se recogen en la **Tabla 1.3**.

**Tabla 1.3.** Gradiente de elución empleado para la separación de unidades terminales y de extensión a partir de la reacción de tiólisis mediante UPLC-MS.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Eluyente A %</b>	<b>Eluyente B %</b>
0	95	5
5	70	30
5.5	68	32
10	40	60
12	1	99
12.5	0	100
16.5	0	100

*Cuantificación.* La cuantificación se realizó en modo negativo a partir de la extracción del ión cromatográfico correspondiente. Se integraron las áreas de los picos correspondientes a los flavan-3-oles monómeros (unidades terminales) y la de los aductos formados con tolueno- $\alpha$ -tiol (unidades de extensión). Se realizaron curvas de calibrado de la (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequina-3-*O*-galato y (-)-epigallocatequina. Debido a la ausencia de estándares comerciales de derivados tiolíticos, se consideró el hecho de que los derivados tiolíticos tienen un factor de respuesta similar a las correspondientes unidades monoméricas<sup>32</sup>, por lo que su cuantificación se realizó empleando la curva de calibración correspondiente a su monómero. El grado medio de polimerización (mDP), el porcentaje de procianidinas (% PC), prodelfinidinas (% PD) y galoilación (% G) se calcularon como el cociente molar de las unidades totales con respecto a las unidades terminales, el cociente molar de catequina, epicatequina y sus unidades de extensión con respecto a las unidades totales, el cociente molar de unidades de epigallocatequina respecto a las unidades totales y el cociente molar de unidades galoiladas respecto a las unidades totales, respectivamente. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

#### 1.2.5.2.2. Cuantificación de las proantocianidinas totales

Para cuantificar el contenido de las proantocianidinas totales (TPAs) presentes en la fracción proantociánica de estudio se utilizó el método de la vainillina tal como ha sido descrito por Guadalupe y col.<sup>29</sup>

*Preparación de la muestra.* Se prepararon dos disoluciones: una de ácido sulfúrico en metanol al 10 % (Dn1) y otra de vainillina en metanol al 1 % (Dn2). El método de la vainillina se llevó a cabo utilizando la fracción proantociánica (PAs-F) disuelta en metanol. Para ello se prepararon dos cubetas, una correspondiente al blanco (2.5 mL de metanol + 2.5 mL de Dn1 + 1 mL de PAsF), para evitar la interferencia de pigmentos del vino que absorben a 500 nm, longitud de onda utilizada en este método y otra correspondiente a la referencia (2.5 mL de Dn2 + 2.5 mL de Dn1 + 1 mL de metanol) para evitar las interferencias que puede causar el exceso de vainillina. Primero se realizó el blanco y posteriormente se introdujeron en el espectrofotómetro de doble haz, la cubeta de referencia y la cubeta con la muestra (2.5 mL de Dn2 + 2.5 mL de Dn1 + 1 mL de PAsF). Se comenzó adicionando el ácido sulfúrico y el metanol y a continuación se adicionó el mililitro de muestra y se mantuvo durante 15 minutos en el baño a 30 °C. Tanto el mililitro de muestra utilizado en el blanco como la vainillina de la referencia se adicionaron un momento antes de efectuar la medida, es decir, cuando la muestra ya llevaba 14 minutos en el baño a 30 °C.

*Cuantificación.* La absorbancia de los aductos coloreados formados entre la vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) y las PAs (flavanoles oligómeros y polímeros con enlace doble en la posición 2,3 y los grupos hidróxido meta orientados en el anillo B) se midió a 500 nm. Las medidas espectrofotométricas se realizaron en el espectrofotómetro UNICAM UV 2-400 (Labexchange, Burladingen, Alemania). Para la cuantificación se empleó la recta de calibrado de la catequina en el rango de 100 a 350 mg/L ( $y = 0.0029x - 0.1541$ ,  $R^2 = 0.9921$ ). Todas las muestras se analizaron por triplicado.

## 1.2.6. Análisis Sensorial

### 1.2.6.1. Panel sensorial

Un total de 32 panelistas, estudiantes de enología y miembros de la Universidad de La Rioja (12 hombres y 20 mujeres, entre 21 y 62 años de edad) participaron en trece sesiones de una hora de duración a la semana.

### 1.2.6.2. Entrenamiento del panel

El entrenamiento se llevó a cabo durante ocho sesiones, 4 sesiones de entrenamiento general y 4 sesiones de entrenamiento específico, durante las cuales trabajaron en subgrupos dirigidos por el mismo líder y siguiendo las mismas directrices para evitar diferencias en el entrenamiento entre los distintos subgrupos. Durante el entrenamiento general, se les presentaron diferentes estándares de referencia representativos de sabores y de sensaciones en boca como la astringencia. El método que se siguió fue el descrito por Sáenz-Navajas y col.<sup>33</sup> Se proporcionó al panel, por tanto, disoluciones que contenían diferentes concentraciones de azúcar de mesa (0 - 12 g/L) para el dulzor, ácido tartárico (0 - 1.5 g/L) para la acidez, sulfato de quinina (0 - 10 mg/L) para el amargor y sulfato de potasio y aluminio (0 - 5 g/L) para la astringencia, con el fin de ayudarles en la discriminación y reconocimiento de las distintas sensaciones orales. Durante el entrenamiento general los panelistas se familiarizaron con el uso de las escalas de intensidad para la evaluación del dulzor, acidez, amargor, astringencia y persistencia. Durante una sesión típica los panelistas evaluaban entre tres y cinco vinos diferentes a los del estudio, puntuando el dulzor, la acidez, el amargor y la astringencia sobre una escala de 10 puntos (0 = “ausencia”, 1 = “muy bajo” y 9 = “muy alto”) así como la persistencia (1 = “muy corta” y 9 = “muy larga”). Los vinos seleccionados para esta fase del entrenamiento presentaban propiedades orales muy marcadas y fácilmente reconocibles, para lo que se incluyeron vinos tintos, rosados y blancos de diversos orígenes y variedades. Las sesiones concluían con una discusión en la que el líder del panel comparaba las puntuaciones dadas por los panelistas en la evaluación de cada uno de los vinos.

Durante el entrenamiento específico, los panelistas se familiarizaron con el tipo de muestras del estudio para lo que evaluaron vinos jóvenes y envejecidos con características similares a los vinos del estudio.

### 1.2.6.3. Evaluación de los vinos

Los panelistas entrenados evaluaron los 26 vinos a estudio por duplicado durante un total de cinco sesiones (10 - 11 vinos por sesión). Diez mililitros de vino fueron presentados a los panelistas en copas negras normalizadas<sup>34</sup>, cubiertas por placas Petri, codificadas con números de tres cifras elegidos aleatoriamente y colocadas de acuerdo a un orden aleatorio. Los panelistas puntuaron el dulzor, la acidez, el amargor, la astringencia y la persistencia de los vinos en las escalas descritas anteriormente y que se recogen en el **Anexo I**. Entre muestra y muestra los panelistas siguieron el protocolo de enjuague propuesto por Colonna y col.<sup>35</sup> (**Anexo II**).

Todos los vinos se sirvieron a temperatura ambiente y se evaluaron en cabinas individuales. Los panelistas no fueron informados de la naturaleza de las muestras hasta una vez terminado el experimento.

### 1.2.7. Análisis estadístico

Se calculó la media del mDP de las proantocianidinas de los vinos correspondientes a la misma añada para así poder crear las ecuaciones que estiman el mDP en función de la añada. Se aplicó el ANOVA a un factor y el ANOVA a tres factores a los datos gustativos mediante el programa estadístico SPSS 15.0. (Inc., Chicago, IL). Se aplicó el análisis de componentes principales y el análisis de cluster a los datos obtenidos del grado medio de polimerización calculados mediante MALDI y tiólisis y al contenido de PAs totales, para examinar la posibilidad de agrupamiento de las muestras en función de la añada mediante el programa estadístico SPAD 5.5. (CISIA-CESRESTA, Montreuil, Francia). Las correlaciones de Pearson fueron calculadas para investigar las relaciones existentes entre la composición química y los atributos sensoriales.



## 1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.3.1. Caracterización enológica de los vinos

Los vinos presentaron valores de pH comprendidos entre 3.37 y 4.0, fluctuando los valores de acidez total entre 4.38 y 6.96, como muestra la **Tabla 1.4**.

**Tabla 1.4.** Parámetros enológicos convencionales y de color de los 26 vinos del estudio.

Vinos*	pH	Acidez total (g/L) <sup>1</sup>	Acidez volátil (g/L) <sup>2</sup>	Azúcares reductores (g/L)	Grado alcohólico (% v/v)	IC <sup>3</sup>	T <sup>4</sup>
W1-1990	3.51	4.94	0.50	2.04	13.7	12.0	1.05
W2-1999	3.57	5.66	0.52	2.14	14.3	7.9	1.22
W3-2000	3.47	6.59	0.41	3.52	15.7	17.5	0.94
W4-2000	3.73	5.93	0.65	2.87	14.6	9.7	0.94
W5-2001	3.57	5.74	0.47	2.34	14.4	9.3	0.94
W6-2002	3.86	4.69	0.39	2.76	14.3	10.8	0.93
W7-2002	3.46	6.10	0.41	1.36	14.2	10.2	0.88
W8-2002	3.40	5.69	0.51	2.16	15.8	8.9	0.82
W9-2003	3.75	5.36	0.56	1.55	14.3	13.2	0.90
W10-2003	3.52	5.44	0.67	1.83	13.3	8.7	0.75
W11-2003	3.45	5.81	0.43	3.96	15.5	9.3	0.85
W12-2003	3.54	6.46	0.61	3.62	14.6	13.4	0.83
W13-2004	3.95	5.03	0.63	3.29	15.0	13.6	0.83
W14-2004	3.70	5.21	0.54	1.65	14.5	12.4	0.75
W15-2004	3.77	5.24	0.60	3.03	14.8	9.4	0.99
W16-2004	3.63	6.30	0.48	2.45	15.5	12.7	0.76
W17-2004	3.61	6.02	0.68	2.97	13.0	11.5	0.82
W18-2005	3.47	5.87	0.49	3.51	15.9	14.4	0.76
W19-2005	3.52	4.93	0.45	3.23	14.7	13.3	0.83
W20-2005	3.37	6.96	0.43	2.90	15.1	16.2	0.75
W21-2005	3.66	5.02	0.63	3.32	15.5	19.9	0.71
W22-2007	3.75	4.44	0.20	0.53	13.7	10.4	0.54
W23-2007	3.79	4.97	0.25	0.58	13.5	11.1	0.55
W24-2008	4.00	4.49	0.08	1.67	14.5	9.6	0.66
W25-2008	3.95	4.38	0.10	1.59	14.2	10.0	0.64
W26-2008	3.43	6.34	0.12	1.98	14.6	7.1	0.53

\*Muestras de vinos referenciadas con su añada. <sup>1</sup>Expresado en gramos de ácido tartárico por litro. <sup>2</sup>Expresado en gramos de ácido acético por litro. <sup>3</sup>Intensidad colorante. <sup>4</sup>Tonalidad. Expresado en unidades de absorbancia.

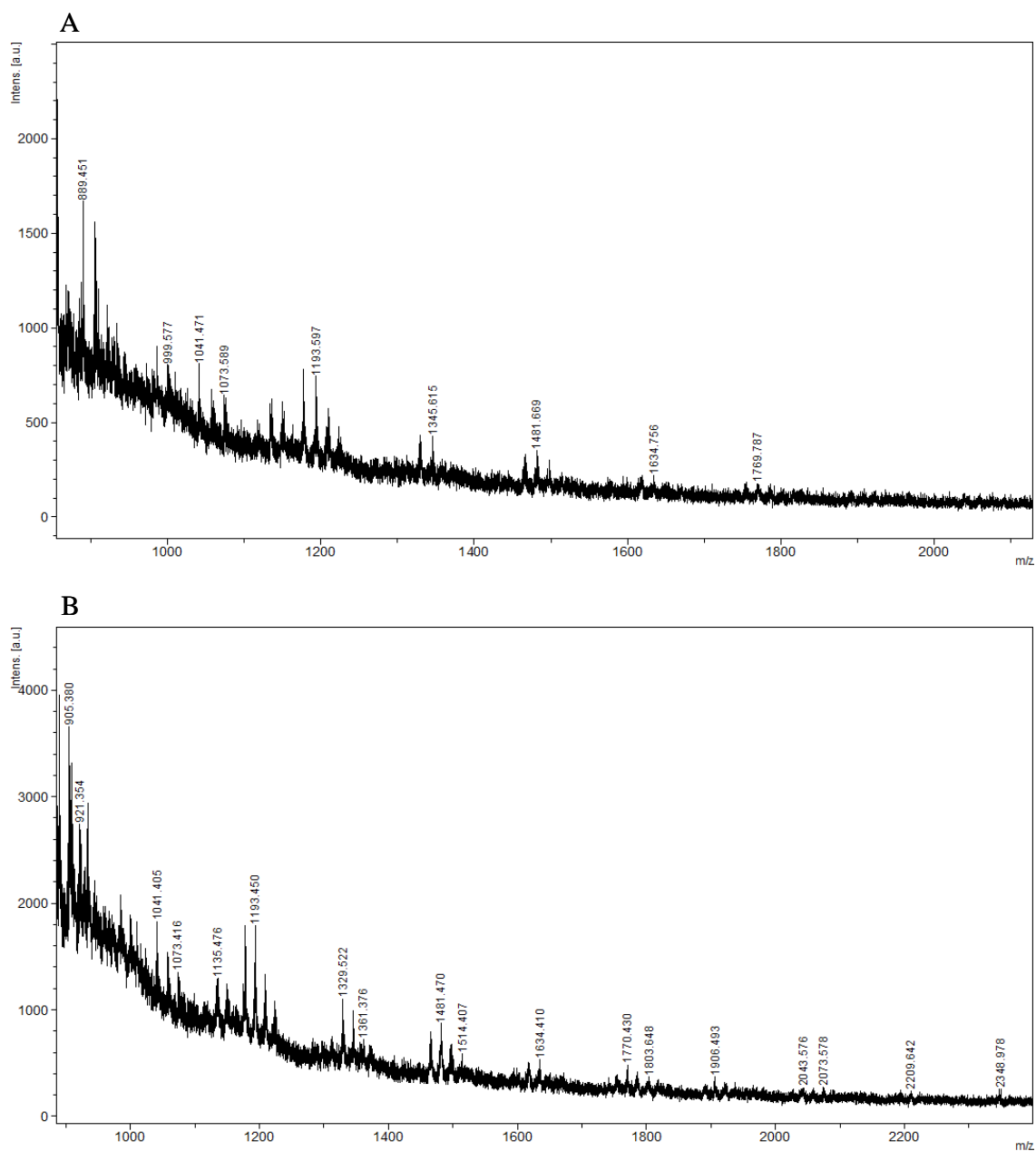
Como era esperado, los vinos envejecidos mostraron valores de acidez volátil más altos (0.41 - 0.68 g/L) que los vinos jóvenes (0.08 - 0.25 g/L). El contenido de azúcares reductores fue inferior a 4 g/L y por lo tanto estos vinos se clasifican dentro de la categoría de vinos secos. Todos los vinos mostraron niveles altos de etanol (13 - 15.9 % v/v). La intensidad colorante de los vinos osciló entre 7 y 19.9. La tonalidad fue el parámetro que reflejó más claramente la diferencia entre los vinos de las distintas añadas, mostrando los vinos jóvenes valores inferiores a 0.7 y los vinos envejecidos valores de hasta 1.2 lo que concuerda con lo observado por

Ribereau Gayon y col.<sup>36</sup> quienes publicaron que los valores normales para un vino joven oscilan entre 0.5 y 0.7 mientras que durante el envejecimiento se produce un incremento pudiendo llegar a valores de 1.3. Por consiguiente, los valores determinados de tonalidad se encuentran dentro de los rangos establecidos por estos autores.

## 1.3.2. Análisis de proantocianidinas mediante MALDI-TOF MS

### 1.3.2.1. Optimización y consideraciones del método

Previo al análisis de las muestras a estudio mediante MALDI-TOF MS, se llevó a cabo la optimización de una serie de factores. Dos de los parámetros que más influyen en la sensibilidad y reproducibilidad del método son la selección de la matriz y la preparación de la muestra-matriz. Por ello, se probaron dos matrices, el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) y el ditranol (DIT). Ambas matrices junto con el ácido 3-indol-acrílico (IAA) han sido las más ampliamente utilizadas en el análisis de proantocianidinas presentes en semillas de uva, zumo de manzana, arándanos y lúpulo, entre otros.<sup>28,37,38</sup> La matriz DHB fue la seleccionada en este estudio ya que proporcionó un rango de masas más amplio e introdujo un menor ruido de fondo como muestra la **Figura 1.2**. Este hecho fue también observado por Yang y Chien.<sup>39</sup> en el análisis de proantocianidinas presentes en semillas de uva y granos de cacao. Se testaron también diferentes relaciones muestra-matriz (1:10, 2:10, 5:10 y 10:10), resultando ser 2:10 la que reportó una mejor relación señal-ruido. Todos los análisis se llevaron a cabo en modo positivo y reflector. Tanto el modo reflector como el modo lineal han sido satisfactoriamente aplicados en el análisis de proantocianidinas, sin embargo, si se persigue una mejor resolución e identificación de los compuestos el modo reflector resulta el más adecuado.<sup>28</sup>



**Figura 1.2.** Espectros de MALDI-TOF MS realizados en una misma muestra en modo reflector utilizando como matriz DIT (A) y como matriz DHB (B).

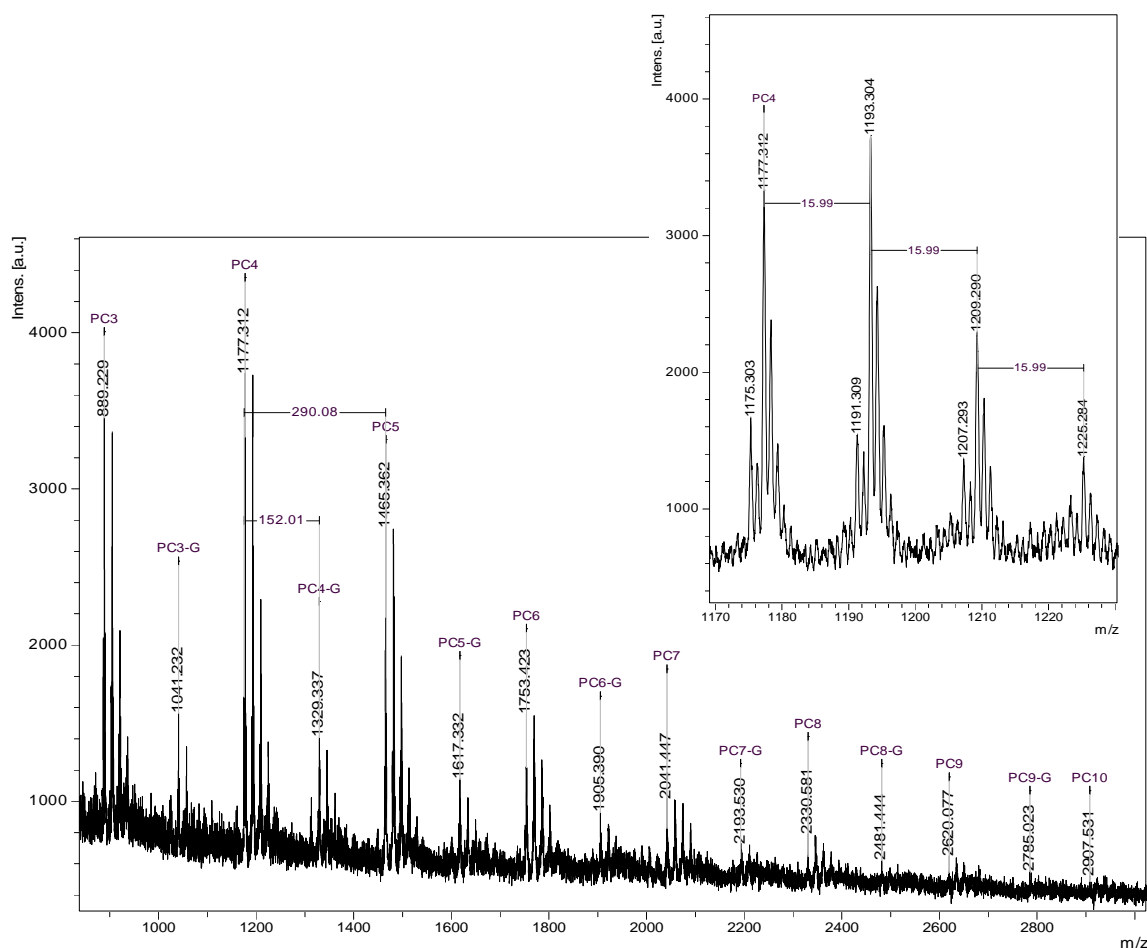
### 1.3.2.2. Determinación estructural de las proantocianidinas

Los datos correspondientes a las masas de las proantocianidinas han sido normalmente referidos a sus aductos de sodio o de potasio  $[M + Na]^+$  y  $[M + K]^+$ .<sup>28</sup> En este estudio, las muestras sólo presentaban aductos de sodio. La asignación de las señales encontradas en MALDI-TOF MS respecto a las diferentes proantocianidinas ha sido posible mediante la determinación de la masa teórica o calculada. La masa monoisotópica teórica (como aducto de sodio,  $[M + Na]^+$ ) fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula<sup>28</sup>:

$$[M + Na]^+ = 290.08 * CAT + 306.07 * GCAT + 152.01 * G - 2.02 * B - 4.04 * A + 22.99$$

Donde CAT, GCAT son, respectivamente, el número de unidades de (epi)catequina y (epi)gallocatequina presentes en la molécula proantocianíca, G es el número de unidades de éster galoilados combinados a los flavanoles, y B y A son, respectivamente, el número de uniones de tipo-B y de tipo-A presentes entre unidades.

El espectro del análisis directo de una fracción de proantocianidinas se muestra en la **Figura 1.3**. Insertado sobre él, se muestra un espectro ampliado de las masas correspondientes a las prodelfinidinas y a los enlaces de tipo A (picos etiquetados).



**Figura 1.3.** Espectro de masas de MALDI-TOF en modo positivo reflector, el cual muestra una serie de procianidinas  $[M + Na]^+$  desde el trímero al decámero. En el espectro insertado se muestra una ampliación de la región de los tetrámeros, de las prodelfinidinas y de los picos derivados de las uniones tipo-A.

Las masas observadas en el espectro de MALDI-TOF MS, junto con los valores esperados de acuerdo a la aplicación de la ecuación anterior se muestran en la **Tabla 1.5**. En todas las muestras, los oligómeros más pequeños detectados fueron los trímeros ya que el espectro de masas fue adquirido en el rango de 800 a 4060 Da, con supresión hasta 800 Da con el fin de evitar los efectos tanto de ruido de fondo como de interferencias con la matriz. Taylor y col.<sup>40</sup> también trabajaron en este rango de masas en el análisis de proantocianidinas presentes en el lúpulo con el fin de evitar ambos efectos. En los vinos jóvenes se detectaron grados de polimerización de hasta 10 unidades, al igual que lo observado por Wollmann y col.<sup>19</sup> en diferentes fracciones vínicas obtenidas mediante cromatografía de adsorción en gel a partir de la fracción polimérica de un vino tinto. Teniendo en cuenta los datos mostrados en la **Tabla 1.5**, podemos afirmar que la fracción proantocianídica de los vinos del estudio está constituida por procianidinas separadas por 290 Da (ej., m/z 889, 1177, 1465, 1753, etc.) y por prodelfinidinas, en las cuales el tercer grupo hidroxilo introduce diferencias de 16 Da<sup>41</sup> y también por procianidinas y prodelfinidinas galoiladas con una separación de 152 Da. Para verificar si la presencia de esta diferencia de 16 Da era debida a la presencia de prodelfinidinas y no a la presencia de iones Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> en la muestra, se introdujo carbonato de cesio produciéndose por tanto una ionización mayoritaria con Cs<sup>+</sup>, demostrándose así que la diferencia de 16 Da era debida a la hidroxilación. En el espectro ampliado (**Figura 1.3**) se puede observar como esta diferencia de 16 Da es repetida hasta tres veces, lo cuál implica que tres prodelfinidinas pueden estar unidas a las procianidinas. La mezcla de procianidinas y prodelfinidinas en el mismo compuesto (ej., m/z 1193) tiene un problema inherente ya que esta señal puede ser debida tanto a un tetrámero con enlaces tipo-B formado por tres (-)-epicatequinas y una (-)-epigallocatequina o bien a un trímero con enlaces de tipo-B formado por dos (-)-epicatequina-3-*O*-galato y una (-)-epicatequina. Es común en MALDI-TOF que la diferente composición de oligómeros genere una misma señal, así que la identificación estructural mediante esta técnica resulta siempre tentativa.<sup>42</sup> En la **Figura 1.3** se observan señales (ej., m/z 1175, 1191, etc.) que corresponden a uniones de tipo-A entre proantocianidinas por lo que al menos un enlace interflavánico de tipo-A existe en cada oligómero.

**Tabla 1.5.** Lista de los iones  $[M + Na]^+$  esperados y observados en el espectro de masas obtenido mediante MALDI-TOF MS.

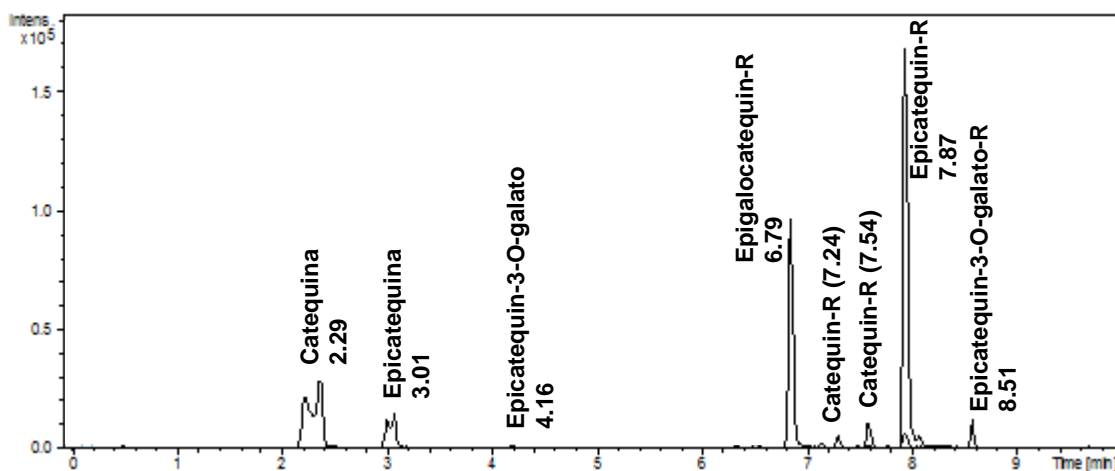
DP <sup>a</sup>	PD <sup>b</sup>	G <sup>c</sup>	m/z calculada <sup>d</sup>	m/z observada <sup>e</sup>
3	0		889.8	889.4
	1		905.8	905.4
	2		921.8	921.4
	0	1	1041.8	1041.4
	1	1	1057.8	1057.4
4	2	1	1073.8	1073.4
	0		1178.0	1177.5
	1		1194.0	1193.5
	2		1210	1209.5
	3		1226	1225.4
5	0	1	1330	1329.5
	1	1	1346	1345.5
	2	1	1362	1361.5
	0		1466.3	1465.5
	1		1482.3	1481.5
6	2		1498.3	1497.5
	3		1514.3	1513.5
	0	1	1618.3	1617.5
	1	1	1634.3	1633.5
	2	1	1650.3	1649.5
7	0		1754.6	1753.5
	1		1770.6	1769.6
	2		1786.6	1785.6
	3		1802.6	1801.5
	0	1	1906.6	1905.6
8	1	1	1922.6	1921.7
	2	1	1938.6	1937.5
	0		2042.8	2041.7
	1		2058.8	2057.7
	2		2074.8	2073.7
9	3		2090.8	2089.7
	4		2106.8	2107.7
	0	1	2194.8	2183.7
	1	1	2210.8	2210.6
	2	1	2226.8	2225.7
10	0		2331.1	2330.7
	1		2347.1	2346.7
	2		2363.1	2362.5
	3		2379.1	2378.8
	4		2395.1	2393.5
9	0	1	2483.1	2482.6
	1	1	2499.1	2498.8
	2	1	2515.1	2514.4
	0		2619.3	2619.7
	1		2635.3	2634.7
9	2		2651.3	2649.9
	3		2667.3	2667.0
	0	1	2771.3	2771.5
	1	1	2787.3	2786.8
	2	1	2803.3	2803.9
10	0		2907.6	2907.1
	1		2923.6	2922.1
	2		2939.6	2938.6
	3		2955.6	2955.5

<sup>a</sup>DP = grado de polimerización. <sup>b</sup>PD = número de prodelfinidinas. <sup>c</sup>G = número de galatos. <sup>d</sup>Cálculo de la masa media basada en la abundancia natural del isótopo. <sup>e</sup>m/z observada en los picos.

En los espectros obtenidos, las masas más bajas presentaron una mayor respuesta en la intensidad que las masas más altas, incluso cuando las proantocianidinas más polimerizadas pudieran estar presentes en una concentración similar. Este efecto es debido a la respuesta del detector y a su capacidad finita la cual provoca que las masas más pequeñas lleguen primero al detector. Este efecto fue observado en todas las muestras estudiadas. Además se ha observado que la señal correspondiente a los taninos galoilados es siempre inferior que la señal de los no-galoilados. Según los resultados obtenidos, podemos confirmar que la mayor parte de las fracciones vínicas analizadas presentaban procianidinas galoiladas y no galoiladas y prodelfinidinas unidas mediante enlaces de tipo-B.

### 1.3.3. Tiólisis

En la **Figura 1.4** se muestra el cromatograma obtenido mediante UPLC-MS una vez realizada la reacción de depolimerización en una de las fracciones proantociánicas del estudio. En todas las muestras, las unidades terminales identificadas fueron la catequina (Ct), la epicatequina (ECt) y el galato de epicatequina (ECGt). Como unidades de extensión, además de las tres citadas se identificó la epigalocatequina (EGCe).



**Figura 1.4.** Cromatograma obtenido a partir de UPLC-MS una vez realizada la reacción de depolimerización con tolueno- $\alpha$ -tiol. R.- tolueno- $\alpha$ -tiol

Los resultados obtenidos en todos los vinos se muestran en la **Tabla 1.6**. La unidad terminal presente en mayor porcentaje fue la catequina, siendo la epicatequina la mayoritaria entre las unidades de extensión, seguida de la epigallocatequina. En general, en todos los vinos el porcentaje de galatos (ECGt, ECGe) fue muy bajo, similar a lo observado en otros trabajos.<sup>43,44</sup> El porcentaje de procianidinas, prodelfinidinas y galatos determinado mostró que todos los vinos poseen una composición mayoritaria en procianidinas, entre 80 - 100 %.

**Tabla 1.6.** Composición estructural de las proantocianidinas presentes en vinos tintos envejecidos y jóvenes obtenida a partir de la reacción de depolimerización con tolueno- $\alpha$ -tiol.

Muestras		Unidades monoméricas (%)			Unidades terminales (%)			Unidades de extensión (%)			
Vinos	Añada	PC <sup>a</sup>	PD <sup>b</sup>	G <sup>c</sup>	Ct <sup>d</sup>	ECt	ECGt	EGCe	Ce	ECe	ECGe
W1	1990	100	0	0	55.13	9.62	0.00	0.00	0.00	35.26	0.00
W2	1999	100	0	0	30.19	14.47	0.00	0.00	0.00	55.35	0.00
W3	2000	91.7	6.5	1.9	18.27	6.19	1.70	6.97	1.11	64.57	1.18
W4	2000	100	0	0	38.30	17.73	0.00	0.00	0.00	43.97	0.00
W5	2001	93.7	5.7	0.6	19.26	8.67	0.00	6.08	0.00	65.99	0.00
W6	2002	84.5	15.3	0.2	11.90	3.75	0.00	16.15	1.10	66.86	0.25
W7	2002	89.7	9.2	1.1	23.51	17.24	0.00	9.72	1.57	47.96	0.00
W8	2002	100	0	0	33.33	16.67	0.00	0.00	0.00	50.00	0.00
W9	2003	88.6	11.2	0.2	10.65	3.68	0.00	12.39	0.99	72.03	0.26
W10	2003	93.3	6.3	0.4	13.06	7.30	0.00	6.65	1.16	71.46	0.38
W11	2003	92.8	6.7	0.4	12.33	6.00	0.17	7.28	2.88	70.84	0.51
W12	2003	94.2	5.8	0	27.08	15.28	0.00	6.25	0.00	51.39	0.00
W13	2004	88.6	11.2	0.2	10.39	2.11	0.00	11.97	1.04	74.23	0.25
W14	2004	93.3	5.9	0.8	16.47	6.77	0.00	7.05	1.56	67.72	0.43
W15	2004	92.9	6.3	0.7	19.36	10.10	0.00	6.90	0.00	63.64	0.00
W16	2004	86.3	13.3	0.4	12.19	8.06	0.17	13.96	1.54	63.63	0.46
W17	2004	97.8	1.8	0.4	12.80	12.68	0.00	1.86	1.13	71.53	0.00
W18	2005	93.4	5.7	0.9	16.46	10.69	0.71	6.30	0.99	64.20	0.65
W19	2005	93.6	5.6	0.7	14.72	8.84	0.00	6.94	0.92	68.19	0.38
W20	2005	88.7	10.6	0.8	17.30	9.73	0.26	11.11	1.63	59.15	0.82
W21	2005	86.5	13.1	0.4	12.66	2.15	0.13	14.06	1.14	69.37	0.49
W22	2007	83.7	15.6	0.6	14.45	2.08	0.30	16.33	2.03	64.17	0.64
W23	2007	81.9	17.5	0.6	12.76	1.95	0.31	18.26	1.62	64.57	0.53
W24	2008	80.5	18.6	0.9	13.05	1.72	0.45	19.33	2.74	61.84	0.85
W25	2008	80.0	19.3	0.7	11.88	1.49	0.31	20.12	2.16	63.33	0.72
W26	2008	85.6	13.6	0.8	15.00	3.11	0.39	14.45	1.06	65.14	0.86

<sup>a</sup>Porcentaje de procianidinas, <sup>b</sup>Porcentaje de prodelfinidinas, <sup>c</sup>Porcentaje de galatos. <sup>d</sup>Todas las unidades terminales y de extensión están expresadas en porcentaje.



El porcentaje de prodelfinidinas osciló entre 0 - 19 %. Los vinos envejecidos presentaron de media un 6.5 % de prodelfinidinas siendo triplicada su presencia en vinos jóvenes estando en torno al 17 %. El porcentaje de galatos representó menos del 1 % del total tanto en vinos jóvenes como en vinos envejecidos.

La información resultante de la composición estructural, del grado medio de polimerización obtenido a partir de los espectros de MALDI-TOF MS y de la reacción de tiólisis y el contenido de proantocianidinas totales (TPAs) se muestran en la **Tabla 1.7**. En el presente trabajo, el porcentaje de prodelfinidinas mostró una correlación positiva con el mDP ( $r^2 = 0.65$ ,  $F = 47.58$ ,  $P < 0.0001$ ), mientras que el porcentaje de procianidinas mostró correlación negativa con el mDP ( $r^2 = 0.63$ ,  $F = 43.51$ ,  $P < 0.0001$ ); no existiendo correlación entre el porcentaje de galatos y el mDP. Esta ausencia de correlación entre el porcentaje de galatos y el mDP fue también observada por otros autores en un estudio realizado con semillas y hollejos de uva de la variedad Cabernet Franc.<sup>9</sup> En vinos, Cadot y col.<sup>45</sup> confirmaron correlaciones entre el mDP y el porcentaje de EGC. El incremento del porcentaje de prodelfinidinas con respecto al grado de polimerización ha sido también descrito en un estudio realizado en hollejos de la variedad Cabernet Franc.<sup>9</sup> Es decir, en vinos envejecidos las unidades mayoritarias de los taninos parecen ser la C y la EC. Por el contrario, el menor porcentaje de prodelfinidinas encontrado respecto a la añada ( $r^2 = 0.54$ ,  $F = 26.54$ ,  $P < 0.0001$ ) podría ser indicativo de vinos con un carácter más envejecido. Cosme y col.<sup>17</sup> también han observado una ligera disminución del contenido de prodelfinidinas en los vinos durante su almacenamiento.

#### **1.3.4. Relación entre MALDI, tiólisis y proantocianidinas totales**

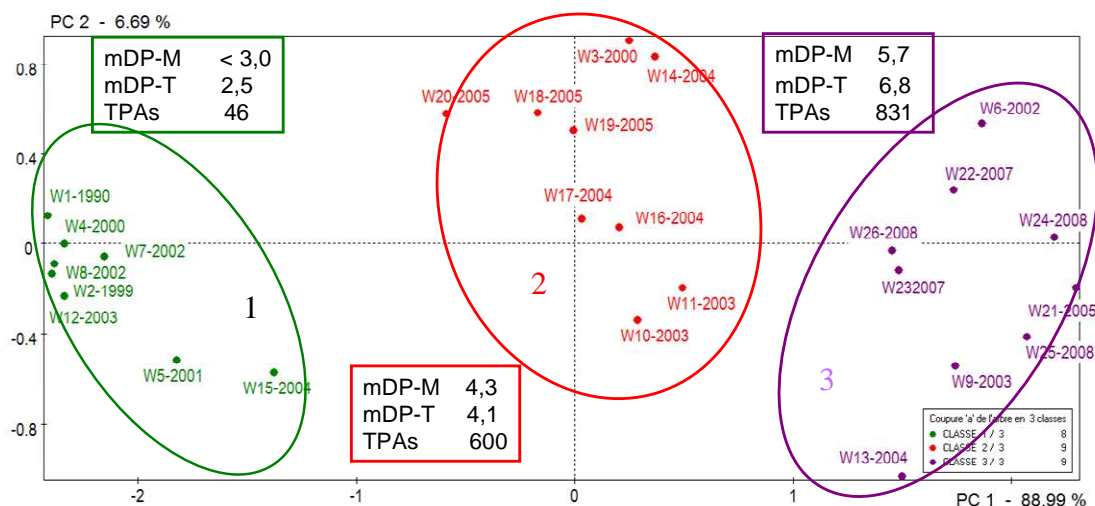
La información cualitativa obtenida a partir de los espectros de MALDI-TOF MS respecto a la composición estructural y al grado medio de polimerización, así como el grado medio de polimerización calculado a partir de la reacción de tiólisis y el contenido de proantocianidinas totales (TPAs) para cada una de las muestras del estudio se recogen en la **Tabla 1.7**. El grado medio de polimerización obtenido a partir de los espectros de MALDI-TOF fue calculado a partir de la mediana, teniendo en cuenta el rango de procianidinas observado.

**Tabla 1.7.** Proantocianidinas detectadas en MALDI en cada muestra del estudio, mDP MALDI (mDP-M), mDP tiólisis (mDP-T) y contenido total de PAs (TPAs).

Vinos	Añada	MALDI-TOF MS <sup>a</sup>	mDP - M <sup>b</sup>	mDP - T <sup>c</sup>	TPAs (mg/L) <sup>d</sup>
W1	1990	n.d	< 3	1.76	64
W2	1999	n.d	< 3	2.14	7
W3	2000	PC3-gal - PC5-gal	4	3.86	820
W4	2000	n.d	< 3	2.06	56
W5	2001	n.d	< 3	3.61	82
W6	2002	PC3 - PC7	5	6.4	1094
W7	2002	n.d	< 3	2.44	97
W8	2002	n.d	< 3	2.1	22
W9	2003	PC4, PC5, PC6, PC6-gal, PC7	6	6.96	689
W10	2003	PC4 - PC6-gal	5	4.92	419
W11	2003	PC3-gal - PC6-gal	5	5.4	569
W12	2003	n.d	<3	2.37	0
W13	2004	PC3 - PC7	5	7.88	607
W14	2004	PC3 - PC6-gal	4,5	3.82	783
W15	2004	PC3-gal, PC4	3,5	3.43	37
W16	2004	PC3-gal - PC6-gal	5	4.89	603
W17	2004	PC3-gal - PC7-gal	5	3.89	453
W18	2005	PC3, PC4, PC4-gal, PC5	4	3.59	618
W19	2005	PC3-gal, PC4, PC4-gal, PC5, PC6	4	3.63	592
W20	2005	PC3-gal - PC4	3.5	3.22	547
W21	2005	PC3-gal - PC8	5.5	7.76	989
W22	2007	PC3 - PC9	6	5.91	876
W23	2007	PC3 gal- PC7	5	6.63	824
W24	2008	PC3 - PC10	6.5	6.63	906
W25	2008	PC3 - PC9 gal	6	7.34	816
W26	2008	PC3 - PC10	6.5	5.46	674

<sup>a</sup>Serie de procianidinas encontradas en cada una de las muestras. Por ej. (PC4 - PC6-gal, implica la presencia de PC4, PC4-gal, PC5, PC5-gal, PC6 y PC6-gal). <sup>b</sup>Grado medio de polimerización encontrado en MALDI, calculado a partir de la mediana. <sup>c</sup>Grado medio de polimerización obtenido mediante tiólisis. <sup>d</sup>Proantocianidinas totales calculadas mediante el índice de la vainillina, expresado en mg/L de catequina.

En nuestro grupo de muestras el grado medio de polimerización obtenido a partir del espectrómetro de masas MALDI-TOF (mDP - M) varió entre 3.5 y 6.5, sin tener en cuenta las muestras que no fueron detectadas en MALDI, en las cuales se ha supuesto la presencia de dímeros. La polimerización más alta encontrada fue debida a la presencia de decámeros. El mDP calculado mediante tiólisis varió entre 1.76 y 7.88, siendo concordantes estos valores con los observados en otros trabajos.<sup>17,21,46,47</sup> El mDP - M estuvo altamente correlacionado con el mDP - T ( $r^2 = 0.72$ ,  $F = 64.94$ ,  $P < 0.0001$ ) por lo que ambas metodologías proporcionan resultados concordantes y satisfactorios. El análisis cluster realizado con los datos de los parámetros químicos del mDP - T, mDP - M y TPAs se muestra en la **Figura 1.5**.



**Figura 1.5.** Cluster de correlaciones entre mDP-MALDI, mDP-Tiólisis y TPAs.

En esta figura se observa como el cluster 1 (verde) está negativamente correlacionado con el mDP y el contenido total de proantocianidinas, mostrando  $mDP - M < 3$ ,  $mDP - T = 2.5$  y  $TPAs = 46$  mg/L. Los vinos más envejecidos son los más representativos de este grupo. El cluster 2 (rojo) no está correlacionado con ninguna de las variables y está representado por un  $mDP - M = 4.3$ ,  $mDP - T = 4.1$  y  $TPAs = 600$  mg/L, siendo las muestras de las añadas 2003, 2004 y 2005, las más representativas de este grupo. El cluster 3 (violeta) está correlacionado con muestras que presentan un mayor mDP y un contenido más alto de PAs. Este grupo mostró un  $mDP - M = 5.66$ ,  $mDP - T = 6.77$  y  $TPAs = 831$  mg/L. Los cinco vinos jóvenes (añadas 2007 y 2008) y una muestra de cada una de las siguientes añadas 2002, 2003, 2004 y 2005 formaron parte de este grupo.

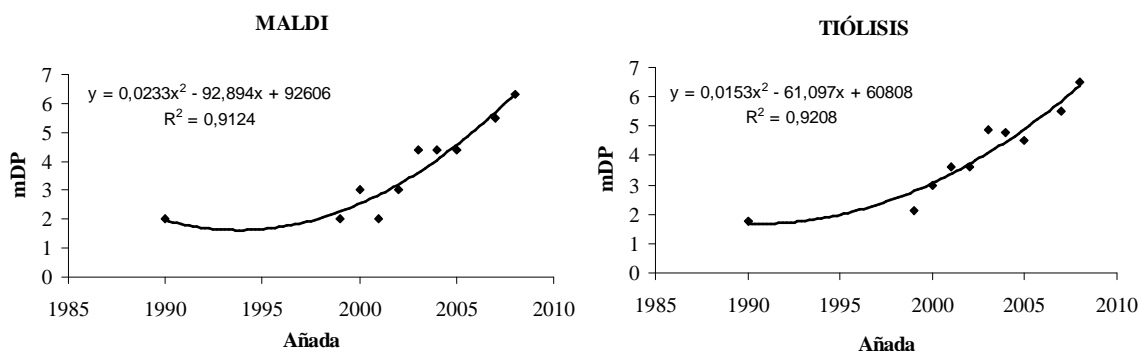
Como reflejan los clusters formados, el mDP calculado mediante MALDI y tiólisis en los clusters 1 y 2 es muy similar. Sin embargo, cuando la presencia de proantocianidinas en las muestras es mayor, el valor obtenido mediante tiólisis suele ser mayor que el calculado mediante MALDI, por lo que la discrepancia entre el tamaño molecular estimado mediante espectrometría de masas y el estimado mediante tiólisis parece incrementar con el grado de polimerización. Este hecho ha sido observado por Jerez y col.<sup>48</sup>, aunque estos autores comprobaron que la concordancia entre ambos análisis era suficientemente buena hasta un  $mDP = 9$ . Otros autores como Taylor y col.<sup>40</sup> y Mané y col.<sup>49</sup> demostraron que los taninos que presentan un peso molecular

elevado no son eficientemente detectados en MALDI-TOF MS, especialmente las mezclas de taninos altamente polidispersados debido en parte a la fragmentación de estos compuestos en la fuente de ionización.<sup>40</sup> Por ello, Mané y col.<sup>49</sup> propusieron el empleo de proteínas que unidas a los taninos actúan inhibiendo esta posible fragmentación.<sup>47</sup>

Respecto al contenido total de PAs presentes en las muestras y analizadas mediante el método de la vainillina (**Tabla 1.7**), este parámetro osciló entre 0 y 1094 mg/L. El mDP mostró una correlación positiva con las proantocianidinas totales ( $r^2 = 0.62$ ,  $F = 42.45$ ,  $P < 0.0001$ ). El mayor y menor contenido en proantocianidinas (1094 y 0 mg/L) correspondió a los vinos W6 y W12, ambos envejecidos en barrica y de dos campañas consecutivas, 2002 y 2003, respectivamente. Estas diferencias de concentración tan notables también fueron anotadas por Guadalupe y col.<sup>29</sup> en dos vinos comercializados como crianza y pertenecientes a la misma añada, mostrando valores de 428 y 2411 mg/L. Monagas y col.<sup>16</sup> observaron valores medios de 700-800 mg/L, en vinos jóvenes elaborados con Tempranillo, Graciano y Cabernet Sauvignon, los cuales se asemejan a los valores observados en los vinos jóvenes de este trabajo, a pesar de que estos autores no realizaron la cuantificación en base a la catequina sino que usaron para ello polímeros de flavanoles aislados de semillas de uva.

### **1.3.5. Relación entre el grado medio de polimerización de las proantocianidinas y la añada**

El mDP de los taninos mostró relación con la edad de los vinos. De acuerdo con esta observación y teniendo en cuenta el mDP calculado a partir de MALDI y el mDP calculado a partir de la reacción de tiólisis, en el presente trabajo se proponen dos ecuaciones que permiten establecer una relación entre el mDP de vinos españoles de distintas variedades en función de la añada (**Figura 1.6**).



**Figura 1.6.** Correlación entre el grado medio de polimerización y la añada de los vinos calculado mediante MALDI-TOF MS y tiólisis.

Los resultados muestran como el mDP disminuye con el tiempo de envejecimiento de los vinos en botella, con valores de  $R^2$  de 0.9124 (MALDI) y de 0.9208 (Tiólisis). La ecuaciones obtenidas  $y = 0.0233x^2 - 92.894x + 92606$  (MALDI) e  $y = 0.0153x^2 - 61.097x + 60808$  (Tiólisis) permiten estimar el mDP de vinos españoles, conociendo su edad o viceversa, es decir, si se dispone del grado medio de polimerización de un vino se podría estimar su edad. Chira y col.<sup>50</sup> también propusieron una ecuación que permitía predecir el mDP de vinos monovarietales de Cabernet Sauvignon de la denominación de Pauillac, a partir de su añada.

En este estudio se ha observado un mDP próximo a 2 en vinos que han transcurrido más de 9 años entre bodega y botella. La mayor parte de los vinos tintos españoles se consumen después de un periodo de envejecimiento que tiene lugar tanto en bodega como en botella. Esta disminución del grado de polimerización medio de los taninos presentes en vinos tintos con el tiempo puede ser debido a diferentes reacciones. Por un lado, puede tener lugar la hidrólisis de las procianidinas oligómeras y/o dímeros por rotura de enlaces C-C, catalizadas por los propios ácidos presentes en el vino.<sup>51-53</sup> Por otra parte, los taninos pueden unirse a los antocianos formando pigmentos poliméricos, lo cual puede tener lugar a través de puentes de etilo<sup>54</sup> y por condensación directa.<sup>55</sup>

La disminución del mDP de las proantocianidinas en disolución explicaría la disminución de la astringencia del vino, lo cual ha sido previamente descrito por otros autores.<sup>5,50,56</sup>

### 1.3.6. Relación entre el grado medio de polimerización de las proantocianidinas y la variedad

En una tentativa de estudiar el efecto de la variedad en los vinos del estudio, las añadas 2003, 2004 y 2005 fueron seleccionadas para tal fin, ya que englobaban un mayor número de muestras (**Tabla 1.2, Tabla 1.7**). De las cuatro muestras (W9 – W12) correspondientes al año 2003, el vino W9 elaborado con 90 % de Tempranillo y 10 % de Cabernet Sauvignon fue el que mostró un mayor mDP  $\approx 7$ , mientras que un vino elaborado con 70 % de Tempranillo, 20 % de Garnacha y 10 % de otras variedades presentó el menor mDP  $\approx 2$ . Los otros dos vinos del grupo, uno de ellos elaborado con 100 % de Tempranillo y el otro elaborado con mezcla de 50 % Mazuelo y 50 % Syrah mostraron mDP de proantocianidinas intermedios  $\approx 5$ .

En 2004 se evaluaron cinco muestras (W13 - W17) correspondiendo el menor mDP  $\approx 3.5$  al vino W15 el cual había sido elaborado con 80 % de Tempranillo, 15 % de Graciano y 5 % de Garnacha. Los cuatro vinos restantes del grupo eran vinos monovarietales de las variedades Tempranillo (dos muestras), Mencía y Graciano. De entre estos cuatro vinos los que mostraron un mayor mDP fueron los monovarietales de Tempranillo.

En la añada 2005 se evaluó el comportamiento varietal de cuatro muestras (W18 - W21). El vino W21, monovietal de Tempranillo presentó el mayor mDP (mDP - M = 5 y mDP - T = 7.7), mientras que el mDP más bajo  $\approx 3.2$  fue atribuido al vino W20 elaborado con un 94 % de Garnacha y 6 % de Merlot. Los otros dos vinos de este grupo (W18 y W19) eran monovarietales de Syrah y presentaron un mDP  $\approx 3.6$ .

De acuerdo con los resultados obtenidos, los vinos monovarietales de Tempranillo proporcionaron vinos con un mayor mDP de taninos. Los *coupages* de Tempranillo con otras variedades como la Cabernet Sauvignon parecen incrementar el mDP de las proantocianidinas mientras que vinos elaborados con mezcla de Garnacha tienden a presentar menor grado de polimerización. Por otro lado, vinos monovarietales de Mencia, Graciano y Syrah presentaron mDP muy similares, estando en torno a cuatro, por lo que parecen existir diferencias en el grado de polimerización que son intrínsecas a la variedad. En la bibliografía aparece descrito como el mDP difiere entre

variedades. Así, Fernández y col.<sup>47</sup> observaron un mDP  $\approx$  13.6 en vinos monovarietales de Carménère y un mDP  $\approx$  8.7 en vinos monovarietales de Cabernet Sauvignon, ambos pertenecientes a la añada 2006. Monagas y col.<sup>16</sup> estudiando el mDP de diferentes vinos de la añada 2000, elaborados con distintas variedades, observaron que el mDP de vinos Tempranillo era 13.0, el mDP de vinos de Graciano era 6.9 y el mDP de vinos de la variedad Cabernet Sauvignon era de 9.0, por lo que estos autores también observaron un mayor mDP en vinos monovarietales de Tempranillo, concordante con lo anotado en este trabajo. Maury y col.<sup>57</sup> estudiaron el mDP de un vino elaborado con 75 % Syrah y 25 % Garnacha (añada 1998) mostrando un mDP de 10.4 y de un vino elaborado con 25 % Syrah y 75 % Garnacha (añada 1998) presentando un mDP de 12.3. En este caso y contrario a lo observado en nuestro trabajo, la variedad Garnacha incrementa el grado de polimerización de los vinos respecto de la variedad Syrah. Además de la variedad, las distintas técnicas de vinificación también influyen considerablemente en el grado de polimerización de los taninos. Así, Sun y col.<sup>18</sup> trabajando con vinos tintos de la variedad Tinta Miuda, de la misma añada pero introduciendo distintas técnicas de vinificación (maceración carbónica, vinificación sin despalillado y vinificación con despalillado), apreciaron un mayor grado medio de polimerización en vinos de maceración carbónica (mDP = 15.6) que en aquellos elaborados en presencia del raspón (mDP = 13.5) y en ausencia del mismo (mDP = 11.1).

### 1.3.7. Análisis sensorial en boca de los vinos

El ANOVA a tres factores calculado para los atributos evaluados en boca por los 32 jueces en los 26 vinos del estudio, con muestras repetidas (jueces considerados como repetición) se presenta en la **Tabla 1.8**. El efecto del factor vino fue significativo ( $P < 0.001$ ) para todos los atributos sensoriales evaluados por los jueces entrenados excepto para el dulzor ( $F = 1.475$ ;  $P = 0.071$ ). Este hecho indica que este atributo no resulta útil para la caracterización de diferencias sensoriales entre este conjunto de vinos. El umbral sensorial de los azúcares reductores se encuentra en el rango de 10 a 50 g/L<sup>58</sup> para el dulzor, sin embargo, todas las muestras estudiadas fueron vinos secos con contenidos en azúcares reductores inferiores a 4 g/L. Esto podría explicar el hecho de que los panelistas no fueran capaces de encontrar diferencias significativas en el atributo dulzor entre los vinos.

**Tabla 1.8.** ANOVAs a tres factores calculados para los atributos evaluados en boca por los 32 jueces en las 26 muestras del estudio.

	Juez (J) (gl = 31)		Vino (W) (gl = 25)		Réplica (R) (gl = 1)		W*J (gl = 775)		W*R (gl = 25)		J*R (gl = 31)	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
<b>Dulce</b>	74.3	<b>&lt;0.001</b>	1.51	0.059	1.60	0.207	1.14	0.071	1.08	0.359	1.08	0.359
<b>Ácido</b>	34.9	<b>&lt;0.001</b>	3.44	<b>&lt;0.001</b>	0.01	0.919	1.12	0.100	1.22	0.217	1.34	0.131
<b>Amargo</b>	43.2	<b>&lt;0.001</b>	1.66	<b>0.027</b>	1.38	0.241	1.18	<b>0.025</b>	2.53	<b>&lt;0.001</b>	1.44	0.051
<b>Astringencia</b>	28.4	<b>&lt;0.001</b>	13.3	<b>&lt;0.001</b>	0.81	0.368	0.99	0.303	1.25	0.211	1.22	0.233
<b>Persistencia</b>	22.9	<b>&lt;0.001</b>	6.48	<b>&lt;0.001</b>	0.53	0.467	1.11	0.112	1.37	0.116	1.30	0.145

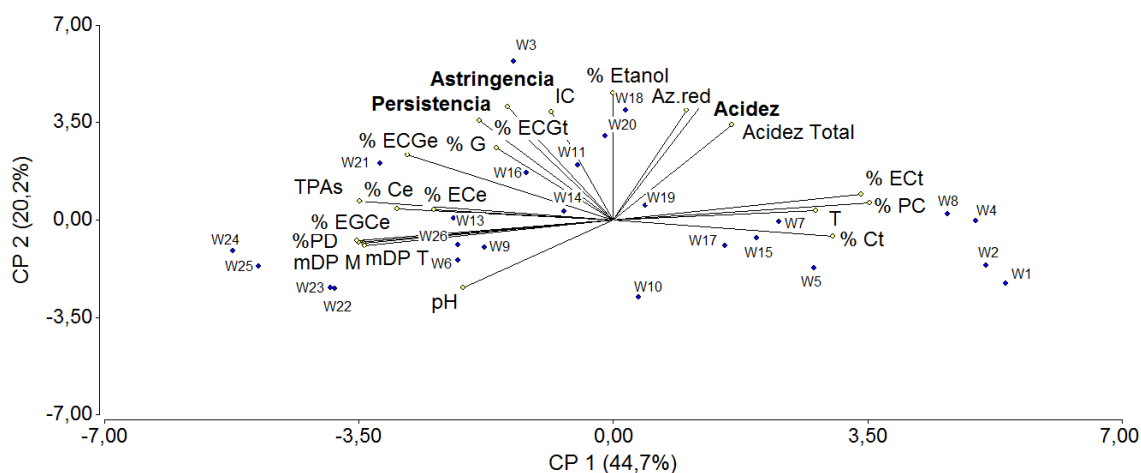
Efectos significativos marcados en negrita; grados de libertad (gl), estadístico F y valores P.

Se verificó que no había diferencias significativas para ninguno de los efectos réplica, indicando una evaluación de los jueces consistente de los atributos y reflejando la reproducibilidad del panel. La interacción vino-réplica fue significativa para el atributo amargor. El análisis de componentes principales (PCA) calculado para este atributo reveló que las proyecciones de los jueces sobre el plano factorial eran muy dispersas, lo que indica que existen diferencias en la interpretación del amargor y que probablemente los panelistas hubiesen necesitado un mayor entrenamiento respecto a este término. Este atributo, por tanto, no se tuvo en cuenta para el análisis de correlaciones entre parámetros químicos y sensoriales. Los atributos astringencia y persistencia estuvieron altamente correlacionados ( $r^2 = 0.46$ ;  $F = 21.94$ ;  $P < 0.0001$ ). Estos resultados están de acuerdo con Sáenz-Navajas y col.<sup>59</sup> ya que ha sido apuntado que la persistencia del vino está principalmente relacionada con la composición fenólica, la cuál es principalmente responsable de la astringencia de los vinos.

### 1.3.8. Correlación química y sensorial

Se aplicó el método de análisis de componentes principales a los datos químicos (parámetros enológicos convencionales, color y composición estructural de las proantocianidinas) y a los datos sensoriales (con excepción del dulzor y del amargor) de las 26 muestras a estudio, para determinar así las correlaciones entre las propiedades organolépticas y la composición química. En la **Figura 1.7** se representa la proyección de las muestras en el plano definido por las dos primeras componentes principales, la cuales explican el 64.9 % de la varianza total.





**Figura 1.7.** Proyección de las variables y las muestras del estudio en el plano bidimensional.

En relación con el color, la tonalidad está inversamente correlacionada con el contenido de PAs ( $r^2 = 0.33$ ;  $F = 13.32$ ;  $P = 0.0013$ ) y con el mDP ( $r^2 = 0.30$   $F = 10.49$ ;  $P = 0.0035$ ). Esto sugiere que los vinos jóvenes presentan un mayor contenido de PAs y mayor mDP mientras que los vinos con más tonalidades amarillas respecto a rojas, presentan un menor contenido de PAs y menor mDP de las PAs. La asociación de una mayor tonalidad con vinos más envejecidos ha sido descrita en varios trabajos<sup>46,60</sup> y está relacionada con la disminución de la concentración de antocianos libres como consecuencia de la formación de pigmentos poliméricos<sup>61</sup> y en cierta medida con la degradación de la malvidina<sup>62</sup> y con las reacciones de oxidación.<sup>63</sup> Bakker y col.<sup>64</sup> encontraron una inter-relación positiva entre la coordenada  $L^*$  y la tonalidad. Por lo que nuestros resultados están de acuerdo con otros autores, como Sáenz-Navajas y col.<sup>65</sup> quienes también comprobaron una correlación inversa entre la coordenada  $L^*$  y el contenido de PAs.

La acidez percibida está correlacionada con la acidez total ( $r^2 = 0.32$ ;  $F = 11.15$ ;  $P = 0.0027$ ), de acuerdo a lo descrito en la literatura.<sup>59,66</sup>

La astringencia está correlacionada con el contenido de etanol ( $r^2 = 0.34$ ;  $F = 13.96$ ;  $P = 0.0010$ ), con el contenido total de PAs medido mediante el índice de la vainillina ( $r^2 = 0.12$ ;  $F = 4.29$ ;  $P = 0.0494$ ), con la intensidad colorante ( $r^2 = 0.32$ ;  $F = 12.96$ ;  $P = 0.0014$ ), con las siguientes unidades procedentes de la reacción de

depolimerización: Ce ( $P = 0.0570$ ), con la ECGe ( $P = 0.0174$ ), con la ECGt ( $P = 0.0108$ ), con el % G ( $P = 0.0792$ ) y con la persistencia ( $P < 0.0001$ ). El etanol ha sido descrito como un desecante oral, lo cual podría explicar su contribución a la sensación de sequedad y dureza de los vinos.<sup>67,68</sup> Respecto a la intensidad colorante, Chira y col.<sup>21</sup> trabajando con vinos de la variedad Cabernet Sauvignon pertenecientes a 24 añadas diferentes también han observado correlación entre este parámetro y la astringencia percibida. Por otra parte, la correlación del contenido en PAs con la astringencia ha sido ampliamente descrita y ha sido atribuida a la interacción de éstas con las proteínas de la saliva.<sup>69,70</sup> Esta propiedad es conocida por variar con la estructura y grado de polimerización de las proantocianidinas, resultando ser las de mayor peso molecular las que más contribuyen a la sensación de la astringencia.<sup>71</sup> Ha sido descrito en varios trabajos que la astringencia se incrementa a medida que aumenta el contenido o la concentración en compuestos polifenólicos.<sup>72-74</sup> En el presente trabajo no se han encontrado correlaciones significativas entre la astringencia y el grado medio de polimerización. Chira y col.<sup>21</sup> han observado una alta significatividad entre el mDP y la astringencia ( $P = 0.000$ ) en vinos de la variedad Merlot mientras que en vinos de la variedad Cabernet Sauvignon la significatividad fue más baja ( $P = 0.051$ ). En la bibliografía existen resultados contradictorios respecto a este parámetro. Chira y col.<sup>50</sup> anotan que el mDP es un buen parámetro para estimar la astringencia de los vinos mientras que Wollman y col.<sup>19</sup> han demostrado recientemente que tanto el mDP como el grado de galoilación no muestran una influencia significativa en la percepción de la astringencia. Por el contrario, Vidal y col.<sup>5</sup>, estudiando proantocianidinas presentes en uvas y manzanas afirman que ambos parámetros (mDP y porcentaje de galoilación) juegan un papel importante en la astringencia. A partir de los resultados obtenidos en este estudio, el porcentaje de unidades galoiladas, bien en posición terminal o de extensión parecen mostrar influencia en la astringencia y en la persistencia de los vinos. Diversos estudios han mostrado como el % G marca diferencias notables en la astringencia percibida.<sup>5,56,71,75</sup> También ha sido estudiada la contribución de las distintas unidades terminales y de extensión a la astringencia percibida, obteniéndose resultados contradictorios. Así, Quijada-Morín y col.<sup>76</sup> establecen una correlación significativa positiva entre las unidades ECE y GCt con la astringencia mientras que las unidades de EGC tanto de extensión como terminales reducen la astringencia percibida. En ese estudio no se encontraron correlaciones entre las unidades galoilados y la astringencia;

sin embargo, en un trabajo posterior, estos autores<sup>44</sup> encontraron que la ECGt si que mostraba correlación con la astringencia.

La persistencia mostró correlación con la astringencia y por lo tanto está correlacionada con los mismos compuestos citados en el caso de la astringencia.

## 1.4. CONCLUSIONES

En este trabajo se propone un método alternativo utilizando MALDI-TOF MS, rápido y sencillo para la determinación del mDP de proantocianidinas presentes en vinos sin necesidad de llevar a cabo la reacción de depolimerización, que supone mayor trabajo teniendo en cuenta el tiempo empleado en la preparación de reactivos, rectas de calibrado e integración de picos.

Los vinos envejecidos presentaron un menor mDP, observándose en vinos jóvenes grados de polimerización de hasta diez unidades, por lo que este parámetro puede servir como marcador de la añada. De hecho, en este trabajo se proponen dos ecuaciones que permiten estimar el mDP de vinos españoles a partir de la añada.

La concentración de PAs estuvo correlacionada con el mDP, estableciéndose tres grupos diferentes de vinos. El efecto de la variedad en el mDP fue tentativamente estudiado observándose como vinos monovarietales de Tempranillo, Graciano y Mencía presentan un mayor mDP que vinos de la variedad Garnacha.

En el plano sensorial la astringencia no mostró correlación con el mDP pero sí con el contenido en etanol, con el contenido total de PAs, con las siguientes unidades procedentes de la reacción de depolimerización: Ce, ECGe, ECGt y el porcentaje de galatos, por lo que vinos con mayor contenido polifenólico y más alcohólicos son percibidos más astringentes.

## 1.5. REFERENCIAS

- (1) Somers, T.C. The polymeric nature of wine pigments *Phytochemistry* **1971**, *10*, 2175-2186.
- (2) Sun, B.S., Pinto, T., Leandro, M.C., Ricardo-Da-Silva, J.M., Spranger, M.I. Transfer of catechins and proanthocyanidins from solid parts of the grape cluster into wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **1999**, *50*, 179-184.
- (3) Cheynier, V.; Prieur, C.; Guyot, S.; Rigaud, J.; Moutounet, M. The structures of tannins in grapes and wines and their interactions with proteins, In *Wine: Nutritional and Therapeutic Benefits*, Watkings, T.R., Ed.; American Chemical Society: Washington, USA, **1997**; pp. 81-93.
- (4) Kennedy, J.A.; Troup, G.J.; Pilbrow, J.R.; Hutton, D.R.; Hewitt, D.; Hunter, C.R.; Ristic, R.; Iland, P.G.; Jones, G.P. Development of seed polyphenols in berries from *Vitis vinifera* L. cv. Shiraz. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2000**, *6*, 244-254.
- (5) Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E.J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2003**, *83*, 564-573.
- (6) Brossaud, F.; Cheynier, V.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2001**, *7*, 33-39.
- (7) Aron, P.M.; Kennedy, J.A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. *Molecular Nutrition and Food Research* **2008**, *52*, 79-104.
- (8) Porter, L.J. Flavans and proanthocyanidins, In *The flavonoids. Advances in research since 1980*, Harborne, J.B., Ed.; Chapman and Hall: London, **1988**; pp. 21-62.
- (9) Labarbe, B.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Souquet, J.M.; Moutounet, M. Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 2719-2723.
- (10) Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 781-784.
- (11) Souquet, J.M.; Cheynier, V.; Brossaud, F.; Moutounet, M. Polymeric proanthocyanidins from grape skins. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 509-512.
- (12) Monagas, M.; Hernández-Ledesma, B.; Garrido, I.; Martín-Álvarez, P.J.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Quality assessment of commercial dietary antioxidant products from *Vitis vinifera* L. grape seeds. *Nutrition and Cancer* **2005**, *53*, 244-254.
- (13) Hümmer, W.; Schreier, P. Analysis of proanthocyanidins. *Molecular Nutrition and Food Research* **2008**, *52*, 1381-1398.

- (14) Kennedy, J.A.; Jones, G.P. Analysis of proanthocyanidin cleavage products following acid-catalysis in the presence of excess phloroglucinol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 1740-1746.
- (15) Gu, L.; Kelm, M.A.; Hammerstone, J.F.; Beecher, G.; Holden, J.; Haytowitz, D.; Prior, R.L. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LCMS/MS and thiolytic degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 7513-7521.
- (16) Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo Da Silva, J.M. Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 6475-6481.
- (17) Cosme, F.; Ricardo-Da-Silva, J.M.; Laureano, O. Tannin profiles of *Vitis vinifera* L. cv. red grapes growing in Lisbon and from their monovarietal wines. *Food Chemistry* **2009**, *112*, 197-204.
- (18) Sun, B.; Spranger, I.; Roque-do-Vale, F.; Leandro, C.; Belchior, P. Effect of different winemaking technologies on phenolic composition in Tinta Miúda red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 5809-5816.
- (19) Wollmann, N.; Hofmann, T. Compositional and sensory characterization of red wine polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 2045-2061.
- (20) Fulcrand, H.; Remy, S.; Souquet, J.M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 1023-1028.
- (21) Chira, K.; Pacella, N.; Jourdes, M.; Teissedre, P.L. Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1971-1977.
- (22) Maury, C.; Sarni-Manchado, P.; Lefebvre, S.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Influence of fining with plant proteins on proanthocyanidin composition of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2003**, *54*, 105-111.
- (23) Sun, B.; Leandro, C.; Ricardo Da Silva, J.M.; Spranger, I. Separation of Grape and Wine Proanthocyanidins According to Their Degree of Polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 1390-1396.
- (24) Hammerstone, J.F.; Lazarus, S.A.; Mitchell, A.E.; Rucker, R.; Schmitz, H.H. Identification of procyanidins in cocoa (*Theobroma cacao*) and chocolate using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 490-496.
- (25) Lazarus, S.A.; Hammerstone, J.F.; Adamson, G.E.; Schmitz, H.H. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry analysis of proanthocyanidins in food and beverages. *Methods in Enzymology* **2001**, *335*, 46-57.

- (26) Guyot, S.; Doco, T.; Souquet, J.M.; Moutounet, M.; Drilleau, J.F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. Kermerrien) skin and pulp. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 351-357.
- (27) Cheynier, V.; Doco, T.; Fulcrand, H.; Guyot, S.; Le Roux, E.; Souquet, J.M.; Rigaud, J.; Moutounet, M. ESI-MS analysis of polyphenolic oligomers and polymers. *Analisis* **1997**, *25*, M32-M37.
- (28) Monagas, M.; Quintanilla-López, J.E.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Lebrón-Aguilar, R. MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51*, 358-372.
- (29) Guadalupe, Z.; Soldevilla, A.; Sáenz-Navajas, M.P.; Ayestarán, B. Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel permeation chromatography fractionation. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112*, 112-120.
- (30) O.I.V. Recueil des methods internationales d'analyse des vins et des mouts. Vienne, **2005**.
- (31) Glories, Y. La couleur des vins rouges. 1re Partie. Equilibres des anthocyanes et des tanins. 1984, *18*, 195–217. *Connaissance de la Vigne et du Vin* **1984**, *18*, 195-217.
- (32) Vivas, N.; Nonier, M.-.; Vivas De Gaulejac, N.; Absalon, C.; Bertrand, A.; Mirabel, M. Differentiation of proanthocyanidin tannins from seeds, skins and stems of grapes (*Vitis vinifera*) and heartwood of Quebracho (*Schinopsis balansae*) by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and thioacidolysis/liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 247-256.
- (33) Sáenz-Navajas, M.P.; Martín-López, C.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2011**, *17*, 9-19.
- (34) ISO NORM 3591; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, **1977**.
- (35) Colonna, A.E.; Adams, D.O.; Noble, A.C. Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2004**, *10*, 26-31.
- (36) Ribereau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. *Traité d'oenologie 2. Chimie du vin stabilisation et traitements*. Dunod: Paris, **1998**.
- (37) Ohnishi-Kameyama, M.; Yanagida, A.; Kanda, T.; Nagata, T. Identification of catechin oligomers from apple (*Malus pumila* cv. Fuji) in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and fast-atom bombardment mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **1997**, *11*, 31-36.

- (38) Krueger, C.G.; Dopke, N.C.; Treichel, P.M.; Folts, J.; Reed, J.D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of polygalloyl polyflavan-3-ols in grape seed extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 1663-1667.
- (39) Yang, Y.; Chien, M. Characterization of grape procyanidins using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2000**, *48*, 3990-3996.
- (40) Taylor, A.W.; Barofsky, E.; Kennedy, J.A.; Deinzer, M.L. Hop (*Humulus lupulus* L.) proanthocyanidins characterized by mass spectrometry, acid catalysis, and gel permeation chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 4101-4110.
- (41) Krueger, C.G.; Vestling, M.M.; Reed, J.D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of heteropolyflavan-3-ols and glucosylated heteropolyflavans in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 538-543.
- (42) Li, C.; Leverence, R.; Trombley, J.D.; Xu, S.; Yang, J.; Tian, Y.; Reed, J.D.; Hagerman, A.E. High molecular weight persimmon (*Diospyros kaki* L.) proanthocyanidin: A highly galloylated, a-linked tannin with an unusual flavonol terminal unit, myricetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 9033-9042.
- (43) McRae, J.M.; Schulkin, A.; Kassara, S.; Holt, H.E.; Smith, P.A. Sensory Properties of Wine Tannin Fractions: Implications for In-Mouth Sensory Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 719-727.
- (44) Quijada-Morín, N.; Williams, P.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Doco, T.; Escribano-Bailón, M.T. Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry* **2014**, *154*, 44-51.
- (45) Cadot, Y.; Caillé, S.; Samson, A.; Barbeau, G.; Cheynier, V. Sensory representation of typicality of Cabernet franc wines related to phenolic composition: Impact of ripening stage and maceration time. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *732*, 91-99.
- (46) Drinkine, J.; Lopes, P.; Kennedy, J.A.; Teissedre, P.L.; Saucier, C. Ethylidene-bridged flavan-3-ols in red wine and correlation with wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 6292-6299.
- (47) Fernández, K.; Kennedy, J.A.; Agosin, E. Characterization of *Vitis vinifera* L. Cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 3675-3680.



- (48) Jerez, M.; Sineiro, J.; Guitián, E.; Núñez, M.J. Identification of polymeric procyanidins from pine bark by mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* **2009**, *23*, 4013-4018.
- (49) Mané, C.; Sommerer, N.; Yalcin, T.; Cheynier, V.; Cole, R.B.; Fulcrand, H. Assessment of the molecular weight distribution of tannin fractions through MALDI-TOF MS analysis of protein-tannin complexes. *Analytical Chemistry* **2007**, *79*, 2239-2248.
- (50) Chira, K.; Jourdes, M.; Teissedre, P.L. Cabernet sauvignon red wine astringency quality control by tannin characterization and polymerization during storage. *European Food Research and Technology* **2012**, *234*, 253-261.
- (51) Timberlake, C.F.; Bridle, P. Interactions between anthocyanins, phenolic compounds and acetaldehyde and their significance in red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1976**, *27*, 97-105.
- (52) Haslam, E. In vino veritas: oligomeric procyanidins and the ageing of red wines. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2577-2582.
- (53) Dallas, C.; Ricardo-Da-Silva, J.M.; Laureano, O. Degradation of oligomeric procyanidins and anthocyanins in a Tinta Roriz red wine during maturation. *Vitis* **1995**, *34*, 51-56.
- (54) Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture* **2001**, *52*, 67-87.
- (55) Rivas-Gonzalo, J.C.; Bravo-Haro, S.; Santos-Buelga, C. Detection of compounds formed through the reaction of malvidin 3-monoglucoside and catechin in the presence of acetaldehyde. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1995**, *43*, 1444-1449.
- (56) Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, *79*, 1123-1128.
- (57) Maury, C.; Sarni-Manchado, P.; Lefebvre, S.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Influence of fining with different molecular weight gelatins on proanthocyanidin composition and perception of wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2001**, *52*, 140-145.
- (58) Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 9190-9199.
- (59) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Fernández-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 1139-1149.

- (60) Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B. Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle: I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins. *European Food Research and Technology* **2005**, *220*, 607-614.
- (61) Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 238-254.
- (62) Lopes, P.; Richard, T.; Saucier, C.; Teissedre, P.L.; Monti, J.P.; Glories, Y. Anthocyanone A: A quinone methide derivative resulting from malvidin 3-O-glucoside degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 2698-2704.
- (63) Monagas, M.; Bartolomé, B.; Gómez-Cordovés, C. Updated knowledge about the presence of phenolic compounds in wine. *Critical Review in Food Science and Nutrition* **2005**, *45*, 85-118.
- (64) Bakker, J.; Bridle, P.; Timberlake, C.F. Tristimulus measurements (CIELAB 76) of port wine colour. *Vitis* **1986**, *25*, 67-78.
- (65) Sáenz-Navajas, M.P.; Tao, Y.S.; Dizy, M.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 12407-12416.
- (66) Sáenz-Navajas, M.P.; Ferreira, V.; Dizy, M.; Fernández-Zurbano, P. Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *673*, 151-159.
- (67) Jones, P.R.; Gawel, R.; Francis, I.L.; Waters, E.J. The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 596-607.
- (68) Blackman, J.; Rutledge, D.N.; Tesic, D.; Saliba, A.; Scollary, G.R. Examination of the potential for using chemical analysis as a surrogate for sensory analysis. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *660*, 2-7.
- (69) Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, J.M.; Rozés, N.; Arola, L.; Zamora, F. New Method for Evaluating Astringency in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 742-746.
- (70) Llaudy, M.C.; Canals, R.; González-Manzano, S.; Canals, J.M.; Santos-Buelga, C.; Zamora, F. Influence of micro-oxygenation treatment before oak aging on phenolic compounds composition, astringency, an color of red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 4246-4252.
- (71) Gawel, R.; Iland, P.G.; Francis, I.L. Characterizing the astringency of red wine: A case study. *Food Quality and Preference* **2001**, *12*, 83-94.

- (72) Monteleone, E.; Condelli, N.; Dinnella, C.; Bertuccioli, M. Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference* **2004**, *15*, 761-769.
- (73) Mercurio, M.D.; Smith, P.A. Tannin quantification in red grapes and wine: Comparison of polysaccharide- and protein-based tannin precipitation techniques and their ability to model wine astringency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 5528-5537.
- (74) Kennedy, J.A.; Ferrier, J.; Harbertson, J.F.; Peyrot Des Gachons, C. Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *American Journal of Enology and Viticulture* **2006**, *57*, 481-485.
- (75) Landon, J.L.; Weller, K.; Harbertson, J.F.; Ross, C.F. Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington State red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2008**, *59*, 153-158.
- (76) Quijada-Morín, N.; Regueiro, J.; Simal-Gándara, J.; Tomás, E.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12355-12361.





# **CAPITULO 2.**

**ESTUDIO DEL SABOR Y DE LAS  
SENSACIONES EN BOCA DE LAS  
PROANTOCIANIDINAS PRESENTES EN  
VINOS TINTOS Y SU RELACIÓN  
CON LA COMPOSICIÓN QUÍMICA**





## 2.1. ANTECEDENTES

La relación existente entre la evaluación sensorial y la composición no volátil de los vinos, en especial de los vinos tintos, es un punto clave a estudio en la investigación enológica actual.<sup>1-6</sup> Respecto a la composición no volátil de los vinos tintos, los compuestos polifenólicos juegan un papel crucial debido a su contribución sensorial, mostrando propiedades orosensoriales tales como amargor y astringencia. Esta última ha sido descrita como un atributo sensorialmente relevante en la calidad de los vinos tintos.<sup>7,8</sup> La astringencia es una sensación oral compleja que ha sido denotada por los enólogos y expertos en vinos con diferentes términos tales como sequedad, rugosidad, aspereza, sedosidad... Gawel y col.<sup>9</sup> desarrollaron una terminología jerarquizada de las sensaciones en boca para de este modo disponer de distintos atributos o sub-cualidades para definir la astringencia. Estos términos son recogidos en “La rueda de las sensaciones en boca” (“*The mouth-feel wheel*”). Conocer la relación entre la composición química y las distintas sub-cualidades de la astringencia en los vinos permitiría ampliar el conocimiento sobre la base química de la astringencia y disponer de herramientas para la elaboración de diferentes tipos de vinos tintos. La estrategia seguida para la determinación de los compuestos sensorialmente activos en el vino u otras bebidas y alimentos ha sido el fraccionamiento de los mismos, la evaluación sensorial de las fracciones obtenidas y su posterior caracterización química.<sup>5,10-13</sup>

Las proantocianidinas (PAs) o taninos condensados son flavonoides oligoméricos o poliméricos compuestos por unidades de flavan-3-oles unidos mediante enlaces C-C. Son principalmente los taninos de más de cuatro unidades los que se asocian con la astringencia.<sup>11,14</sup> Diversos trabajos sugieren una correlación positiva entre la astringencia y la concentración de PAs.<sup>1,15-18</sup> Además de la cantidad de PAs, también el tamaño y la composición de estas moléculas parecen afectar a la astringencia percibida y a sus sub-cualidades. En este contexto, Gawel y col.<sup>15</sup> anotan que las sub-cualidades de la astringencia están relacionadas con el contenido en polifenoles. Jones y col.<sup>19</sup> han observado que la composición fenólica polimérica está relacionada con atributos táctiles tales como la rugosidad y sequedad en boca. Hufnagel y Hofmann<sup>4</sup> describieron con el término astringencia rugosa una fracción polimérica de peso molecular mayor de 5 kDa. Trabajos de otros autores<sup>1,10</sup> realizados en esta dirección,

han establecido que el grado medio de polimerización está positivamente correlacionado con la astringencia y que un incremento en la galoilación de las subunidades de las PAs podría ser responsable del incremento de la sub-cualidad aspereza mientras que la tri-hidroxilación del anillo-B podría disminuir esta percepción. Quijada-Morin y col.<sup>20</sup> estudiando las proantocianidinas presentes en vinos, confirmaron que la astringencia de los vinos se ve más afectada por la composición de las subunidades de PAs que por la concentración total o el grado medio de polimerización encontrado.

Aunque los flavan-3-oles monómeros, dímeros y trímeros no parecen contribuir a la astringencia, otros compuestos no volátiles de bajo peso molecular como algunos ácidos fenólicos, ciertos flavonoles y el ácido aconítico pueden contribuir junto con las PAs a la astringencia percibida por los panelistas tanto en fracciones vínicas como en los propios vinos.<sup>4,5,21,22</sup>

En este contexto, una cuestión no resuelta es determinar la contribución cuantitativa y cualitativa (sub-cualidades) de la fracción tánica en la astringencia percibida en diferentes vinos. Así, los objetivos del presente trabajo han sido: 1) explorar las propiedades sensoriales relacionadas con el sabor, la astringencia y la persistencia de la fracción proantociánica obtenida a partir de vinos tintos; 2) determinar si las propiedades sensoriales de la fracción proantociánica obtenida muestra correlación con las propiedades sensoriales percibidas en los vinos; 3) evaluar el efecto de la composición química de estas fracciones en las propiedades sensoriales percibidas.



## 2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.2.1. Reactivos

Todos los compuestos químicos utilizados fueron de calidad analítica y todos los disolventes cromatográficos utilizados fueron de grado HPLC. El agua ultrapura fue obtenida a partir del sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia). El metanol, etanol, acetona, diclorometano y ácido sulfúrico fueron adquiridos en Scharlab (Barcelona, España). El ácido tánico, vainillina, 6-propil-2-tiouracil, tolueno- $\alpha$ -tiol, (-)-epicatequina-3-*O*-galato (ECG), carbonato de cesio, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ácido fórmico, ácido clorhídrico y ovoalbúmina (V-grade) fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). (+)-Catequina, (C), (-)-epicatequina (EC), (-)-epigallocatequina (EGC) y quercetina-3-*O*-galactósido fueron adquiridos en Extrasynthese (Genay, Francia). El sulfato de quinina dihidrato se obtuvo en Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemania). El ácido tartárico, sulfato de potasio y aluminio y cloruro de sodio fueron adquiridos en Panreac (Barcelona, España). TSK Toyopearl gel HW-50F fue suministrado por TosoHaas (Montgomeryville, PA, U.S.A).

### 2.2.2. Muestras

Con el fin de seleccionar vinos tintos jóvenes con diferencias significativas en la composición fenólica y en la astringencia percibida, se analizaron 35 vinos tintos jóvenes comerciales procedentes de diferentes denominaciones de origen y bodegas. De entre ellos, seis vinos fueron seleccionados para el estudio en base a sus diferencias significativas en el índice de polifenoles totales (IPT), en las proantocianidinas precipitables con proteínas y en la astringencia percibida.

### 2.2.3. Preparación de muestra

#### 2.2.3.1. Eliminación de los compuestos volátiles de los vinos

Los seis vinos fueron desalcoholizados y desaromatizados de acuerdo con el método descrito por Sáenz-Navajas y col.<sup>22</sup> con el fin de obtener una fracción inodora de cada vino. Para ello, se tomaron 50 mL de vino y se llevaron al rotavapor (26 °C, 15 min), de manera que se eliminaron el etanol y los compuestos más volátiles. A continuación se congeló la muestra a -80 °C y se liofilizó en un matraz esférico

de 250 mL. Una vez terminado el proceso, el liofilizado se extrajo con 3 x 10 mL de diclorometano para eliminar los compuestos volátiles remanentes. A continuación, el diclorometano se eliminó completamente haciendo pasar a través de la muestra una corriente de nitrógeno puro (50 mL/min aprox.) durante 20 min. La ausencia total de diclorometano se comprobó empleando la técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME) (Carboxen/PDMS 75  $\mu\text{m}$  a 30 °C x 10 min) y cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica (límite de detección del sistema es de 1 ng/muestra) (Hewlett-Packard G1800 C, GCD Series II, Palo Alto, CA, U.S.A). El extracto obtenido se disolvió en 2 mL de etanol/agua (13:87, v/v) y se usó para el siguiente fraccionamiento.

### **2.2.3.2. Fraccionamiento. Aislamiento de las proantocianidinas**

El gel TSK Toyopearl HW-50F se empaquetó en una columna Millipore (Bedford, MA, U.S.A) Vantage L (120mm  $\times$  12mm d.i.) a presión atmosférica. La columna se conectó a una bomba peristáltica (Agilent 61311A), a un inyector Rheodyne (5 mL) y a un detector de fila de diodos (Agilent, G1315D) controlado por el software Agilent Chemstation. Dos mililitros (2 mL) del extracto previamente obtenido, libre de compuestos volátiles, fue directamente inyectado a un flujo de 2 mL/min. El método de fraccionamiento fue adaptado del publicado por Guadalupe y col.<sup>23</sup> Los compuestos de bajo peso molecular (azúcares, ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, antocianos, flavanoles y flavonoles) fueron eluidos con 240 mL de etanol/agua/ácido fórmico (55:45:1 v/v/v) y manualmente recogidos en matraces esféricos de 500 mL. El etanol fue evaporado a vacío y los compuestos presentes en esta fracción fueron liofilizados ya que son el objetivo del siguiente capítulo. Los compuestos de alto peso molecular se eluyeron con 40 mL de acetona/agua (60:40, v/v) y se recogieron en matraces esféricos de 250 mL. Previo a una nueva inyección, la columna fue pre-acondicionada con etanol/agua/ácido fórmico (55:45:1 v/v/v). La acetona presente en la segunda fracción fue evaporada a vacío, seguidamente la fracción proantociánica (PAsF) fue liofilizada hasta obtener un polvo de taninos y posteriormente redisuelta en 32 mL de agua embotellada Solán de Cabras. Las fracciones fueron almacenadas a 4 °C hasta que se llevó a cabo el análisis sensorial. Para tener volumen suficiente para dar a los catadores, cada vino fue fraccionado siete veces. Los análisis químicos se realizaron llevando las muestras a la misma concentración que los vinos originales. Ambos análisis, sensorial y químico, se realizaron simultáneamente y en un periodo de 3 meses.

## **2.2.4. Análisis Químicos**

### **2.2.4.1. Determinación de parámetros enológicos convencionales**

El índice de polifenoles totales (IPT) se estimó como la absorbancia a 280 nm multiplicado por 100.<sup>24</sup> El análisis de azúcares reductores, el grado alcohólico, el pH, la acidez total y la acidez volátil se determinaron mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (IR-FT) con el instrumento WineScan™ FT 120 (FOSS®, Barcelona, España), previamente calibrado de acuerdo a los métodos oficiales de la OIV.<sup>25</sup>

### **2.2.4.2. Análisis de proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs)**

Este método se basa en la gran capacidad que tiene la ovoalbúmina, proteína extraída del huevo, para captar y precipitar taninos, por lo que habitualmente se emplea para clarificar vinos. Mediante este procedimiento se determina la astringencia de las muestras por medio de disoluciones de ovoalbúmina de distintas concentraciones (0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4, 3.2 y 4.0 g/L) como agente precipitante y empleando disoluciones de ácido tánico (0, 2.0, 4.0, 6.0 y 8.0 g/L) como estándares. Ambas se disuelven en vino sintético (4 g/L de ácido tartárico, 12 % de etanol v/v, ajustados a pH = 3.5 con NaOH). Estas disoluciones de ovoalbúmina-ácido tánico se centrifugan y se mide la absorbancia de los sobrenadantes, es decir, de los taninos (PAs) no precipitados por la ovoalbúmina. A partir de la pendiente obtenida en cada una de las rectas se construye la recta de calibrado, sobre la que se interpolan los valores de las absorbancias de los vinos tal y como describe Llaudy y col.<sup>26</sup> Este análisis se llevó a cabo en los vinos y en las fracciones proantociánicas obtenidas. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C) y por triplicado.

### **2.2.4.3. Análisis de la fracción proantociánica mediante MALDI-TOF MS**

La metodología seguida para el análisis de las proantocianidinas mediante MALDI-TOF MS ha sido descrita en el apartado 1.2.5.1. Para este análisis la fracción de PAs fue disuelta en metanol y las medidas se realizaron estando presente la muestra en la misma concentración que el vino original.

#### **2.2.4.4. Análisis de la fracción proantocianica mediante tiólisis-UPLC UV/Vis-MS**

La metodología seguida para el análisis de las proantocianidinas mediante la reacción de tiólisis y la posterior determinación y cuantificación de los monómeros terminales y de extensión ha sido descrita en el apartado 1.2.5.2.1.

#### **2.2.4.5. Análisis de las proantocianidinas totales (TPAs)**

El análisis de las proantocianidinas totales se llevó a cabo siguiendo la metodología de trabajo detallada en el apartado 1.2.5.2.2.

### **2.2.5. Análisis sensorial**

#### **2.2.5.1. Selección del panel sensorial**

Un total de 18 personas (12 hombres y 6 mujeres, de edades comprendidas entre 21 y 45 años), todos ellos, estudiantes o personal de la Universidad de La Rioja fueron seleccionados de entre 34 personas en base a su habilidad en la detección del sabor amargo usando el compuesto 6-n-propil tiouracil (PROP). Para ello, se llevó a cabo el Test de Tepper<sup>27</sup> el cual consiste en comparar las sensaciones percibidas al probar tres disoluciones de NaCl (0.01 mol/L, 0.1 mol/L y 1 mol/L) y tres disoluciones de PROP (0.032 mmol/L, 0.32 mmol/L y 3.2 mmol/L), permitiendo en base a estos resultados la clasificación de los panelistas entre super-catadores, catadores medios y no catadores. Este test se hizo por duplicado, descansando diez minutos entre cada test. Para evaluar la validez de la comparación entre grupos, se utilizó la escala “*Labeled Magnitude Scale*” (**Anexo III**) y las instrucciones para el uso de esta escala fueron dadas de acuerdo al protocolo descrito por Green y col.<sup>28</sup> El procedimiento usado en la preparación de las disoluciones y en el procesado de los resultados fue el utilizado por Tepper y col.<sup>27</sup> Los panelistas que puntuaron las disoluciones de NaCl con mayor intensidad que las de PROP fueron considerados no catadores. Aquellos que proporcionaron puntuaciones similares a ambas disoluciones se consideraron catadores y los que percibieron más intensamente las disoluciones de PROP respecto a las de NaCl fueron considerados super-catadores.<sup>27</sup> En el **anexo IV** se recogen las gráficas representativas de cada uno de los grupos. El panel sensorial estuvo compuesto por 3 super-catadores y por 15 catadores.

### 2.2.5.2. Entrenamiento del panel

El periodo de entrenamiento se realizó en dos fases: una fase de entrenamiento general y otra correspondiente a un entrenamiento específico. Durante el entrenamiento general, diferentes disoluciones representativas de sabores y de sensaciones en boca como la astringencia fueron presentadas al panel, como ha sido descrito en el apartado 1.2.6.2, para así ayudarles en la discriminación y en el reconocimiento de las distintas sensaciones orales. Durante el periodo de entrenamiento específico, se presentaron a los panelistas diferentes vinos tintos españoles. Para la evaluación de los vinos se utilizó un único estándar de referencia para el atributo astringencia, sulfato de potasio y aluminio. Otro entrenamiento específico fue llevado a cabo con la fracción proantocianina. Para ello, diferentes fracciones de PAs obtenidas como se ha descrito en el apartado 2.3.2 del presente capítulo fueron presentadas a los panelistas y se evaluaron las diferentes sub-cualidades del atributo astringencia. Los panelistas describieron con sus propias palabras las sensaciones orales percibidas en las fracciones de proantocianidinas procedentes de vinos. Se debatió entre los panelistas y el líder los descriptores y se acordaron las definiciones y los estándares de referencia para los términos seleccionados (**Tabla 2.1**). La escala utilizada para la evaluación de los atributos, astringencia sedosa, rugosa y secante fue de 10 puntos (0 = “ausencia”, 1 = “muy bajo” y 9 = “muy alto”).

**Tabla 2.1.** Definiciones y estándares de referencia para el entrenamiento del panel en distintas sub-cualidades del atributo astringencia.

Atributo	Definición	Referencia <sup>a</sup>	Concentración
Astringencia sedosa	Sensación astringente de textura sedosa y fina. Percibido en la punta de la lengua y enfrente de los dientes superiores.	Quercetina-3- <i>O</i> -galactósido <sup>29</sup>	0 - 2.5 - 5 - 7.5 - 10 mg/L
Astringencia rugosa	Una acción refleja de las superficies de los carrillos que se contraen y sueltan en un intento de lubricar las superficies de la boca. Percibido por toda la lengua, incluyendo laterales y el paladar.	Ácido tánico <sup>29</sup>	0 - 0.01 - 0.1 - 0.5 - 0.8 g/L
Astringencia secante	Sensación de deshidratación o falta de lubricación. Percibida en todas las partes de la boca.	Sulfato de potasio y aluminio <sup>8</sup>	0 - 1. - 2 - 3 - 4 g/L

<sup>a</sup>Disuelto en agua mineral “Solán de Cabras”

### 2.2.5.3. Evaluación de las muestras

Los seis vinos (10 mL) y las seis fracciones de PAs (4 mL), fueron descritos por duplicado y en dos sesiones, una sesión por cada tipo de muestra y después de cada uno de los entrenamientos específicos realizados. Para los ensayos se emplearon copas negras normalizadas<sup>30</sup>, cubiertas por placas Petri. Las muestras se presentaron codificadas con números de tres cifras y se colocaron en orden aleatorio para evitar así sesgos en la evaluación.

Durante la evaluación, los panelistas siguieron el protocolo de enjuague propuesto por Colonna y col.<sup>31</sup> (**Anexo II**). Todas las muestras se sirvieron a temperatura ambiente y se evaluaron en cabinas individuales. Los panelistas no fueron informados previamente de la naturaleza de las muestras a evaluar.

### 2.2.6. Análisis estadístico

Se calcularon regresiones lineales simples entre las variables químicas y sensoriales. Las diferencias significativas se comprobaron mediante el test de Tukey para un umbral de error del 5% ( $P < 0.05$ ). Con las muestras evaluadas por duplicado por el panel, se evaluó la consistencia del panel calculando para cada atributo un ANOVA a tres factores, con los factores fijos: fracción (F), juez (J) y réplica (R). Las diferencias significativas entre atributos para las muestras se determinaron aplicando el análisis de varianza (ANOVA) a un factor con medidas repetidas (los jueces se tomaron como repeticiones). El análisis de componentes principales (PCA) y regresiones lineales múltiples (MLR) se realizaron con los datos químicos y sensoriales que resultaron significativos, empleando el software SPSS 15.0. (Inc., Chicago, IL) y Unscrambler 9.7 (CAMO, Trondheim, Noruega).

## **2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **2.3.1. Vinos**

La lista detallada de los vinos estudiados incluida la denominación de origen, variedad, añada y algunos parámetros enológicos clásicos se muestran en la **Tabla 2.2**.

Los seis vinos seleccionados fueron vinos tintos jóvenes españoles pertenecientes a las añadas 2007 y 2008. Los valores de graduación alcohólica encontrados en estos vinos (12.5 - 14.5 %) son muy similares a los presentes en otros vinos tintos españoles. El contenido de azúcares reductores encontrado fue inferior a 2 g/L excepto en el vino W3, el cual presentó 4 g/L, siendo, no obstante, también clasificado como un vino seco. Los valores de pH se encontraron en el rango de 3.5 a 3.9, mientras que el menor valor de acidez total correspondió al vino W6 (4.33 g/L). Los vinos W5 y W6 presentaron los valores más altos de índice de polifenoles totales (IPT) y un mayor contenido de proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs).

**Tabla 2.2.** Procedencia, añada, composición varietal, análisis convencionales (etanol, pH, acidez volátil, acidez total y azúcares reductores), índice de polifenoles totales (IPT), proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs) y puntuación de astringencia (Ast) en los seis vinos seleccionados para el estudio.

Vinos	Procedencia	Añada	Varietal	Etanol % (v/v)	pH	Acidez volátil (g/L) <sup>a</sup>	Acidez total (g/L) <sup>a</sup>	Azúcares reductores (g/L)	IPT <sup>b</sup>	PPAs (mg/L) <sup>c</sup>	Ast <sup>d</sup>
W1	Rioja	2008	Tempranillo	12.0	3.62	0.32	4.81	1.18	30.0	105	3.16
W2	VT Cangas	2008	Mencia. Albarín negro	12	3.47	0.31	5.05	1.22	36.8	220	3.37
W3	Valencia	2008	Bobal. Syrah	12.5	3.54	0.30	5.25	3.98	40.8	334	4.22
W4	VT Castilla y León	2007	Tempranillo	13	3.57	0.31	5.14	1.66	55.3	503	4.59
W5	Valdepeñas	2008	Tempranillo	13.5	3.73	0.26	5.33	1.59	59.0	679	5.65
W6	Toro	2008	Tempranillo	14.5	3.89	0.36	4.33	1.69	62.5	966	6.43

<sup>a</sup>Expresado en gramos de ácido tartárico por litro. <sup>b</sup>Expresado en unidades de absorbancia. <sup>c</sup>Expresado como miligramos de ácido tánico por litro. <sup>d</sup>Astringencia. Escala de la astringencia (0-9).



### 2.3.2. Caracterización sensorial de los vinos

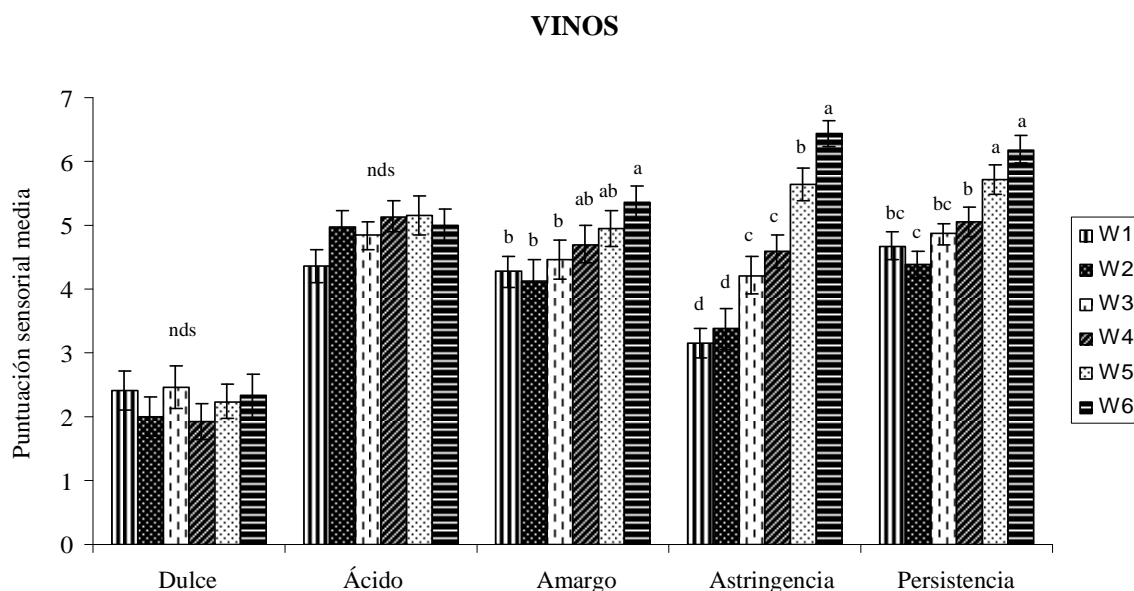
El ANOVA aplicado a los datos sensoriales de los vinos estudiados reflejó que los panelistas entrenados eran reproducibles y consistentes (**Tabla 2.3**). Los vinos mostraron diferencias significativas en el amargor, la astringencia y la persistencia.

**Tabla 2.3.** ANOVAs a tres factores calculados para los atributos evaluados en boca por los 18 jueces en los seis vinos del estudio.

	Juez (J) (gl = 17)		Vino (W) (gl = 5)		Réplica (R) (gl = 1)		W*J (gl = 85)		W*R (gl = 5)		J*R (gl = 17)	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
<b>Dulce</b>	17.158	<b>&lt;0.001</b>	0.932	0.237	2.328	0.130	1.210	0.154	0.817	0.487	0.632	0.942
<b>Ácido</b>	7.383	<b>&lt;0.001</b>	0.741	0.530	0.160	0.780	1.234	0.138	1.547	0.207	0.892	0.644
<b>Amargo</b>	6.307	<b>&lt;0.001</b>	4.482	<b>0.005</b>	0.189	0.665	1.281	0.100	1.041	0.402	0.821	0.747
<b>Astringencia</b>	6.681	<b>&lt;0.001</b>	24.35	<b>&lt;0.001</b>	1.991	0.161	1.329	0.071	1.25	0.334	0.651	0.929
<b>Persistencia</b>	3.487	<b>&lt;0.001</b>	8.230	<b>&lt;0.001</b>	0.253	0.616	1.372	0.051	1.37	0.568	0.742	0.846

Efectos significativos ( $P < 0.05$ ) marcados en negrita; grados de libertad (gl), estadístico F y valores P.

Los resultados de la evaluación sensorial realizada sobre los seis vinos a estudio se muestran en la **Figura 2.1**.



**Figura 2.1.** Gráfico con las puntuaciones sensoriales medias de los seis vinos del estudio. Las barras de error están calculadas como  $s/(n)^{1/2}$ ; (s) desviación estándar; (n) número de panelistas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre vinos ( $P \leq 0.05$ ) (test de Tukey); nds, diferencias no significativas.

De acuerdo con los datos de la **Figura 2.1**, se observa como los seis vinos fueron evaluados con puntuaciones altas para los atributos acidez, amargor, astringencia y persistencia, y con puntuaciones bajas, inferiores a 2.5 puntos, para el atributo dulzor. Es importante destacar que ni los azúcares reductores ni el contenido en etanol están correlacionados con el dulzor percibido en este set de muestras. Estos resultados fueron también observados en la caracterización sensorial de vinos tintos envejecidos.<sup>32</sup> El vino W5 y el vino W6 fueron los más astringentes y persistentes. Los resultados obtenidos mostraron que la astringencia de los vinos estaba correlacionada con el IPT ( $R^2 = 0.8932$ ;  $P = 0.0044$ ), con las PPA's ( $R^2 = 0.9886$ ;  $P = 0.00005$ ), etanol ( $R^2 = 0.9712$ ;  $P = 0.0003$ ) y pH ( $R^2 = 0.7076$ ;  $P = 0.0358$ ). Estas observaciones son consistentes con los resultados encontrados por otros autores<sup>19,33,34</sup> los cuales observaron correlaciones significativas entre la astringencia y el IPT, PPA's y el contenido en etanol, mientras una correlación menos significativa se encontró con el pH. De forma similar, Demiglio y col.<sup>35</sup> concluyeron que el contenido en etanol juega un papel más importante en la modificación de la mayor parte de las sensaciones orales que el que juega el pH. La influencia del etanol en las sensaciones en boca ha sido estudiada por diversos autores quienes resaltan la influencia del alcohol en la intensidad y en las percepciones sensoriales en boca.<sup>35-38</sup> Sin embargo, el mayor contenido alcohólico presente en los vinos W5 y W6 podría ser el responsable del mayor contenido en IPT y en PPA's en estos vinos, posiblemente debido a una mayor extracción de compuestos fenólicos de las semillas y de los hollejos de las uvas, siendo esta la razón por la que estos vinos son percibidos como los más astringentes. La astringencia de los vinos no estuvo correlacionada ni con la acidez total ni con los azúcares reductores. Respecto a la persistencia, este atributo resultó estar correlacionado con la astringencia ( $R^2 = 0.9497$ ;  $P = 0.001$ ) y con el amargor ( $R^2 = 0.9752$ ;  $P = 0.0002$ ), aunque no se encontraron correlaciones significativas ni con la acidez ni con el dulzor. Resultados similares han sido observados en trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo de investigación entre persistencia/astringencia y persistencia/acidez.<sup>8</sup>

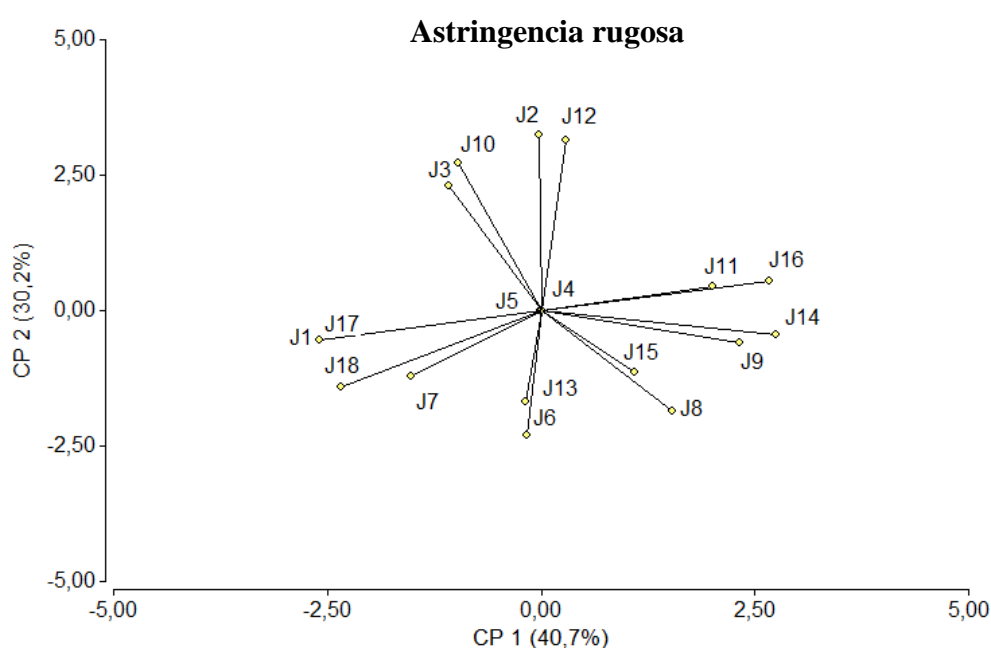
### **2.3.3. Caracterización sensorial de la fracción proantociánica (PAsF)**

Los resultados del ANOVA aplicado a las puntuaciones dadas a cada uno de los atributos evaluados en la fracción proantociánica obtenida a partir de los seis vinos de partida se muestran en la **Tabla 2.4**.

**Tabla 2.4.** ANOVAs a tres factores calculados para los atributos evaluados en boca por los 18 jueces en las seis muestras a estudio. Los efectos significativos se muestran marcados en negrita ( $P < 0.05$ ); grados de libertad (gl), estadístico F y valores de  $P$ .

Atributos	Juez (J) (gl = 17)		Fracción (F) (gl = 5)		Réplicas (R) (gl = 1)		F*J (gl = 83)		J*R (gl = 17)		F*R (gl = 5)	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Dulce	15.13	<0.001	1.559	0.181	1.749	0.191	0.719	0.932	1.083	0.384	1.190	0.321
Ácido	7.564	<0.001	2.347	0.060	1.581	0.212	1.459	0.071	0.676	0.817	0.230	0.949
Amargo	9.895	<0.001	0.547	0.740	0.066	0.798	1.289	0.125	0.259	0.999	0.351	0.880
Astringencia sedosa	5.764	<0.001	5.383	<0.001	0.023	0.880	1.103	0.328	0.747	0.746	1.547	0.184
Astringencia rugosa	4.995	<0.001	4.086	0.002	0.079	0.779	1.613	0.015	1.051	0.414	0.102	0.991
Astringencia secante	7.863	<0.001	22.24	<0.001	1.326	0.254	1.332	0.129	1.791	0.064	1.213	0.313
Astringencia rugosa/secante (término combinado)	5.078	<0.001	23.78	<0.001	0.189	0.665	1.149	0.266	0.869	0.611	0.828	0.534
Persistencia	14.98	<0.001	11.85	<0.001	0.020	0.888	0.930	0.630	1.185	0.295	0.224	0.951

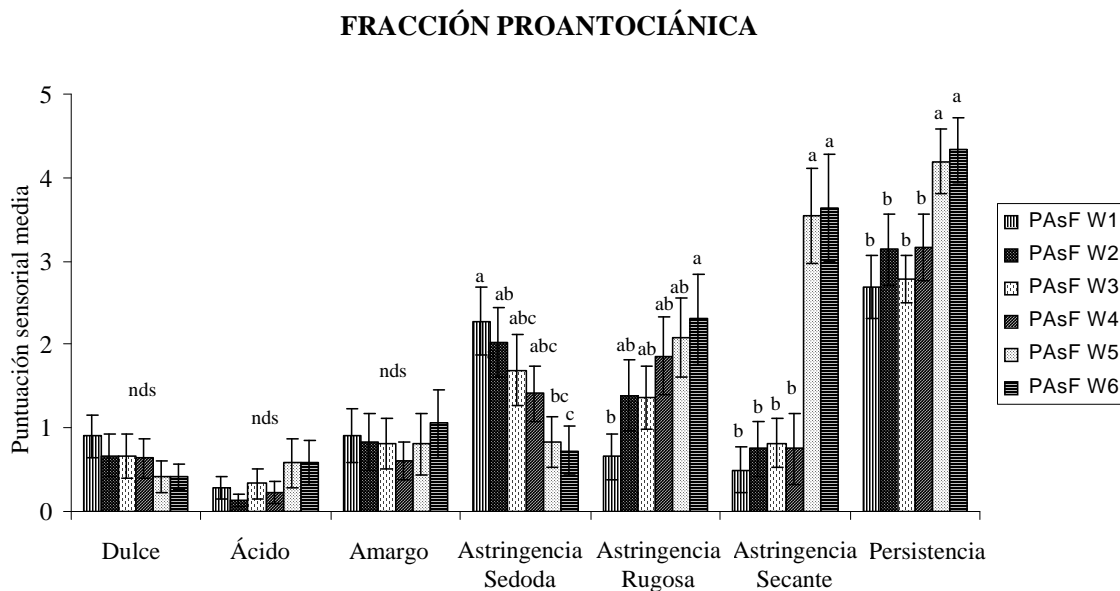
El efecto juez fue significativo en todos los atributos ( $P < 0.05$ ). Este efecto es habitual en el análisis sensorial y es debido a las diferencias fisiológicas existentes entre los individuos, ya que cada juez tiene una percepción fisiológica única.<sup>39</sup> El efecto réplica no fue significativo, indicando una consistencia en la valoración dada por los jueces a ambas réplicas. Sin embargo, la interacción fracción-réplica (F\*R) fue significativa para el atributo astringencia rugosa (**Figura 2.2**). Para este término, las proyecciones de los jueces sobre el plano factorial son muy dispersas indicando por tanto que existen diferencias en la interpretación de este término y que los jueces habrían necesitado un mayor entrenamiento para este atributo.



**Figura 2.2.** Proyecciones de los jueces sobre el plano bidimensional para el atributo astringencia rugosa. Visualización del efecto fracción\*juez.

Revisando las puntuaciones dadas por los panelistas a las sub-cualidades de astringencia: sedosa, rugosa y secante, y con el propósito de retener aquellos valores dados por los panelistas al atributo astringencia rugosa, se construyeron términos combinados a partir de los tres atributos individuales de astringencia, evaluando en cada uno de los nuevos términos la consistencia de los jueces. Únicamente el término combinado resultante de la astringencia rugosa y secante mostró consistencia en el ANOVA aplicado (**Tabla 2.4**). Es por esto que los términos sensoriales con los que se trabajó fueron: dulzor, acidez, amargor, astringencia sedosa, término combinado astringencia rugosa/secante y persistencia. La evaluación sensorial en boca realizada

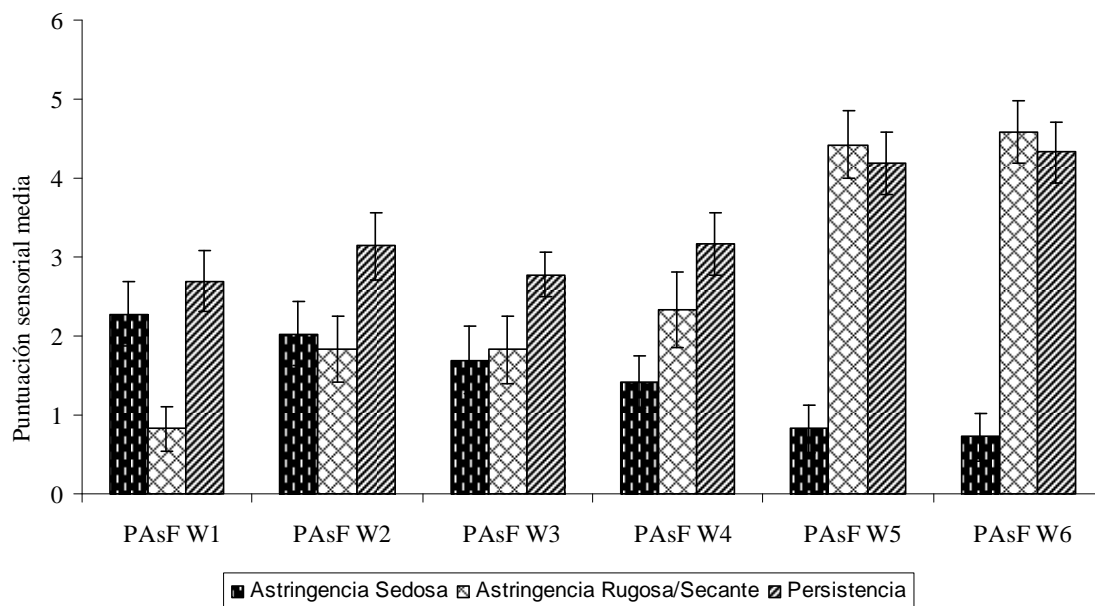
mostró puntuaciones muy bajas (< 1) para los atributos dulce, ácido y amargo, sin diferencias significativas entre ellos (**Figura 2.3**).



**Figura 2.3.** Gráfico con las puntuaciones sensoriales medias de las seis fracciones del estudio. Las barras de error están calculadas como  $s/(n)^{1/2}$ ; (s) desviación estándar; (n) número de panelistas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre vinos ( $P \leq 0.05$ ) (test de Tukey); nds, diferencias no significativas.

Estas puntuaciones bajas de los atributos dulzor y acidez en estas fracciones eran previamente esperadas y pueden ser explicadas debido a la eliminación del alcohol, de los aromas y de los compuestos de bajo peso molecular, tales como azúcares y ácidos orgánicos, entre otros. Los valores bajos del sabor amargo en estas fracciones pueden ser debidos a la falta de fenoles monómeros y otros compuestos que son considerados más amargos que las proantocianidinas.<sup>40,41</sup> Estos resultados son consistentes con los observados en otros trabajos llevados a cabo en fracciones proantociánicas de manzanas, así como de semillas y hollejos de uva.<sup>10</sup> Es importante resaltar que los panelistas, los cuales habían sido seleccionados por su capacidad para detectar el sabor amargo en base al test realizado con PROP, no detectaron amargor en estas fracciones. Por tanto, los resultados reflejan claramente como las fracciones proantociánicas evaluadas son, exclusivamente, descritas como astringentes y persistentes, mostrando diferencias significativas en ambos términos.

Las puntuaciones de las sub-cualidades de astringencia sedosa y rugosa/secante así como de la persistencia dadas a las muestras se presentan en la **Figura 2.4**.



**Figura 2.4.** Gráfica con las puntuaciones sensoriales medias dadas a las sub-cualidades de la astringencia y a la persistencia. Las barras de error están calculadas como  $s/(n)^{1/2}$ ; (s) desviación estándar; (n) número de panelistas.

Las fracciones de los vinos W4, W5 y W6 fueron evaluadas con puntuaciones más altas en astringencia rugosa/secante que en astringencia sedosa; pero mientras que en las dos últimas fracciones (PAsF W5 y PAsF W6) los datos de la astringencia sedosa pueden ser considerados residuales frente a las puntuaciones de la astringencia rugosa/secante, esto no ocurre en la fracción del vino W4, donde los datos para ambos términos de la astringencia son del mismo orden. Las fracciones de los vinos W2 y W3, fueron evaluadas con valores similares en ambas sub-cualidades astringentes mientras que la fracción del vino W1 fue principalmente descrita con la sub-cualidad sedosa. De hecho, ambas sensaciones táctiles (sedosa y rugosa/secante) estuvieron negativamente correlacionadas ( $R^2 = 0.9432$ ;  $P = 0.0012$ ). Una correlación negativa fue también observada por Vidal y col.<sup>10</sup> en un estudio sensorial sobre las propiedades sensoriales de fracciones de proantocianidinas. Estos autores precisaron que el término “grano fino”, relacionado con la sensación al tacto de un tejido sedoso, era opuesto al término “secante”. Este resultado obtenido muestra que la cantidad y/o tipo de compuestos presentes en esta fracción pueden inducir a diferentes percepciones en el atributo astringencia. Además, es necesario resaltar que ambas sub-cualidades de astringencia juegan un papel importante en la persistencia (**Figura 2.4**). Las fracciones menos

persistentes fueron las procedentes de los vinos W1, W2, W3 y W4 y las más persistentes las procedentes de los vinos W5 y W6. Estas últimas fueron principalmente evaluadas como rugosa/secante así que la persistencia podría estar atribuida a esta astringencia. Por el contrario, la persistencia evaluada en las otras cuatro fracciones no parece ser exclusivamente debida a la astringencia rugosa/secante ya que estas fracciones presentaron valores más bajos en este atributo que en la persistencia. Probablemente, la astringencia sedosa está contribuyendo a la persistencia de estas fracciones como se observa claramente en el caso de la muestra PAsF W1 (**Figura 2.4**). Por tanto, ambas sub-cualidades astringentes parecen contribuir a la persistencia en boca.

#### **2.3.4. Relación entre las características sensoriales de los vinos y las fracciones proantociánicas obtenidas**

Aunque vinos y fracciones son matrices diferentes, hidroalcohólica y acuosa, respectivamente, se han encontrado correlaciones significativas entre ambas. Respecto al atributo astringencia se ha encontrado una correlación positiva entre la astringencia de los vinos y la astringencia rugosa/secante de las fracciones ( $R^2 = 0.9172$ ;  $P = 0.0026$ ) mientras que una correlación negativa fue observada entre la astringencia de los vinos y la astringencia sedosa evaluada en las fracciones ( $R^2 = 0.9731$ ;  $P = 0.0003$ ). A pesar de que la primera correlación era esperada ya que el panel había sido entrenado con el mismo estándar de referencia (sulfato de potasio y aluminio) en ambos tipos de muestras, es de destacar que las puntuaciones asignadas por los panelistas a las diferentes fracciones de PAs retienen las diferencias de la astringencia evaluadas en los vinos. Ambas sub-cualidades astringentes, rugosa/secante y sedosa, fueron descritas con puntuaciones inferiores a las dadas en la puntuación del atributo astringencia en los vinos. Esto podría ser debido a diversas razones. Por una parte, los compuestos no-volátiles no recogidos en esta fracción podrían incrementar la astringencia manifestada por las PAs, sin que dicho incremento suponga una variación en las diferencias encontradas entre las fracciones. Otros parámetros tales como la ausencia de etanol, acidez y el diferente pH en la fracción proantociánica en comparación con el vino podrían también modular la sensación percibida. Por otra parte, es posible que un efecto “dumping” pueda estar teniendo lugar por la utilización de una escala para la

astringencia en los vinos y tres escalas para las sub-cualidades de la astringencia evaluadas en las fracciones de acuerdo con lo apuntado por Valentín y col.<sup>42</sup>

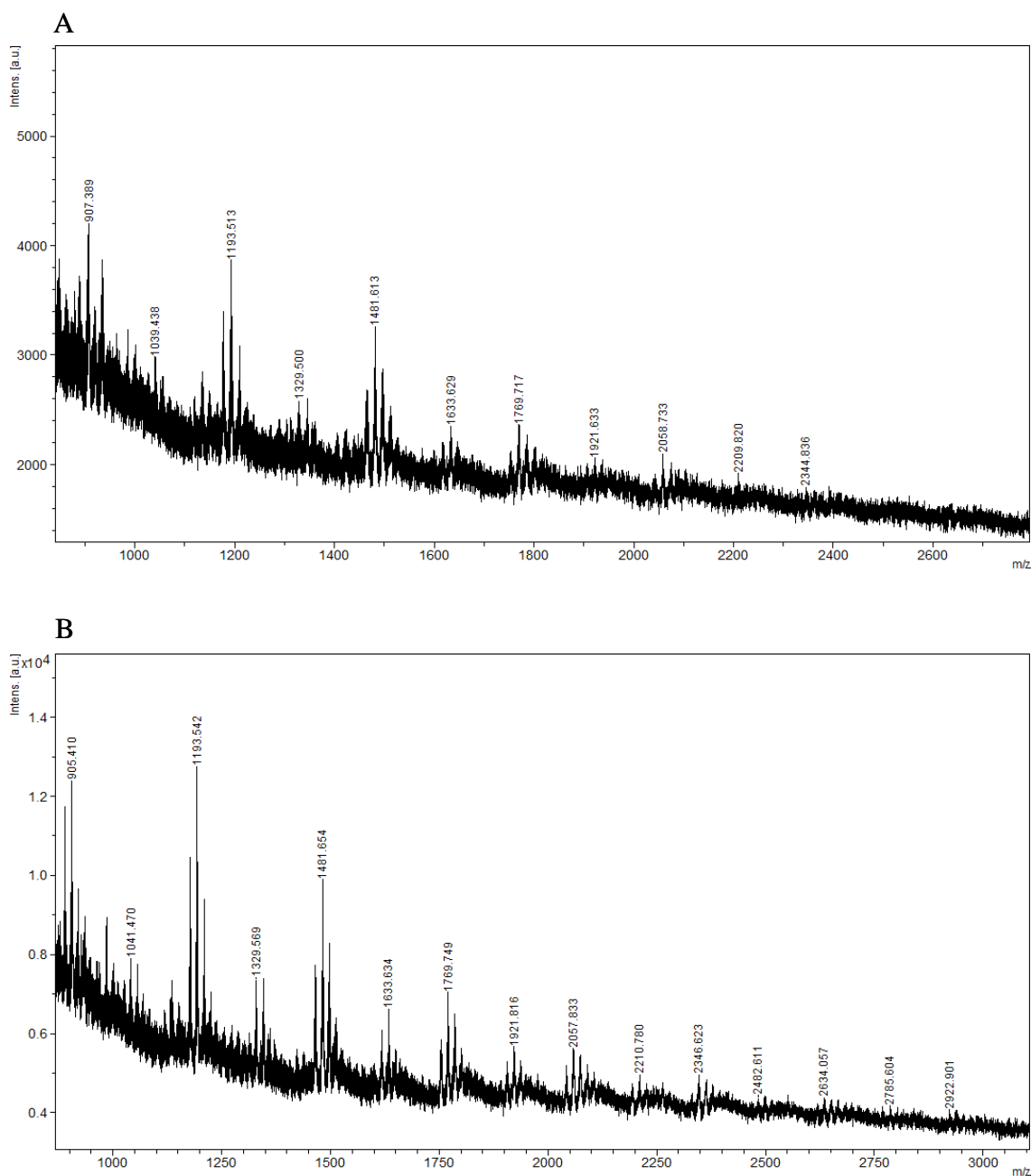
En relación con la persistencia también se ha encontrado una correlación positiva entre las puntuaciones de persistencia dadas a ambos tipos de muestras ( $R^2 = 0.8050$ ;  $P = 0.0153$ ), siendo menor los valores de persistencia en las fracciones que en los correspondientes vinos. A diferencia de lo discutido anteriormente para la astringencia, el efecto “dumping” en el caso de la persistencia parece menos probable ya que ambos se evaluaron con la misma escala, por lo que los compuestos no-volátiles de bajo peso molecular eliminados de esta fracción podrían incrementar la persistencia en los vinos. Por lo tanto, estos resultados confirman que en vinos tintos, la persistencia está fuertemente relacionada con el atributo astringencia y que los compuestos presentes en esta fracción juegan un papel sensorialmente activo en ambos atributos.

### 2.3.5. Caracterización química de la fracción proantociánica (PAsF)

#### 2.3.5.1. Análisis cualitativo mediante MALDI-TOF MS

Los resultados de la determinación cualitativa de las PAs mediante MALDI-TOF MS se muestran en la **Tabla 2.5**. En todas las muestras, el principal grupo de picos mostró una separación de 290 Da (ej.  $m/z$  889, 1177, 1465, 1753, etc.) correspondiente con la presencia de unidades de procianidinas (catequina/epicatequina). Procianidinas con un grado de polimerización de entre 3 - 10 unidades ( $m/z$  889 - 2907) fueron detectadas en PAsF W5 y PAsF W6. En el resto de muestras, el mayor polímero detectado fue el nonámero, excepto en la muestra PAsF W3, en la cual el mayor polímero detectado fue el octámero (**Figura 2.5**). Una separación de 152 Da fue también observada (ej.  $m/z$  1041, 1329, 1617, 1905, etc.), correspondiente a la adición de un galato en el anillo-C del heterociclo como es el caso de la (-)-epicatequina-3-O-galato por lo que en todas las muestras se ha confirmado la presencia de estos compuestos. Otro modelo de separación repetido fueron las señales separadas mediante una diferencia de 16 Da. Estas masas son atribuidas a la presencia de prodelfinidinas, donde el tercer grupo hidroxilo introduce diferencias de 15.99 Da.<sup>44</sup> Además, en el espectro también se observaron señales (ej.  $m/z$  1175, 1191, etc.) que corresponden a uniones de tipo-A entre proantocianidinas. Al menos un enlace interflavánico de tipo-A existe en cada oligómero.





**Figura 2.5.** Espectro de MALDI-TOF MS correspondiente a la muestra PAsF W3 (A) y a la muestra PAsF W5 (B).

De acuerdo con esto, se puede afirmar que todas las PAsF analizadas estuvieron constituidas por procianidinas galoiladas y no galoiladas unidas por enlaces de tipo-B y al menos por un enlace de tipo-A. La diferencia cualitativa más importante encontrada en este set de fracciones fue que la PAsF de los vinos W5 y W6 contenían proantocianidinas con un mayor grado de polimerización.

### 2.3.5.2. Tiólisis-UPLC-UV/VIS-MS

Los resultados de la composición estructural (unidades terminales y de extensión), el mDP y el porcentaje de procianidinas (% PC), prodelfinidinas (% PD) y taninos galoilados (% G) encontrados en las seis fracciones a estudio se muestran en la **Tabla 2.5.** (-) Epigallocatequina (EGCe), (+)-catequina (Ce), (-)-epicatequina (ECe) y (-)-epicatequina-3-*O*-galato (ECGe) fueron identificados como unidades de extensión, mientras (+)-catequina (Ct), (-)-epicatequina (ECt) y (-)-epicatequina-3-*O*-galato (ECGt) fueron identificados como unidades terminales. Diversos trabajos enfocados en el estudio de proantocianidinas presentes en vinos elaborados con diferentes variedades del género *Vitis vinífera* han anotado la presencia de C<sub>t</sub> y EC<sub>t</sub> como unidades terminales.<sup>46,47</sup> Sun y col.<sup>48</sup> estudiando diferentes fracciones obtenidas a partir de vinos de Castelaño, identificaron ECG<sub>t</sub> como unidades terminales. En nuestras fracciones vínicas se detectó en todas las muestras la presencia de ECG<sub>t</sub> pero su cuantificación sólo ha sido posible en cuatro de ellas ya que las otras dos fracciones sólo presentaban trazas.

La EC<sub>e</sub> fue la unidad de extensión mayoritaria. Las unidades de extensión también presentaron una alta proporción de EGC<sub>e</sub>. Entre las unidades terminales, la C<sub>t</sub> y la EC<sub>t</sub> fueron los monómeros más abundantes, encontrándose presente la C<sub>t</sub> en una concentración superior. Estos resultados son consistentes con trabajos previos llevados a cabo por Monagas y col.<sup>47</sup>, Fernández y col.<sup>46</sup> y Hanlin y col.<sup>49</sup>. Al igual que se demostró con el análisis mediante MALDI-TOF, los análisis de tiólisis también confirmaron que las proantocianidinas de los vinos contenían procianidinas galoiladas y no galoiladas así como prodelfinidinas.

Respecto a los resultados de % PC, % PD y % G, se observa como el porcentaje de prodelfinidinas es superior al de unidades galoiladas, presentando las procianidinas el mayor contenido. La PAsF de los vinos W1 y W2 presentaron el menor contenido en % PD (8.87 y 11.55), siendo el porcentaje más alto el correspondiente a la muestra PAsF W4 (% PD = 19). El mDP osciló entre 4.62 y 6.38, siendo solamente el mDP de la muestra PAsF W1 significativamente diferente a los otros mDPs calculados.

**Tabla 2.5.** Datos cuantitativos y cualitativos de la fracción proantocianina de los vinos (PAsF Wx)<sup>a</sup>

Fracción	MALDI-TOF										Tiólisis-UPLC/MS					
	Unidades terminales (%)					Unidades de extensión (%)					mDP	%PC	%PD	%G	PPAs	TPAs
	PC	PD	C	EC	ECG	EGC	C	EC	ECG	C						
<b>PAsF W1</b>	PC <sub>3</sub> -PC <sub>9</sub>	PD <sub>3</sub> -PD <sub>9</sub>	66.70	33.30	tr	11.07	1.99	86.73	0.21	4.62 ± 0.95 b	90.90 ± 1.88 a	8.87 ± 1.86 d	0.23 ± 0.02 c	45 ± 20 b	499 ± 19 c	
<b>PAsF W2</b>	PC <sub>3</sub> -PC <sub>9</sub>	PD <sub>3</sub> -PD <sub>9</sub>	80.34	18.77	0.89	13.82	1.69	84.15	0.34	5.32 ± 0.87 ab	88.00 ± 1.80 b	11.55 ± 1.76 c	0.45 ± 0.04 b	190 ± 30 b	521 ± 8 c	
<b>PAsF W3</b>	PC <sub>4</sub> -PC <sub>8</sub>	PD <sub>4</sub> -PD <sub>8</sub>	73.14	26.86	tr	19.12	0.91	79.78	0.19	6.18 ± 0.45 a	82.92 ± 2.18 cd	16.87 ± 2.15 ab	0.21 ± 0.04 c	180 ± 15 b	619 ± 4 c	
<b>PAsF W4</b>	PC <sub>3</sub> -PC <sub>9</sub>	PD <sub>3</sub> -PD <sub>9</sub>	65.23	34.30	0.46	22.20	3.11	74.44	0.24	6.32 ± 1.01 a	80.72 ± 2.16 d	19.00 ± 2.14 a	0.28 ± 0.02 c	315 ± 35 b	784 ± 71 b	
<b>PAsF W5</b>	PC <sub>3</sub> -PC <sub>10</sub>	PD <sub>3</sub> -PD <sub>10</sub>	72.17	27.47	0.36	18.76	4.63	76.34	0.27	6.38 ± 0.16 a	83.77 ± 0.54 c	15.96 ± 0.57 b	0.27 ± 0.07 c	590 ± 20 a	1260 ± 82 a	
<b>PAsF W6</b>	PC <sub>3</sub> -PC <sub>10</sub>	PD <sub>3</sub> -PD <sub>10</sub>	74.48	25.21	0.31	20.70	6.66	72.06	0.58	6.32 ± 0.46 a	82.13 ± 0.42 cd	17.34 ± 0.42 ab	0.54 ± 0.05 a	890 ± 70 a	1241 ± 22 a	

<sup>a</sup> Abreviaturas: tr, trazas; C, catequina; EC, epicatequina; ECG, epicatequin-galato; EGC, epigallocatequina; mDP, grado medio de polimerización; PC, proantocianinas; PD, prodelphinidinas; G, galatos; PPAs, Proantocianidinas precipitables con proteínas expresado como miligramos por litro de ácido tánico; TPAs, contenido total de proantocianidinas expresado como miligramos por litro de catequina.

Los valores de mDP observados en las fracciones proantociánicas de estos vinos fueron similares a los encontrados en vinos por otros autores.<sup>46,49-51</sup> Estos resultados mostraron una correlación positiva entre el mDP y el porcentaje de prodelfinidinas ( $R^2 = 0.92$ ,  $F = 44.94$ ,  $P = 0.0026$ ). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Monagas y col.<sup>47</sup> y Sun y col.<sup>52</sup>, sin embargo, no se ha observado una correlación entre el mDP y el porcentaje de taninos galoilados como otros autores han anotado.<sup>52,53</sup>

### 2.3.5.3. Contenido total de proantocianidinas (TPAs)

La fracción caracterizada por el menor contenido en proantocianidinas poliméricas fue la PAsF W1 con un valor equivalente en catequina de 499 mg/L mientras que la fracción con el contenido más alto fue la PAsF W5 con un valor de 1260 mg/L (**Tabla 2.5**). Estos valores son consistentes con los datos obtenidos por otros autores<sup>47</sup> quienes encontraron, usando el índice de la vainillina, valores medios de 700-800 mg/L para las variedades Tempranillo, Graciano y Cabernet Sauvignon. Sun y col.<sup>51</sup> emplearon este índice para estudiar la diferente concentración en PAs oligómeras y polímeras en cv. Tinta Miuda. Estos autores encontraron valores de 300 mg/L en vinos elaborados sin contacto con el raspón, alrededor de 800 mg/L en vinos elaborados en contacto con el raspón y valores entorno a 1400 mg/L en vinos elaborados con la técnica de maceración carbónica. En el presente estudio, este índice mostró una correlación positiva con el IPT de los vinos ( $R^2 = 0.81$ ,  $F = 21.84$ ,  $P = 0.009$ ).

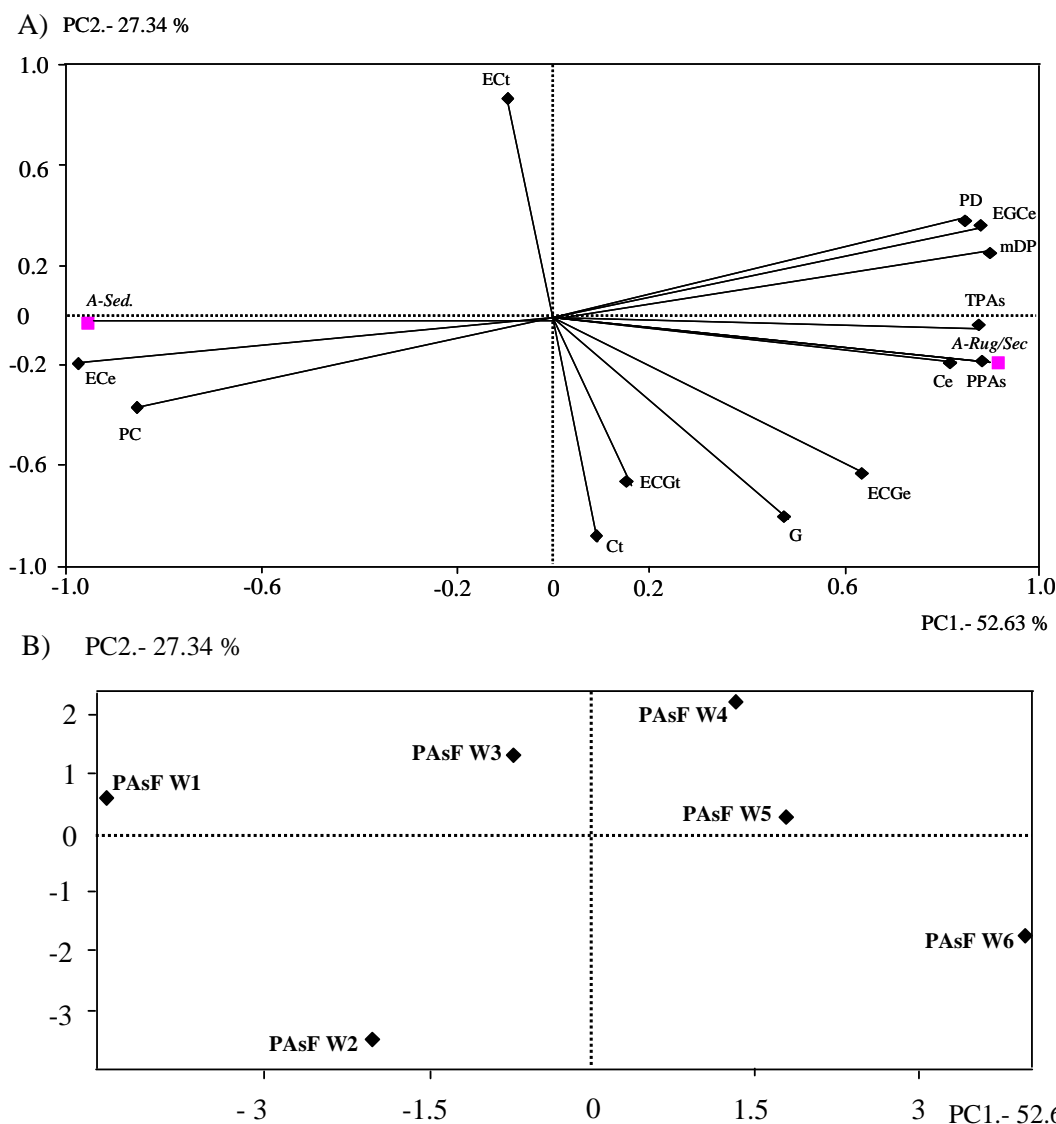
### 2.3.5.4. Proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs)

Los resultados correspondientes a las proantocianidinas precipitables con proteínas se presentan en la **Tabla 2.5**. Los valores de PPAs oscilaron entre los 45 mg/L para la PAsF W1 y los 890 mg/L para la PAsF W6. Los valores fueron, en general, ligeramente inferiores a los encontrados en los vinos (**Tabla 2.2**) si bien, se ha encontrado una correlación significativa entre las PPAs de los vinos y las fracciones ( $R^2 = 0.9647$ ,  $P = 0.0005$ ). Se ha observado además una correlación positiva entre las PPAs y las TPAs de las seis fracciones a estudio ( $R^2 = 0.8807$ ,  $P = 0.0056$ ), al igual que lo encontrado en otros vinos estudiados.<sup>32,54</sup>

### 2.3.6. Correlaciones entre la composición química y sensorial de la fracción proantociánica

Se aplicó el análisis de componentes principales considerando los datos químicos y los atributos sensoriales (variables ilustrativas) de las seis fracciones de proantocianidinas (PAsF). La **Figura 2.6A** muestra la proyección de las muestras y las variables en los dos primeros componentes principales que explican el 80 % de la varianza total. El primer componente principal (PC1) está positivamente correlacionado con el porcentaje de flavanoles de extensión ( $C_e$  y  $EGC_e$ ), de prodelfinidinas, con la concentración de proantocianidinas totales (TPAs), con la concentración de las proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs) y con el grado medio de polimerización y negativamente con el porcentaje de procianidinas y  $EC_e$ . La proyección de las variables ilustrativas, astringencia sedosa y rugosa/secante, en los dos ejes principales muestran que la astringencia sedosa tiene valores negativos en el PC1 mientras que la astringencia rugosa/secante muestra valores positivos en este componente. Cabe destacar que la astringencia sedosa está positivamente correlacionada con  $EC_e$  y negativamente correlacionada con:  $C_e$ ,  $EGC_e$ , % PD, mDP, TPAs y PPAs e inversamente en el caso de la astringencia rugosa/secante.

El segundo componente principal que explica el 27.3 % de la varianza total está correlacionado con el tipo de flavanol unido a la posición terminal de las proantocianidinas y con la PAs galoiladas. Estas variables no modificaron las sensaciones táctiles descritas para estas fracciones. La proyección de las seis fracciones de proantocianidinas en los dos primeros ejes se muestra en la **Figura 2.6B**. Esta distribución concordó con las sub-cualidades de la astringencia evaluadas en las citadas fracciones. Por consiguiente, la PAsF W6 (mayor astringencia rugosa/secante) está proyectada en el lado derecho del plano y la PAsF W1 (mayor astringencia sedosa) en el lado izquierdo. Las otras fracciones están situadas entre ambas, de acuerdo con los valores asignados por los panelistas a estos atributos.



**Figura 2.6.** Proyección de las variables sobre el plano de los dos primeros componentes principales (PC1 y PC2). Abreviaturas: t, flavanol terminal; e, flavanol de extensión; A-Sed, astringencia sedosa; A-Rug/Sec, astringencia rugosa/secante (A) y proyección de las seis fracciones en las dos primeras componentes principales (B).

Además, se llevó a cabo una regresión lineal múltiple, en la cual las proyecciones de las fracciones en el análisis de componentes principales fueron consideradas como variables independientes y la astringencia como una variable dependiente. Por lo que, tres componentes principales que explican el 91.65 % de la varianza total fueron considerados. La regresión lineal múltiple proporcionó dos modelos significativos, explicados por la primera componente. Las regresiones fueron:

$$\text{Astringencia sedosa} = 1.495 - 0.211 * PC1 \quad (F = 44.15; P = 0.003)$$

$$\text{Astringencia rugosa/secante} = 2.655 + 0.470 * PC1 \quad (F = 16.82; P = 0.015)$$

Los resultados del análisis de componentes principales y de las regresiones lineales múltiples mostraron que las diferencias en el contenido en PAs totales y precipitables con proteínas y las unidades de extensión de los flavanoles unidas a las PAs proporcionan diferencias sensoriales en la astringencia percibida por los panelistas. Por lo tanto, la astringencia rugosa/secante está positivamente correlacionada con el contenido en PAs totales, como anotó Gawel y col.<sup>15</sup> y con las PAs precipitables con proteínas, lo que parece lógico, ya que las sensaciones orales descritas como secantes o rugosas son comúnmente atribuidas a interacciones de las proantocianidinas con las glicoproteínas salivares.

El aumento del grado de polimerización parece incrementar la astringencia rugosa/secante percibida y disminuir la astringencia sedosa. Vidal y col.<sup>10</sup> y Chira y col.<sup>55</sup> apuntaron resultados similares, relacionando el incremento en la longitud de la cadena de PAs con las puntuaciones más altas dadas al atributo “secante”.

La relación entre las características estructurales de las PAs y sus propiedades sensoriales pueden ser evaluadas a través de la influencia de la galoilación (G), la hidroxilación adicional del anillo-B (PD) y del porcentaje de los flavanoles monómeros que forman las PAs. De acuerdo a nuestros resultados, el porcentaje de galoilación no modifica la percepción de las dos sub-cualidades táctiles detectadas, lo que estaría de acuerdo con lo anotado por Vidal y col.<sup>10</sup> Sin embargo, el porcentaje de PD y PC si que parecen tener efecto sobre las sub-cualidades de la astringencia. Así, estos resultados muestran que un mayor porcentaje de PD o lo que es lo mismo un incremento de la hidroxilación del anillo-B disminuye la sensación sedosa y aumenta la sensación rugosa/secante. Diferencias en las sub-cualidades de la astringencia como consecuencia de la trihidroxilación del anillo B han sido evidenciadas por Vidal y col.<sup>10</sup> Además, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, es la primera vez que se ha puesto de manifiesto el papel opuesto que juegan las unidades de extensión de las PAs en las sub-cualidades de la astringencia percibida. Así, un mayor porcentaje de  $C_e$  y  $EGC_e$  parece inducir a un incremento de la astringencia rugosa/secante, mientras que un incremento del porcentaje de  $EC_e$  disminuye esta sub-cualidad incrementándose la percepción de la astringencia sedosa.

## **2.4. CONCLUSIONES**

Las proantocianidinas mayores de tres unidades manifiestan exclusivamente astringencia y persistencia. La cantidad en las cuales están presentes las proantocianidinas en las muestras y la proporción/tipo de flavanoles de extensión unidos a las PAs, parece jugar un papel importante en la percepción de ambas sub-cualidades astringentes, siendo aparentemente más importante, en la percepción de la astringencia, la concentración de proantocianidinas que la composición estructural.

Ambas sub-cualidades parecen contribuir a la persistencia. Se ha observado una correlación significativa entre la astringencia sensorial y la persistencia tanto en vinos como en fracciones.

Se han encontrado regresiones lineales múltiples significativas entre las astringencias sensorialmente evaluadas y los compuestos analizados en la fracción estudiada.



## 2.5. REFERENCIAS

- (1) Preys, S.; Mazerolles, G.; Courcoux, P.; Samson, A.; Fischer, U.; Hanafi, M.; Bertrand, D.; Cheynier, V. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 126-136.
- (2) Vidal, S.; Francis, L.; Noble, A.; Kwiatkowski, M.; Cheynier, V.; Waters, E. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 57-65.
- (3) Boselli, E.; Giomo, A.; Minardi, M.; Frega, N.G. Characterization of phenolics in Lacrima di Morro d'Alba wine and role on its sensory attributes. *European Food Research and Technology* **2008**, *227*, 709-720.
- (4) Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 9190-9199.
- (5) Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 1376-1386.
- (6) Sáenz-Navajas, M.P.; Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V. Contribution of Nonvolatile Composition to Wine Flavor. *Food Reviews International*. **2012**, *28*, 389-411.
- (7) Gawel, R. Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1998**, *4*, 73-95.
- (8) Sáenz-Navajas, M.P.; Martín-López, C.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2011**, *17*, 9-19.
- (9) Gawel, R.; Oberholster, A.; Francis, I.L. A 'Mouth-feel Wheel': Terminology for communicating the mouth-feel characteristics of red wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2000**, *6*, 203-207.
- (10) Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E.J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2003**, *83*, 564-573.
- (11) Sáenz-Navajas, M.P.; Ferreira, V.; Dizy, M.; Fernández-Zurbano, P. Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *673*, 151-159.

- (12) Weber, F.; Greve, K.; Durner, D.; Fischer, U.; Winterhalter, P. Sensory and chemical characterization of phenolic polymers from red wine obtained by gel permeation chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture* **2012**, *64*, 15-25.
- (13) McRae, J.M.; Schulkin, A.; Kassara, S.; Holt, H.E.; Smith, P.A. Sensory Properties of Wine Tannin Fractions: Implications for In-Mouth Sensory Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 719-727.
- (14) Hemingway, R. W., Laks, P. E. Lea, flavor, color, and stability in fruit products: The effect of polyphenols, In *Plant Polyphenols —Synthesis, Properties, Significance*, Anonymous ; Plenum Press: New York, London, **1992**; pp. 827-847.
- (15) Gawel, R.; Francis, L.; Waters, E.J. Statistical correlations between the in-mouth textural characteristics and the chemical composition of Shiraz wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 2683-2687.
- (16) Kennedy, J.A.; Ferrier, J.; Harbertson, J.F.; Peyrot Des Gachons, C. Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *American Journal of Enology and Viticulture* **2006**, *57*, 481-485.
- (17) Landon, J.L.; Weller, K.; Harbertson, J.F.; Ross, C.F. Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington State red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2008**, *59*, 153-158.
- (18) Boselli, E.; Boulton, R.B.; Thorngate, J.H.; Frega, N.G. Chemical and sensory characterization of DOC red wines from Marche (Italy) related to vintage and grape cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 3843-3854.
- (19) Jones, P.R.; Gawel, R.; Francis, I.L.; Waters, E.J. The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 596-607.
- (20) Quijada-Morín, N.; Regueiro, J.; Simal-Gándara, J.; Tomás, E.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Escribano-Bailón, M.T. Relationship between the sensory-determined astringency and the flavanolic composition of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2012**, *60*, 12355-12361.
- (21) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Culleré, L.; Fernández-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 5574-5585.
- (22) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Fernández-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 1139-1149.
- (23) Guadalupe, Z.; Soldevilla, A.; Sáenz-Navajas, M.P.; Ayestarán, B. Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel

permeation chromatography fractionation. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112*, 112-120.

(24) Ribereau-Gayon, P. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique* **1970**, *52*, 627-631.

(25) O.I.V. Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des mouts. Vienne, **2005**.

(26) Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, J.M.; Rozés, N.; Arola, L.; Zamora, F. New Method for Evaluating Astringency in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 742-746.

(27) Tepper, B.J.; Christensen, C.M.; Cao, J. Development of brief methods to classify individuals by PROP taster status. *Physiology and Behavior* **2001**, *73*, 571-577.

(28) Green, B.G.; Shaffer, G.S.; Gilmore, M.M. Derivation and evaluation of a semantic scale of oral sensation magnitude with apparent ratio properties. *Chemical Senses* **1993**, *18*, 683-702.

(29) Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 3498-3508.

(30) ISO NORM 3591 (**1977**). International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.

(31) Colonna, A.E.; Adams, D.O.; Noble, A.C. Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2004**, *10*, 26-31.

(32) Sáenz-Navajas, M.P.; Tao, Y.S.; Dizey, M.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 12407-12416.

(33) Obreque-Slér, E.; Peña-Neira, Á.; López-Solís, R. Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 3729-3735.

(34) Sáenz-Navajas, M.P.; Avizcuri, J.M.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chemistry* **2012**, *134*, 1484-1493.

(35) Demiglio, P.; Pickering, G.J. The influence of ethanol and pH on the taste and mouthfeel sensations elicited by red wine. *Journal of Food and Agriculture Environment* **2008**, *6*, 143-150.

- (36) Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P.L.; Glories, Y. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 286-291.
- (37) Geddes, D.J.; Bell, S.J.; Holzapfel, B.P.; Rogiers, S.Y.; Pickering, G.J. Astringency sub-qualities elicited by red wine-the effects of viticultural practises. *Proceedings of the 4th Pangborn Sensory Science Symposium, Dijon, France, 22-26 July. INRA-UMRA, Dijon Cedex, France, p. 86. 2001.*
- (38) Vidal, S.; Courcoux, P.; Francis, L.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Williams, P.; Waters, E.; Cheynier, V. Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference* **2004**, *15*, 209-217.
- (39) Bartoshuk, L.M. Separate worlds of taste. *Psychology Today* **14** (1980) 48
- (40) Lea, A. Bitterness and astringency: the procyanidins of fermented apple ciders, In *Bitterness in Foods and Beverages*, Rouseff R., Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1990**; Vol.25 pp. 123-143.
- (41) Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, *79*, 1123-1128.
- (42) Valentin, D.; Chrea, C.; Nguyen, D.H. Taste-odour interactions in sweet taste perception, In *Optimising sweet taste in foods*, Spillane, W.J., Ed.; Woodhead Publishing Ltd: Cambridge, United Kingdom, **2006**; pp. 66-84.
- (43) Monagas, M.; Quintanilla-López, J.E.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Lebrón-Aguilar, R. MALDI-TOF MS analysis of plant proanthocyanidins. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2010**, *51*, 358-372.
- (44) Krueger, C.G.; Vestling, M.M.; Reed, J.D. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of heteropolyflavan-3-ols and glucosylated heteropolyflavans in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 538-543.
- (45) Li, C.; Leverence, R.; Trombley, J.D.; Xu, S.; Yang, J.; Tian, Y.; Reed, J.D.; Hagerman, A.E. High molecular weight persimmon (*Diospyros kaki* L.) proanthocyanidin: A highly galloylated, a-linked tannin with an unusual flavonol terminal unit, myricetin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 9033-9042.
- (46) Fernández, K.; Kennedy, J.A.; Agosin, E. Characterization of *Vitis vinifera* L. Cv. Carménère grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 3675-3680.
- (47) Monagas, M.; Gómez-Cordovés, C.; Bartolomé, B.; Laureano, O.; Ricardo Da Silva, J.M. Monomeric, Oligomeric, and Polymeric Flavan-3-ol Composition of Wines

and Grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, *51*, 6475-6481.

(48) Sun, B.; Leandro, M.C.; de Freitas, V.; Spranger, M.I. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1128*, 27-38.

(49) Hanlin, R.L.; Kelm, M.A.; Wilkinson, K.L.; Downey, M.O. Detailed characterization of proanthocyanidins in skin, seeds, and wine of Shiraz and Cabernet Sauvignon wine grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 13265-13276.

(50) Fulcrand, H.; Remy, S.; Souquet, J.M.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Study of wine tannin oligomers by on-line liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 1023-1028.

(51) Sun, B.; Spranger, I.; Roque-do-Vale, F.; Leandro, C.; Belchior, P. Effect of different winemaking technologies on phenolic composition in Tinta Miúda red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2001**, *49*, 5809-5816.

(52) Sun, B.; Leandro, C.; Ricardo Da Silva, J.M.; Spranger, I. Separation of grape and wine proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 1390-1396.

(53) Prieur, C.; Rigaud, J.; Cheynier, V.; Moutounet, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 781-784.

(54) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Avizcuri, J.M.; Valentin, D.; Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V. Contribution of non-volatile and aroma fractions to in-mouth sensory properties of red wines: Wine reconstitution strategies and sensory sorting task. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *732*, 64-72.

(55) Chira, K.; Schmauch, G.; Saucier, C.; Fabre, S.; Teissedre, P.L. Grape variety effect on proanthocyanidin composition and sensory perception of skin and seed tannin extracts from Bordeaux wine grapes (cabernet Sauvignon and merlot) for two consecutive vintages (2006 and 2007). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2009**, *57*, 545-553.





# **CAPITULO 3.**

**ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS  
COMPUESTOS DE BAJO PESO  
MOLECULAR EN EL AMARGOR DE LOS  
VINOS TINTOS. PREDICCIÓN E  
INTERACCIONES  
SABOR-ASTRINGENCIA**







### 3.1. ANTECEDENTES

El estudio detallado de la composición no volátil de vinos tintos resulta muy interesante debido a las cualidades organolépticas que estos compuestos poseen y evocan como: dulzor, acidez, amargor, o bien, diferentes sensaciones orales tales como la percepción de una astringencia sedosa, rugosa o secante, entre otras. Se ha demostrado que la calidad del vino viene dada en primer lugar por la ausencia de defectos aromáticos y en segundo lugar por la presencia de compuestos no volátiles y más precisamente por la composición fenólica, la cuál es capaz de modular esta percepción de calidad.<sup>1</sup>

La implicación que tienen estos compuestos no volátiles en la percepción sensorial de los vinos ha sido descrita en un amplio número de investigaciones<sup>2-12</sup> y la mayor parte de ellas se han centrado principalmente en el estudio de los compuestos que contribuyen en la percepción de la astringencia.<sup>5,6,9,10</sup> Así, estudios recientes confirman que la astringencia denotada con la sub-cualidad de rugosa (usando ácido tánico como estándar de referencia) es causada por una fracción polimérica de más de 5 kDa, siendo esta sensación incrementada por la presencia de ácidos, tales como el ácido caftarico, el ácido gálico y el ácido furano-2-carboxílico.<sup>13</sup> Otros estudios llevados a cabo por Sáenz-Navajas y col.<sup>10</sup> muestran dos modelos capaces de predecir la astringencia percibida, usando en este caso, sulfato de potasio y aluminio como estándar de referencia para la astringencia. De nuevo, en ambos modelos, la concentración de proantocianidinas, la presencia de ácidos orgánicos y el contenido alcohólico son los compuestos que mejor explican la astringencia percibida.

Por otra parte, los fenoles monómeros han sido repetidamente descritos como astringentes y amargos.<sup>2,4,13</sup> Recientemente se ha demostrado que ninguno de estos compuestos presenta concentraciones por encima de sus umbrales de detección, por lo que estos compuestos no tendrían un papel importante en las percepciones sensoriales de vinos tintos.<sup>10,13</sup>

Por el contrario, muy pocos trabajos se han centrado en el estudio del sabor amargo en vinos tintos. Además, en algunos de ellos, los autores se han encontrado con

diversos obstáculos que han impedido el poder extraer más información respecto a este sabor. La interpretación equivocada de este atributo<sup>10</sup> o bien la falta de diferencias significativas entre las muestras estudiadas<sup>14</sup>, han sido algunos de los factores que han ralentizado el poder avanzar en el conocimiento de compuestos implicados en este atributo. De hecho, publicaciones previas muestran resultados controvertidos en base a los compuestos activos implicados en este sabor.<sup>2,4,13,15,16</sup> En general, en estos trabajos se estudió el amargor de los compuestos polifenólicos, tanto de la fracción polimérica como de los flavan-3-ol monómeros, dímeros y trímeros, y se demostró que las moléculas más grandes tienden a ser menos amargas y más astringentes.<sup>2,16</sup> Peleg y col.<sup>2</sup> confirmaron que la (-)-epicatequina es más amarga que su estereoisómero (+)-catequina y que ambos son más amargos que la procianidina trimera, catequina-(4-8)-catequina-(4-8)-catequina y catequina-(4-8)-catequina-(4-8)-epicatequina mientras que Hufnagel y Hofmann<sup>13</sup> encontraron para la procianidina dímera y trímera un umbral de percepción del sabor amargo inferior que para la (-)-epicatequina y (+)-catequina. Un estudio centrado en vinos blancos y tintos macerados en contacto con los orujos y a los que se adicionaron antocianos<sup>17</sup> estableció que la puntuación en el amargor está correlacionada con la concentración de la mayor parte de los compuestos polifenólicos, pero especialmente con las proantocianidinas y fenoles poliméricos, lo cual está de acuerdo con trabajos previos.<sup>4,18</sup> Por el contrario, Hufnagel y Hofmann<sup>13</sup> consideran a los fenoles poliméricos > 5 kDa como compuestos no amargos.

Por otra parte, estudios realizados en vinos blancos y en disoluciones modelo, han demostrado que fenoles monoméricos como la catequina son capaces de evocar tanto amargor como astringencia.<sup>4,16</sup> Un trabajo enfocado en el estudio de fracciones de vino ha mostrado que el amargor es debido a la presencia de monómeros de catequina y epigallocatequina, ácidos fenólicos como el ácido cutárico y cafetárico y flavonoles como la miricetina.<sup>19</sup> Otro estudio llevado a cabo con vinos reconstituidos<sup>13</sup> ha descrito como compuestos potencialmente amargos a dos flavan-3-ol-monómeros y a cuatro dímeros, a siete ésteres etílicos de ácidos fenólicos y a ocho aminoácidos. A pesar de encontrarse estos compuestos en concentraciones diez veces inferiores a su umbral de detección, estos autores han concluido que concentraciones por debajo del umbral de ésteres etílicos de ácidos fenólicos y de flavanoles contribuyen al amargor de los vinos tintos. Además de las incongruencias encontradas en torno a este sabor, existe también un gran desconocimiento acerca del posible amargor que pueden manifestar otros compuestos

fenólicos que no pertenecen al grupo de los taninos como pueden ser los antocianos. Recientemente, Soares y col.<sup>20</sup> han detectado que diferentes compuestos fenólicos, entre ellos la epicatequina, una procianidina trómera y la malvidina-3-*O*-glucósido activan en el ser humano distintos receptores del sabor amargo.

Otro aspecto importante a tener en cuenta y que envuelve la percepción de este sabor, es la habilidad genética a la hora de su detección, la cual impide a un 30 % de la población detectar como amargos compuestos sintéticos especialmente amargos como la feniltiocarbamida (PTC) y el 6-n-propil-tiouracil (PROP), similares en sabor a compuestos amargos que pueden encontrarse en la col, el brócoli crudo, en el café, en la tónica y en las cervezas negras.<sup>21</sup> Probablemente, debido a este problema genético que complica la interpretación de este atributo y también debido a que la mayor parte de los compuestos amargos se encuentran en concentraciones por debajo de su umbral de detección, resulta difícil avanzar en el conocimiento químico-sensorial de este sabor.

En el campo del sabor y las sensaciones táctiles, ha sido ampliamente descrito que no solo los compuestos químicos, sino que también las interacciones moleculares entre compuestos presentes en el vino juegan un papel determinante en la estabilidad química del vino, afectando a sus propiedades sensoriales.<sup>22-24</sup> El etanol ha sido descrito en numerosas ocasiones como un compuesto que incrementa el amargor percibido<sup>12,17,25-27</sup>, que lo enmascara<sup>28,29</sup>, o bien que suprime o modera la astringencia de los fenoles.<sup>12,27,30</sup> Fischer y Noble<sup>26</sup> observaron cómo un incremento del 3 % v/v de etanol incrementa más el amargor, en torno a un 50 %, que la adición de 1400 mg/L de catequina en ese mismo vino, lo cual incrementaba el amargor en torno a un 28 %. En este contexto y estudiando otro tipo de interacciones, se ha constatado cómo un incremento en la acidez, y en la acidez percibida, provoca un incremento tanto de la intensidad<sup>15</sup> como de la duración de la astringencia.<sup>31</sup> La astringencia se ve reducida al producirse un incremento en la viscosidad, mientras que el amargor no se ve alterado.<sup>32</sup> Sin embargo, el sabor amargo se ve incrementado al aumentar la concentración de *cis*-3-hexenol, compuestos con aroma a hierba recién cortada y sin sabor.<sup>33</sup>

El principal objetivo de este trabajo ha sido estudiar el efecto que tienen los compuestos no volátiles, concretamente, los compuestos de bajo peso molecular en las percepciones en boca de vinos tintos, especialmente en el amargor y en la astringencia,

partiendo para ello de datos químicos cuantitativos. Como objetivo más concreto de este trabajo se propuso explorar y conocer los compuestos que tienen una mayor implicación en el sabor amargo de los vinos tintos. Para ello, seis vinos tintos jóvenes españoles y posteriormente las fracciones obtenidas a partir de ellos fueron descritas en boca por un panel sensorial entrenado y seleccionado por su capacidad para percibir el sabor amargo. La identificación y cuantificación de los compuestos presentes se llevó a cabo mediante UPLC-DAD-MS. La implicación potencial en el sabor amargo de las moléculas no volátiles analizadas fue estudiada con la ayuda de programas estadísticos.

## 3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.2.1. Disolventes y estándares

Todos los compuestos químicos utilizados fueron de calidad analítica y todos los disolventes cromatográficos utilizados fueron de grado HPLC. El agua ultrapura fue obtenida a partir del sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia). TSK Toyopearl gel HW-50F fue suministrado por TosoHaas (Montgomeryville, PA, U.S.A). El metanol, ácido fórmico, etanol, acetonitrilo, ácido sulfúrico y ácido clorhídrico fueron adquiridos en Scharlab (Barcelona, España). El sulfato de quinina dihidrato (98 %) fue obtenido en Alfa Aesor (Karlsruhe, Alemania). El ácido tartárico, el sulfato de potasio y aluminio y el ácido tánico fueron adquiridos en Panreac (Barcelona, España).

Ovoalbúmina (V-grade), ácido L-tartárico, ácido L-málico, ácido L-láctico, ácido succínico, ácido cítrico, ácido *trans*-aconítico, ácido *cis*-aconítico, ácido siríngico, 6-propil-2-tiouracil, catequina, epicatequina, miricetina, kaempferol, vainillina, éster etílico del ácido protocatéquico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido cafeico y quercetina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Malvidina-3-*O*-glucósido, éster etílico del ácido cafeico, resveratrol, quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-rutinosido, quercetina-3-*O*-galactósido, quercetina-3-*O*-glucurónido, kaempferol-3-*O*-glucósido, isorhamnetina-3-*O*-glucósido, isorhamnetina, epicatequin-galato, epigallocatequina, procianidinas A2, B1 y B2, ácidos ferúlico y p-cumárico fueron proporcionados por Extrasynthese (Genay, Francia). El ácido vainílico fue suministrado por Fluka (Buchs, Suiza).

### 3.2.2. Muestras

Los seis vinos tintos jóvenes comerciales españoles utilizados en el trabajo descrito en el Capítulo 2, apartado 2.2.2., fueron los que se utilizaron en la realización del presente estudio.

### **3.2.3. Preparación de la muestra**

#### **3.2.3.1. Eliminación de los compuestos volátiles de los vinos**

La eliminación de los compuestos volátiles de los vinos se llevó a cabo aplicando la metodología descrita en el apartado 2.2.3. El extracto obtenido se disolvió en 2 mL de etanol/agua (13:87, v/v) y se usó para el siguiente fraccionamiento.

#### **3.2.3.2. Fraccionamiento: obtención de la fracción de compuestos de bajo peso molecular**

El fraccionamiento se realizó de acuerdo con lo descrito en el apartado 2.2.3.2. Los compuestos de bajo peso molecular (azúcares, ácidos orgánicos, ácidos fenólicos, antocianos, flavanoles y flavonoles) fueron eluidos con 240 mL de etanol/agua/ácido fórmico (55:45:1 v/v/v) y recogidos en matraces esféricos de 500 mL. El etanol fue evaporado a vacío y los compuestos presentes en la fracción de bajo peso molecular (LMW-F) fueron liofilizados. Las seis LMW-F procedentes de cada vino fueron reconstituidas en 32 mL de agua embotellada y fueron almacenadas a 4 °C hasta que se llevó a cabo el análisis sensorial. Con el fin de obtener volumen suficiente para suministrar a los catadores cada vino fue fraccionado siete veces. Los análisis químicos se realizaron reconstituyendo las muestras en el mismo volumen de partida que los vinos originales. Ambos análisis, sensorial y químico se llevaron a cabo simultáneamente y en un periodo inferior a 3 meses.

#### **3.2.3.3. Eliminación de azúcares y ácidos de la fracción de bajo peso molecular**

La eliminación de los azúcares y de los ácidos presentes en la fracción de los compuestos de bajo peso molecular (LMW-F), se realizó mediante extracción en fase sólida utilizando cartuchos (Bond Elut LRC C18, 500 mg/mL) de Varian (Darmsdtadt, Alemania). La muestra LMW-F a extraer se redisolvió en 50 mL de agua milliQ ajustada a un pH de 2.5 con 1 M de HCl, por lo que los compuestos presentes en esta fracción estaban en la misma concentración que el vino original. El método de extracción empleado fue el descrito por De Villiers y col.<sup>34</sup> pero con algunas modificaciones. Se empleó metanol en vez de acetato de etilo para la recuperación de la fracción fenólica total y siete mililitros de muestra fueron introducidos en el cartucho en vez de un mililitro. Este volumen de ruptura fue el seleccionado entre un rango testado

de entre 5 a 15 mL. Los cartuchos se preconditionaron con 5 mL de metanol y 5 mL de agua (pH = 2.5, ajustado con 1 M HCl). Los ácidos orgánicos y los azúcares se eliminaron con 5 mL de agua ajustada a pH = 2.5 con 1 M HCl, esta fracción se nombró como fracción acuosa-SPE. Los polifenoles fueron eluidos con 5 mL de metanol y esta fracción sin ácidos y azúcares se denominó F<sub>W/OA</sub> (de las siglas en inglés, without organic acids) o fracción metanólica-SPE. Ambas fracciones se recogieron por separado y se evaporaron a sequedad.

### 3.2.4. Análisis Químicos

#### 3.2.4.1. Análisis de ácidos orgánicos

Los compuestos procedentes de la fracción acuosa obtenida a partir de la extracción en fase sólida fueron analizados mediante UPLC-MS. Los análisis fueron llevados a cabo con un cromatógrafo líquido de la casa Waters Acquity Ultra Performance (Waters, Milford, MA, U.S.A) acoplado a un detector de masas de alta resolución (microTOF II, Bruker Daltonik, Bremen, Alemania) equipado con una fuente multimodal, Apollo II ESI/APCI (ionización mediante electrospray/ionización química a presión atmosférica). Bruker Daltonics (Version 3.4, Waters, Milford, MA, U.S.A) fue el software usado para el control del instrumento y para el procesado e integración de los datos.

*Condiciones cromatográficas.* La columna utilizada para la separación fue una BEH C18 (1.7 µm, 2.1 x 100 mm), protegida con una pre-columna del mismo material (Waters, Milford, MA, U.S.A) y termostaticada a 40 °C. Los compuestos se eluyeron con las siguientes condiciones: flujo de 0.45 mL/min, disolvente: (A) agua/ácido fórmico (0.1 %) con un régimen isocrático de 0 a 6 min., seguido de 100 % de acetonitrilo (B) durante 2 min. para el lavado de la columna y de nuevo 2 min. con el disolvente A para el equilibrado a las condiciones iniciales. El volumen de inyección fue de 7.5 µL. Antes de ser inyectadas, todas las muestras se filtraron por 0.22 µm.

*Cuantificación.* La cuantificación se llevó a cabo en modo negativo. Se realizaron curvas de calibración para el ácido tartárico, cítrico, málico, láctico y succínico (**Anexos V y VI**). El ácido citramálico fue cuantificado con el estándar del ácido cítrico y el ácido fumárico con el estándar del ácido succínico. Los espectros se

adquirieron entre  $m/z$  120 y 1500. El potencial del capilar se fijó en 3.5 kV, el gas nebulizador se utilizó a 3.0 bar y 25 °C, la temperatura del gas de secado fue de 180 °C y el flujo de 9.0 L/min).

### 3.2.4.2. Análisis de compuestos fenólicos

La fracción de bajo peso molecular (LMW-F) obtenida del fraccionamiento mediante permeación en gel y el extracto metanólico obtenido a partir de la extracción en fase sólida fueron analizados mediante UPLC-UV y UPLC-MS/MS usando el mismo sistema descrito en el apartado anterior y los métodos cromatográficos descritos por González-Hernández y col.<sup>35</sup>

*Condiciones cromatográficas.* El flujo y el volumen empleados fueron de 0.45 mL/min y 7.5  $\mu$ L, respectivamente. Los ácidos fenólicos, flavanoles y flavonoles fueron analizados empleando un gradiente de elución con agua/ácido fórmico (0.1 %) como fase A y acetonitrilo/ácido fórmico (0.1 %) como fase B. El gradiente fue el siguiente: de 1 a 8 % de B en 4 min, de 8 a 30 % de B en 7 min, de 30 a 100 % de B en 2.5 min seguido de 3 min de preconditionamiento de la columna a las condiciones iniciales. Para los antocianos, se empleó un gradiente de elución con agua/ácido fórmico (5 %) como fase A y acetonitrilo como fase B. El gradiente de elución fue: de 5 a 15 % de B en 3 min, de 15 a 45 % de B en 9.5 min, de 45 a 100 % de B en 1 min, seguido de 3 min de preconditionamiento de la columna a las condiciones iniciales.

*Cuantificación.* La identificación y cuantificación de los ácidos fenólicos, flavanoles, flavonoles y estilbenos se llevó a cabo mediante UPLC-MS/MS en modo negativo, con la fuente de electrospray adquiriendo de  $m/z$  120 a 1500 (**Anexos VII-IX**). La identificación de los compuestos se consiguió de acuerdo a la siguiente información: tiempos de retención, espectros de masas y las fragmentaciones MS/MS, comparándolos con respecto a sus estándares. Los compuestos para los cuales no se disponía de estándar de referencia, fueron identificados por sus espectros de MS/MS por comparación con los tiempos de retención y los espectros de la literatura.<sup>19,36-38</sup> Para cuantificar se realizaron curvas de calibración de los estándares disponibles. Las concentraciones de ácido caftárico, ácido cutárico y ácido ferúlico fueron determinadas a partir de la curva de calibrado del ácido cafeico.<sup>39,40</sup>



La identificación de antocianos se llevó a cabo mediante UPLC/MS-MS, con la fuente de electrospray adquiriendo entre  $m/z$  50 y 3000 en modo positivo. Consecutivamente, la cuantificación de cada compuesto se llevó a cabo mediante UPLC-UV, adquiriendo a 520 nm (**Anexo X**). El área relativa de cada pico en todos los estándares y vinos se obtuvo usando el etil ferulato como estándar interno. Todos los pigmentos antociánicos fueron cuantificados en base a la malvidina-3-*O*-glucósido.

#### **3.2.4.3. Análisis de parámetros enológicos convencionales**

Estos análisis han sido descritos en el apartado 2.2.4.1.

### **3.2.5. Análisis Sensorial**

#### **3.2.5.1. Evaluación de las muestras**

El panel entrenado para la evaluación de las muestras del Capítulo 2, con el estatus de catadores y súper catadores del sabor amargo, formó parte también de la evaluación sensorial de este estudio, realizando el entrenamiento específico con muestras similares a las del presente estudio. Las seis fracciones de bajo peso molecular (LMW-F) procedentes de cada uno de los vinos (4 mL) fueron evaluadas por duplicado en una única sesión.

Por otra parte, las seis fracciones de bajo peso molecular una vez eliminados los azúcares y los ácidos ( $F_{W/OA}$ ) fueron también evaluadas por los panelistas. Las seis muestras (4 mL) fueron evaluadas en una única sesión, incluyendo tres muestras repetidas para evaluar la consistencia del panel.

#### **3.2.5.2. Estudio sensorial piloto**

Cinco jueces entrenados participaron en este estudio sensorial piloto llevado a cabo con la finalidad de comprobar la efectividad sensorial del método de SPE en la eliminación de los ácidos orgánicos y azúcares. Este estudio fue realizado previo a la evaluación de las  $F_{W/OA}$  por el panel de catadores. Se seleccionó para ello un vino considerado muy astringente y 4 mL de las fracciones obtenidas a partir de este vino, tal y como se detalla en el apartado 3.2.3 fueron evaluadas (la fracción acuosa-SPE, la fracción metanólica-SPE y la fracción de compuestos de bajo peso molecular sin SPE, LMW-F sin SPE). Las fracciones fueron descritas por duplicado y en una única sesión siguiendo el protocolo citado en el apartado 2.2.5.3.

### 3.2.6. Análisis estadístico

Se aplicó un ANOVA a tres factores para cada uno de los atributos evaluados en boca (sabor, astringencia y persistencia) contemplando, en función del tipo de panel (vinos, LMW fracciones y LMW<sub>w/OA</sub> fracciones), jueces (J) y réplicas (R) como factores fijos y todas las interacciones de primer orden fueron también calculadas con el fin de confirmar la consistencia del panel usando para ello el programa estadístico SPSS (IBM, Statistics versión 19, Inc., Chicago, IL, USA). Las diferencias significativas entre los atributos evaluados en boca y las muestras fueron determinadas realizando un análisis de la varianza (ANOVA) a un factor tomando como medidas repetidas los jueces mediante el test de Tukey para un umbral de error del 5 % ( $P < 0.05$ ) usando el programa estadístico previamente citado.

Los coeficientes de correlación de Pearson fueron calculados entre los parámetros sensoriales que habían mostrado diferencias significativas entre muestras y los parámetros químicos analizados en las muestras. La significación se consideró para el umbral de error del 5 % ( $P < 0.05$ ). Los análisis se llevaron a cabo usando el programa estadístico InfoStat, versión 2011 ([www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)) y SPAD, versión 5.5 (CISIA-CESRESTA, Montreuil, Francia).

Con la finalidad de modelizar la relación entre el amargor y los compuestos químicos analizados se utilizó la regresión por mínimos cuadrados o *Partial Least Square Regression* (PLSR) mediante el algoritmo PLS1 del programa Unscrambler 9.7 (CAMO, Trondheim, Noruega). Para el cálculo de PLSR, la matriz con las variables químicas se escaló para obtener datos normalizados. La homocedasticidad y linealidad de los datos se confirmó con el objetivo de evitar la sobreestimación de la bondad del ajuste en el caso de que los datos hubieran sido heterocedásticos. Los datos utilizados en la predicción del amargor mediante PLS fueron el valor medio dado por los panelistas, para lo cual se emplearon los jueces como muestras repetición.

### 3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.3.1. Caracterización de los vinos

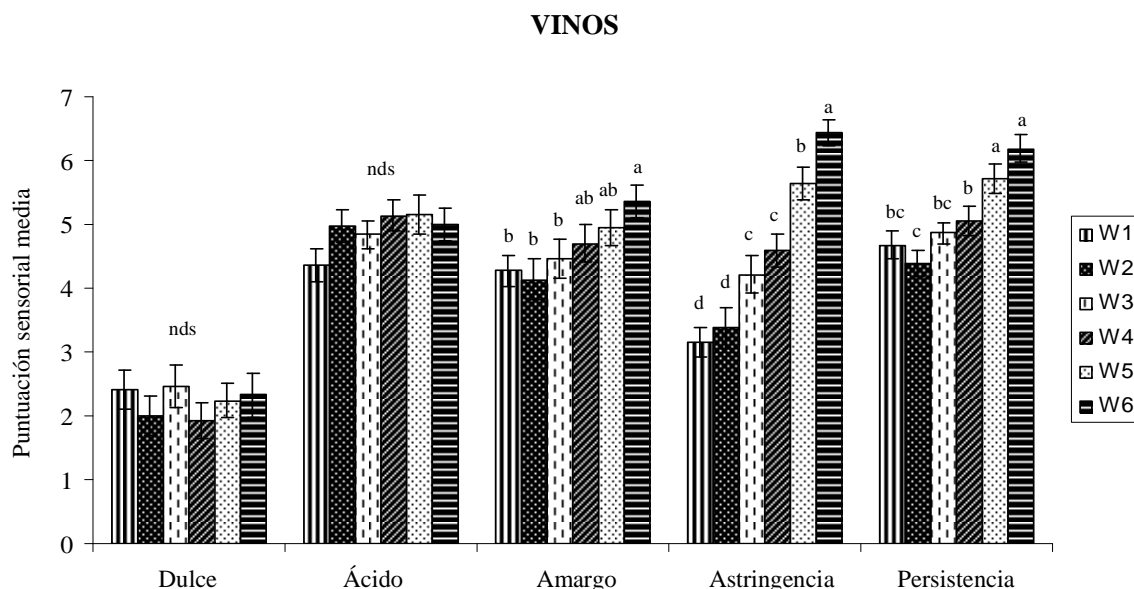
La descripción de los parámetros enológicos de estos vinos junto con su evaluación sensorial se muestra en los apartados 2.3.1 y 2.3.2. Con el fin de facilitar la lectura, la caracterización enológica y sensorial de los vinos se recogen en la **Tabla 3.1** y en la **Figura 3.1**, respectivamente.

**Tabla 3.1.** Origen de procedencia, añada, composición varietal, análisis convencionales y el índice de polifenoles totales (IPT) de los seis vinos tintos seleccionados en el estudio.

	Procedencia	Añada	Variedad	Etanol % (v/v)	pH	Acidez volátil (g/L) <sup>a</sup>	Acidez total (g/L) <sup>a</sup>	Azúcares reductores (g/L)	IPT <sup>b</sup>
W1	Rioja	2008	Tempranillo	12.5	3.62	0.32	4.81	1.18	30.0
W2	VT Cangas	2008	Mencía. Albarín negro	12	3.47	0.31	5.05	1.22	36.8
W3	Valencia	2008	Bobal. Syrah	12.5	3.54	0.30	5.25	3.98	40.8
W4	VT Castilla y León	2007	Tempranillo	13	3.57	0.31	5.14	1.66	55.3
W5	Valdepeñas	2008	Tempranillo	13.5	3.73	0.26	5.33	1.59	59.0
W6	Toro	2008	Tempranillo	14.5	3.89	0.36	4.33	1.69	62.5

<sup>a</sup>Expresado en gramos de ácido tartárico por litro. <sup>b</sup>Índice de polifenoles totales. Expresado en unidades de absorbancia.

Todos los vinos mostraron un buen estado de conservación con valores de acidez volátil inferiores a 0.36 g/L. Los vinos W5 y W6 presentaron el índice más alto de polifenoles totales (IPT) (**Tabla 3.1**). Los seis vinos fueron evaluados con puntuaciones altas para los atributos acidez, amargor, astringencia y persistencia. Únicamente se encontraron diferencias significativas en los atributos amargor, astringencia y persistencia, siendo en el atributo astringencia donde los jueces encontraron mayores diferencias entre los vinos estudiados (**Figura 3.1**). De las correlaciones realizadas entre atributos, solo el amargor y la astringencia mostraron una correlación positiva ( $R^2 = 0.9456$ ,  $P = 0.0011$ ), mostrando a su vez ambos atributos correlación con la persistencia ( $P < 0.001$ , en ambos casos).



**Figura 3.1.** Gráfico con las puntuaciones sensoriales medias de los seis vinos del estudio. Las barras de error están calculadas como  $s/(n)^{1/2}$ ; (s) desviación estándar; (n) número de panelistas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre vinos ( $P \leq 0.05$ ) (test de Tukey); nds, diferencias no significativas.

### 3.3.2. Caracterización sensorial de la fracción de bajo peso molecular (LMW-F)

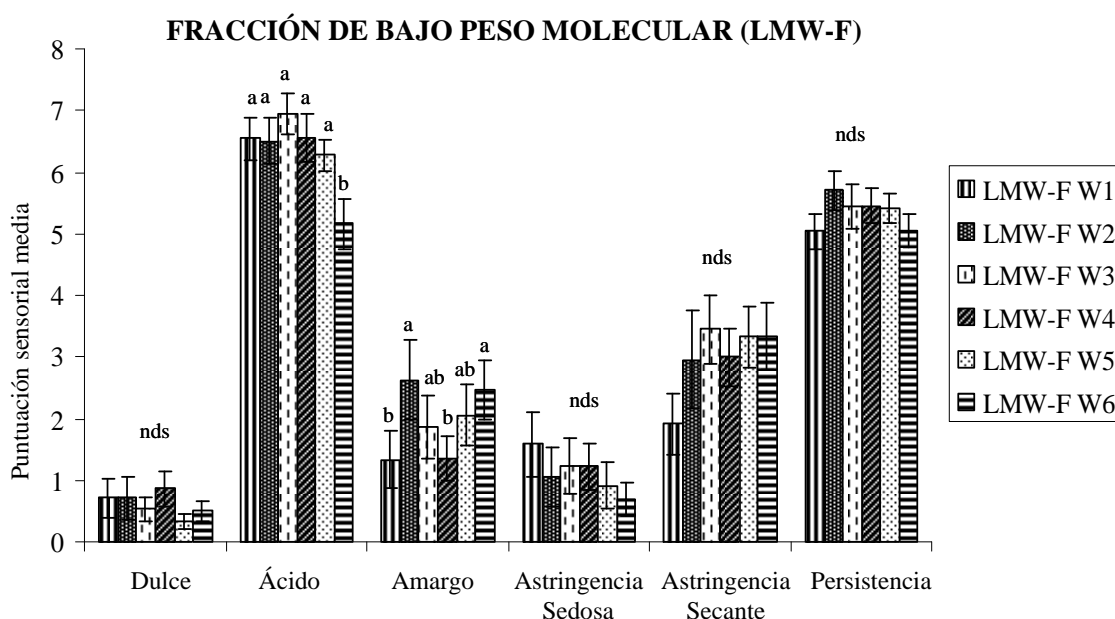
Los ANOVAs a tres factores calculados para cada atributo revelaron que los jueces son una fuente de variación significativa en todos los atributos, ( $P < 0.05$ ) (Tabla 3.2).

**Tabla 3.2.** ANOVAs a tres factores calculados para los atributos evaluados por los 18 jueces en la fracción de bajo peso molecular (LMW-F).

Atributos	Juez (J) (gl = 17)		Fracción (F) (gl = 5)		Réplicas (R) (gl = 1)		F*J (gl = 85)		J*R (gl = 17)		F*R (gl = 5)	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Dulce	4.077	<b>&lt;0.001</b>	1.448	0.217	0.001	0.975	1.430	0.065	0.835	0.649	0.587	0.710
Ácido	5.189	<b>&lt;0.001</b>	5.677	<b>&lt;0.001</b>	0.036	0.851	0.951	0.584	0.522	0.933	0.718	0.612
Amargo	14.865	<b>&lt;0.001</b>	2.454	0.041	0.547	0.462	1.299	0.133	0.590	0.889	0.495	0.779
Astringencia sedosa	7.224	<b>&lt;0.001</b>	1.376	0.243	0.187	0.483	1.272	0.153	0.788	0.700	0.508	0.770
Astringencia secante	2.245	<b>0.009</b>	1.178	0.328	0.249	0.619	1.054	0.411	0.409	0.979	1.031	0.406
Persistencia	7.211	<b>&lt;0.001</b>	0.835	0.529	1.066	0.305	1.088	0.360	0.825	0.660	0.438	0.820

Los efectos significativos ( $P < 0.05$ ) se muestran marcados en negrita; grados de libertad (gl), estadístico F y valores de P.

Como ya se ha citado anteriormente, este efecto es habitual en el análisis sensorial y es debido a las diferencias fisiológicas existentes entre los individuos, ya que cada juez tiene una percepción fisiológica única.<sup>41</sup> Sin embargo, el efecto réplica no fue significativo, indicando una consistencia en la valoración dada por los jueces a ambas repeticiones. La interacción fracción-réplica (F\*R) no fue significativa indicando por tanto que no existen diferencias en la interpretación de los términos y que los jueces estaban bien entrenados con respecto a todos los atributos. A continuación se muestran las puntuaciones sensoriales dadas a las seis fracciones de bajo peso molecular evaluadas (**Figura 3.2**).



**Figura 3.2.** Gráfico con las puntuaciones sensoriales medias de las seis fracciones del estudio. Las barras de error están calculadas como  $s/(n)^{1/2}$ ; (s) desviación estándar; (n) número de panelistas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre vinos ( $P \leq 0.05$ ) (test de Tukey); nds, diferencias no significativas.

Todas las fracciones fueron claramente evaluadas como ácidas, siendo este el sabor predominante en todas ellas. Las puntuaciones para este atributo fueron más del doble que las anotadas para la astringencia, el amargor y el dulzor. Esta puntuación tan elevada en el atributo acidez es debida a la presencia en estas fracciones de los ácidos orgánicos no volátiles como el ácido tartárico y el ácido láctico. Como se observa en la **Tabla 3.3**, el ácido láctico, el ácido tartárico y el ácido succínico se encontraron en concentraciones superiores a su umbral de percepción, por lo tanto, son estos ácidos los que muestran un mayor impacto en la acidez de los vinos.

**Tabla 3.3.** Compuestos analizados mediante UPLC-DAD-MS en ambas fracciones obtenidas a partir de la extracción en fase sólida (fracción acuosa y fracción metanólica). Concentración media, máximo (max) y mínimo (min), max/min, umbral sensorial (expresado in mg/L) y factor DoT para acidez, amargor y astringencia. Los compuestos correlacionados significativamente bien con el amargor, con la astringencia o con la persistencia se resaltan en negrita. (Compuestos citados en orden decreciente de concentración, dentro de cada grupo).

Compuestos	Media (mg/L)	Max (mg/L)	Min (mg/L)	Max/min	Umbral* (mg/L)	DoT factor <sup>a</sup>
<i>Ácidos y derivados</i>						
Ácido láctico <sup>1</sup>	1200	2370	320	7.04	1393 <sup>b</sup>	1.7 <sup>b</sup>
Ácido tartárico <sup>1</sup>	730	1020	tr		44 <sup>b</sup>	23.3 <sup>b</sup>
Ácido succínico <sup>1</sup>	170	340	tr		106 <sup>b</sup>	3.2 <sup>b</sup>
Ácido citramálico <sup>1</sup>	50	130	tr		n.a	
<b>Ácido cutárico<sup>1,2</sup></b>	41.0	64.2	29.2	2.20	10.00 <sup>c</sup>	6.4 <sup>c</sup>
Ácido <i>trans</i> -caftárico <sup>1,2</sup>	30.7	37.5	26.2	1.43	5.00 <sup>c</sup>	7.5 <sup>c</sup>
Ácido cafeico <sup>2</sup>	7.14	11.1	2.88	3.84	13.00 <sup>c</sup>	0.8 <sup>c</sup>
Ácido <i>trans</i> -aconítico <sup>1</sup>	3.78	6.44	2.16	2.98	87 <sup>b</sup> /0.09 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>b</sup> /71.5 <sup>c</sup>
Ester etílico del ácido cafeico <sup>2</sup>	2.50	5.60	1.32	4.24	58 <sup>c</sup> /229 <sup>d</sup>	<0.1 <sup>c</sup> / $<0.1^d$
Ácido ferúlico <sup>2</sup>	2.54	3.19	1.20	2.65	13.00 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Ácido gálico <sup>1,2</sup>	1.57	2.23	0.90	2.48	50.00 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Ácido siríngico <sup>2</sup>	1.88	2.22	1.31	1.70	52 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Ácido vainílico <sup>2</sup>	1.28	2.02	0.61	3.32	53 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Ácido <i>cis</i> -aconítico <sup>1</sup>	1.37	1.64	1.05	1.56	87 <sup>b</sup> /0.09 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>b</sup> /18.2 <sup>c</sup>
Ácido <i>cis</i> -cumárico <sup>2</sup>	0.99	1.40	0.28	4.94	n.a	
Ácido protocatéquico <sup>1,2</sup>	0.47	0.62	0.24	2.63	32.00 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
<b>Ácido <i>trans</i>-cumárico<sup>2</sup></b>	0.23	0.29	0.21	1.36	23.00 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
<b>Ester etílico del ácido protocatéquico<sup>2</sup></b>	0.13	0.19	0.08	2.40	9 <sup>c</sup> /182 <sup>d</sup>	<0.1 <sup>c</sup> / $<0.1^d$
Ácido cítrico <sup>1</sup>	nd	nd	nd		499 <sup>b</sup>	
Ácido fumárico <sup>1</sup>	nd	nd	nd		n.a	
Ácido málico <sup>1</sup>	nd	nd	nd		494 <sup>b</sup>	
<i>Flavonoles<sup>2</sup></i>						
Miricetina	3.88	9.25	3.50	2.64	10.0 <sup>c</sup> /10.0 <sup>d</sup>	0.9 <sup>c</sup> /0.9 <sup>d</sup>
Quercetina	3.85	9.36	0.73	12.87	10.0 <sup>c</sup> /10.0 <sup>d</sup>	0.9 <sup>c</sup> /0.9 <sup>d</sup>
Quercetina-3- <i>O</i> -glucurónido	3.24	7.40	5.90	1.25	1.00 <sup>c</sup>	7.4 <sup>c</sup>
Miricetina-3- <i>O</i> -glucósido	3.41	6.80	2.33	2.92	1.0 <sup>c</sup>	6.8 <sup>c</sup>
Quercetina-3- <i>O</i> -galactósido	1.00	4.06	0.46	8.78	0.20 <sup>c</sup>	20.3 <sup>c</sup>
Siringetina-3- <i>O</i> -galactósido	0.41	0.84	0.24	3.49	n.a	
Isoharmnetina-3- <i>O</i> -glucósido	0.14	0.59	0.10	6.20	1.20 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
<b>Quercetina-3-<i>O</i>-rutinósido</b>	0.22	0.48	0.03	18.72	0.0006 <sup>c</sup>	685 <sup>c</sup>
Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	0.05	0.21	0.10	2.10	1.00 <sup>c</sup>	0.2 <sup>c</sup>
<b>Kaempferol</b>	0.07	0.20	nd		20.0 <sup>c</sup> /20.0 <sup>d</sup>	<0.1 <sup>c</sup> / $<0.1^d$
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	nd	nd	nd	nd	0.3 <sup>c</sup>	
Isoharmnetina	nd	nd	nd	nd		
<i>Flavonoles<sup>2</sup></i>						
<b>Catequina<sup>1,2</sup></b>	34.30	64.18	14.39	4.46	119 <sup>c</sup> /290 <sup>d</sup>	0.5 <sup>c</sup> /0.2 <sup>d</sup>
<b>Procianidina B2</b>	17.84	38.08	5.77	6.60	110 <sup>c</sup> /280 <sup>d</sup>	0.3 <sup>c</sup> /0.1 <sup>d</sup>
<b>Procianidina B1</b>	11.06	25.72	2.58	9.96	139 <sup>c</sup> /231 <sup>d</sup>	0.2 <sup>c</sup> / $<0.1^d$
Epicatequina	13.12	22.96	4.47	5.13	270 <sup>c</sup> /270 <sup>d</sup>	<0.1 <sup>c</sup> / $<0.1^d$
Epigallocatequina	7.23	15.55	1.94	7.99	159 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Procianidina A2	1.16	3.34	nd		n.a	
Epicatequina galato	0.06	0.38	nd		115 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
<b>Catequina galato</b>	0.15	0.31	nd		110 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Procianidina C1	0.08	0.19	nd		260 <sup>c</sup> /347 <sup>d</sup>	<0.1 <sup>c</sup> / $<0.1^d$

<sup>1</sup>Compuestos identificados en la fracción acuosa-SPE. <sup>1,2</sup>Compuestos identificados en ambas fracciones obtenidas a partir de SPE, acuosa y metanólica. <sup>2</sup>Compuestos identificados en la fracción metanólica-SPE. tr:trazas; nd: no detectado; n.a: no disponible. <sup>a</sup>DoTmax se calcula como el cociente de la concentración y el umbral. <sup>b</sup>Factor DoT para la acidez. <sup>c</sup>Factor DoT para la astringencia. <sup>d</sup>Factor DoT para el amargor. \*Los umbrales sensoriales citados han sido tomados de los trabajos de Hufnagel y Hofmann<sup>13</sup>; Scharbert y col.<sup>42</sup>; Dadic y col.<sup>43</sup> y Kamura y col.<sup>44</sup>

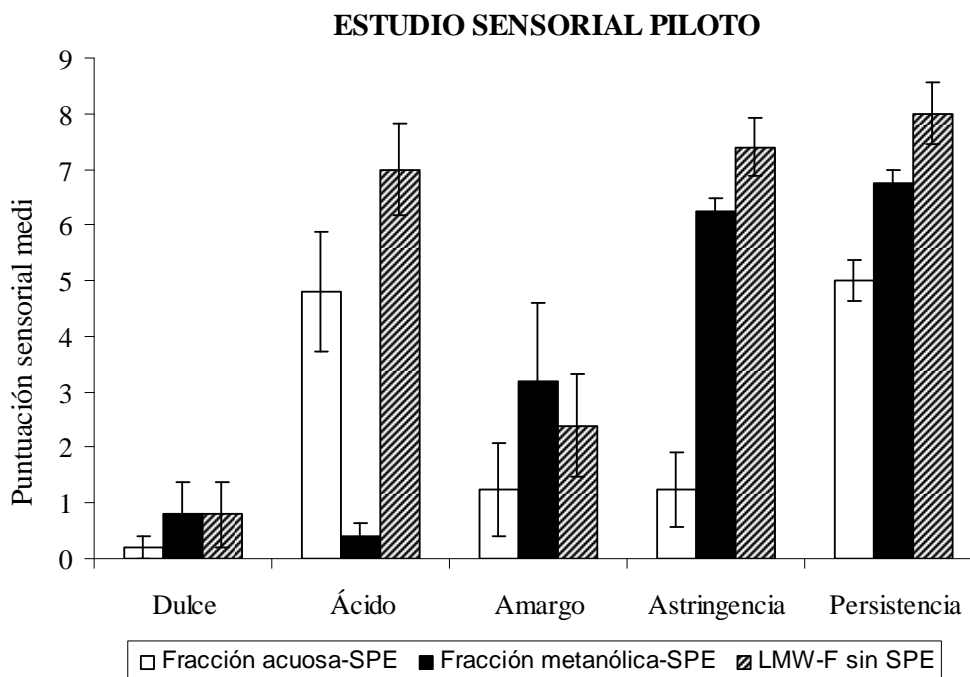
Esto fue también observado por Hufnagel y Hofmann<sup>13</sup>, quienes destacaron la presencia del ácido L-tartárico como un compuesto muy importante en la acidez percibida. La elevada acidez detectada en esta fracción puede ser también explicada debido a la falta en esta fracción de los compuestos fenólicos de alto peso molecular, considerados y evaluados como astringentes, como ha quedado patente en el Capítulo 2 de esta memoria. Estos compuestos parecen modular la percepción de la acidez, disminuyéndola, tal y como se muestra en las puntuaciones de los vinos originales. Otros autores también han observado esta interacción acidez-astringencia, como Luna y col.<sup>45</sup>, en un trabajo sobre licor de cacao y Frank y col.<sup>46</sup> en un estudio sobre vinos, en el cual, la omisión de la fracción que contenía los compuestos fenólicos de alto peso molecular incrementó la acidez percibida. A pesar de la alta acidez mostrada por esta fracción los panelistas describieron esta fracción como astringente y amarga. Sin embargo, resulta relevante el hecho de que no exista ninguna relación entre los compuestos químicos analizados y los atributos sensoriales, posiblemente debido a que la alta acidez percibida pueda estar enmascarando las otras percepciones. Tampoco se han encontrado correlaciones entre las puntuaciones dadas a los atributos sensoriales evaluados en los vinos y las puntuaciones dadas a los atributos sensoriales evaluados en las fracciones.

### 3.3.3. Eliminación de los ácidos

#### 3.3.3.1. Estudio sensorial piloto

Se llevó a cabo un estudio sensorial piloto con el fin de comprobar la efectividad del método de extracción en fase sólida en la retención de los compuestos fenólicos y en la eliminación de los ácidos orgánicos con el fin de eliminar las interferencias causadas por la alta acidez percibida en las fracciones de bajo peso molecular (LMW-F). En este estudio se evaluaron la fracción acuosa procedente de la extracción en fase sólida (Fracción acuosa-SPE), la fracción metanólica procedente de la extracción en fase sólida (Fracción metanólica-SPE) y la fracción de compuestos de bajo peso molecular previa a la extracción en fase sólida (LMW-F sin SPE). Estas fracciones se obtuvieron a partir de un único vino tinto muy astringente (**Figura 3.3**). Los resultados obtenidos muestran que la fracción acuosa, con ácidos, fue percibida como ácida y persistente con valores prácticamente residuales para los atributos amargor y astringencia. En este caso, la persistencia percibida por los panelistas parece deberse a la acidez. Por el contrario, la

fracción metanólica, sin ácidos, evaluada con valores por debajo de 1 para el sabor ácido, fue percibida como amarga y astringente, igual que la LMW-F sin SPE. Cuando la acidez es residual, la persistencia percibida por los panelistas parece ser debida a la astringencia y al amargor.



**Figura 3.3.** Gráfica del estudio sensorial piloto realizado. Comparación entre las dos fracciones obtenidas a partir de SPE y la fracción de partida.

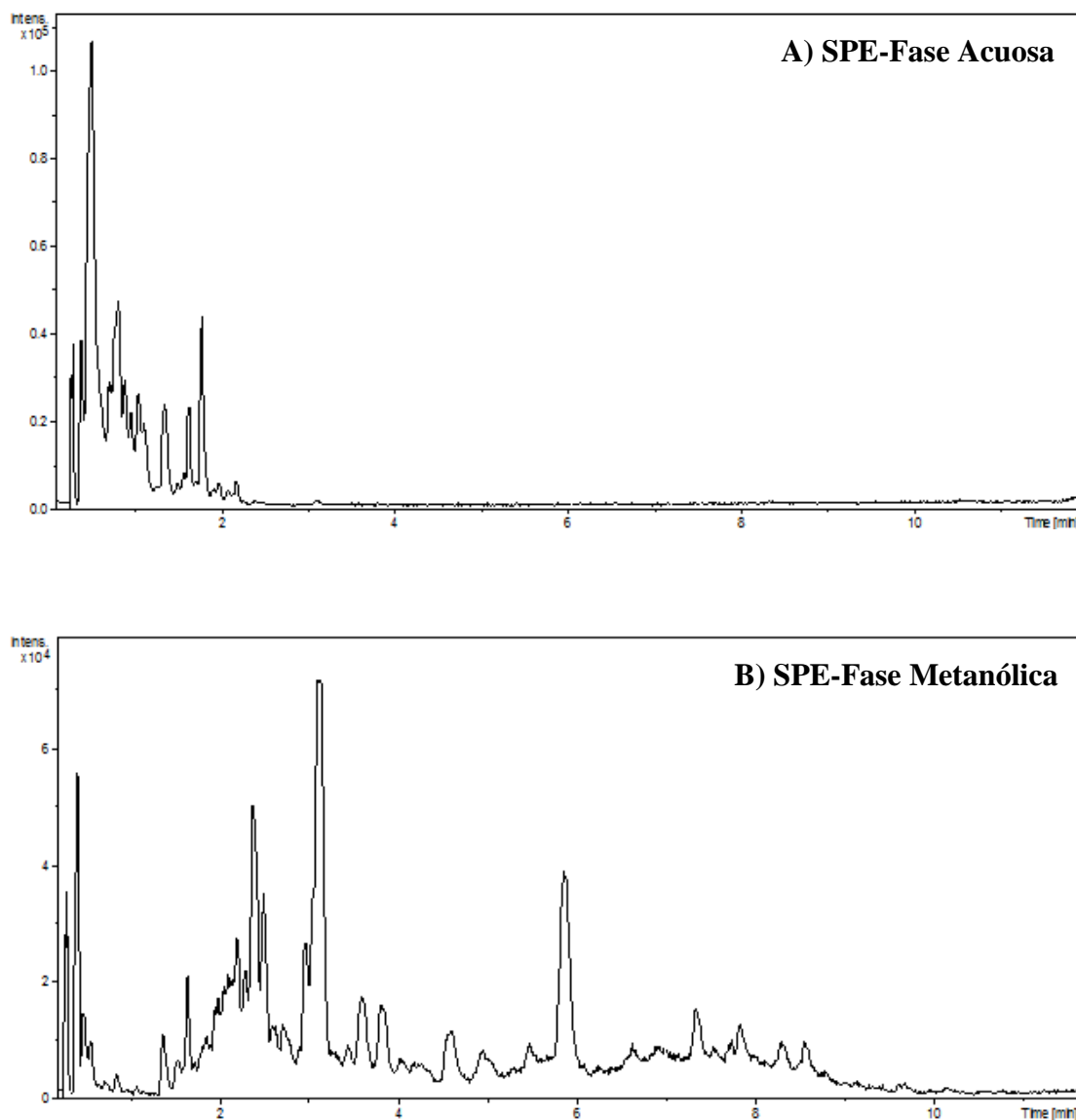
### 3.3.3.2. Eliminación de los ácidos presentes en la fracción

Una vez comprobado en el estudio previo descrito arriba que mediante extracción en fase sólida se puede eliminar la elevada acidez percibida en las muestras, se determinó la efectividad del método en la retención de los compuestos polifenólicos.

El análisis cromatográfico de las fracciones resultantes de la aplicación de la extracción en fase sólida en una de las muestras a estudio se ilustra en la **Figura 3.4**. En ellos se puede observar como en la fracción correspondiente a la fase acuosa o de lavado (**Figura 3.4A**), no hay elución de compuestos a partir del minuto 2 del cromatograma. Esta fracción está principalmente compuesta por ácidos orgánicos, tales como los ácidos tartárico, láctico, citramálico, succínico, *cis/trans* aconítico, y por azúcares. En el cromatograma correspondiente a la fracción eluida con metanol



(Figura 3.4B), se observa como la mayoría de los compuestos aparecen a partir de los dos minutos.



**Figura 3.4.** Cromatograma iónico total correspondiente a la fase acuosa obtenida a partir de la extracción en fase sólida (A). Cromatograma iónico total correspondiente a la fase metanólica obtenida a partir de la extracción en fase sólida (B).

Los resultados muestran como hay compuestos cuya recuperación en la fracción metanólica es baja, como es el caso del ácido gálico y del ácido protocatéquico, los cuales son especialmente eluidos en la fase de lavado o fracción acuosa (agua-acidificada) en un 90 y 57 %, respectivamente. Algunos ácidos hidroxicinámicos como el ácido caftárico y el ácido cutárico también son eluidos en la fracción acuosa pero en

una menor proporción, aproximadamente, un 7 y un 0.5 %, respectivamente. La catequina fue el único flavanol eluido en la fracción acuosa, pero en una baja proporción, en torno a un 3 %. Estos resultados de recuperaciones obtenidos están de acuerdo con los observados por Pérez-Magariño y col.<sup>47</sup> en un estudio centrado en la separación de compuestos fenólicos en vino. Estos autores también observaron que los compuestos más polares, tales como el ácido gálico y el ácido protocatequico eluían principalmente en la fracción acuosa, el ácido *trans*-caftárico se distribuía en ambas fracciones mientras que el *trans*-cutárico y la (+)-catequina aparecían en concentración de trazas en la fracción acuosa. Además, ha sido observado por varios autores<sup>48,49</sup> que el alcohol presente en las muestras reduce la retención de algunos compuestos fenólicos por parte del sorbente, tanto durante la carga como durante las fases de acondicionamiento/lavado, siendo los ácidos hidroxibenzoicos los más susceptibles de sufrir pérdidas. En este estudio, las muestras fueron desalcoholizadas pero sin embargo, la pérdida de ácidos hidroxibenzoicos ha sido igualmente confirmada.

### 3.3.4. Evaluación sensorial de las fracciones sin ácidos (F<sub>W/OA</sub>)

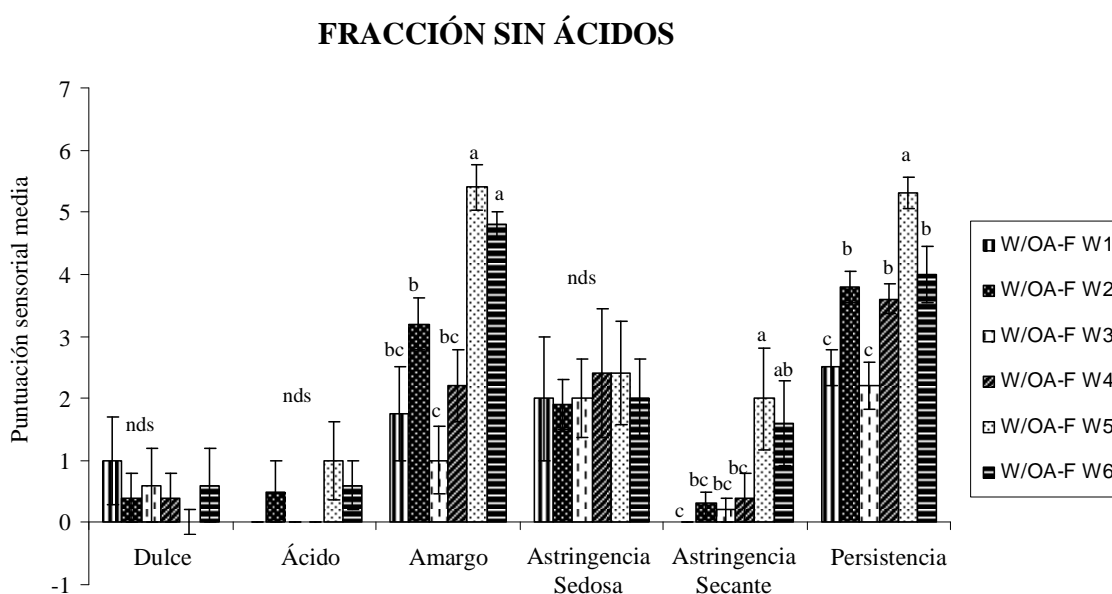
Con los datos sensoriales de la evaluación de las fracciones sin ácidos se han calculado los ANOVAs a tres factores para cada atributo (dulzor, acidez, amargor, astringencia sedosa, astringencia secante y persistencia), incluyendo fracciones, jueces y tres réplicas como factores fijos (Tabla 3.4).

**Tabla 3.4.** ANOVAs a tres factores calculados para los atributos evaluados por los 18 jueces en la fracción de bajo peso molecular sin ácidos (LMW-F<sub>W/OA</sub>).

Atributos	Juez (J)		Fracción (F)		Réplicas (R)		F*J		J*R		F*R	
	(gl = 17)		(gl = 2)		(gl = 1)		(gl = 34)		(gl = 17)		(gl = 2)	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Dulce	16.333	< <b>0.001</b>	2.333	0.147	3	0.114	2.333	0.099	3.00	0.066	1.010	0.402
Ácido	6.061	<b>0.008</b>	0.531	0.604	0.698	0.423	1.268	0.357	0.43	0.818	0.866	0.45
Amargo	3.976	<b>0.030</b>	6.599	<b>0.015</b>	1.378	0.268	0.968	0.508	1.99	0.166	1.429	0.285
Astringencia sedosa	9.522	< <b>0.001</b>	1.857	0.206	0.51	0.491	0.927	0.547	0.804	0.572	1.000	0.402
Astringencia secante	26.387	< <b>0.001</b>	9.048	<b>0.006</b>	0.268	0.616	6.762	<b>0.003</b>	1.768	0.207	0.357	0.708
Persistencia	4.415	<b>0.026</b>	2.236	0.157	0.128	0.728	1.228	0.376	0.333	0.882	0.128	0.881

Los efectos significativos ( $P < 0.05$ ) se muestran marcados en negrita; grados de libertad (gl), estadístico F y valores de P.

Estos datos mostraron que el efecto juez fue significativo en todos los atributos. Ningún efecto réplica fue significativo, lo que indica que el panel fue consistente en la evaluación de los atributos. La interacción fracción-juez ( $F^*J$ ) resultó sólo significativa para el atributo astringencia secante. El análisis de componentes principales (PCA) realizado en este atributo reveló que era sólo un juez el que estaba introduciendo las diferencias en la interpretación de este atributo, por lo que las puntuaciones dadas por este juez en este atributo no se consideraron. La **Figura 3.5** muestra la evaluación sensorial de las seis fracciones de bajo peso molecular después de la eliminación de los ácidos.

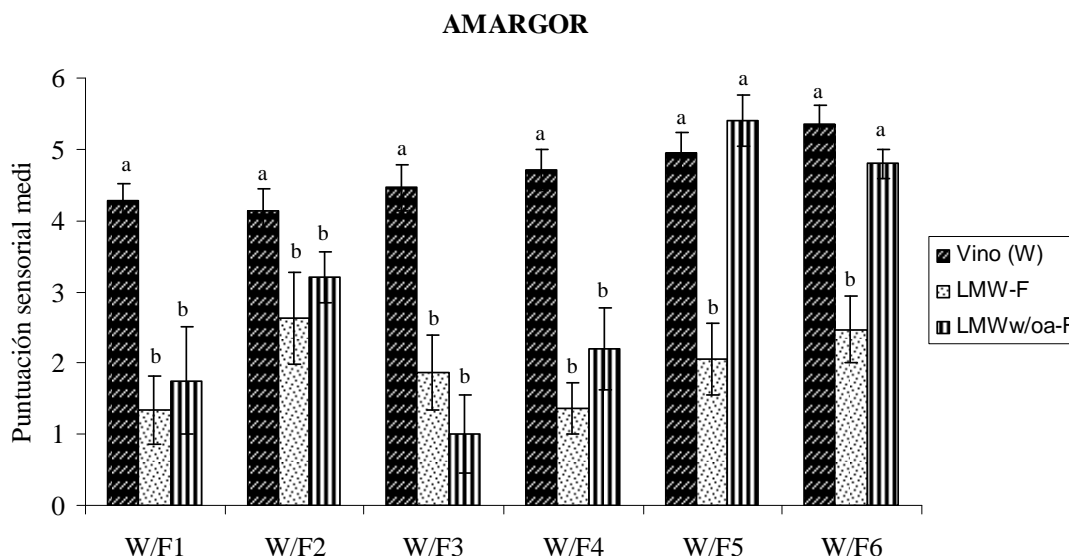


**Figura 3.5.** Gráfico con las puntuaciones sensoriales medias de las seis fracciones sin ácidos del estudio. Las barras de error están calculadas como  $s/(n)^{1/2}$ ; (s) desviación estándar; (n) número de panelistas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre vinos ( $P \leq 0.05$ ) (test de Tukey); nds, diferencias no significativas.

Como era de esperar, la acidez y el dulzor fueron puntuados con valores inferiores a 1, siendo principalmente descritas como amargas y persistentes. En lo que concierne a la astringencia, todas las fracciones fueron evaluadas como sedosas aunque no mostraron diferencias significativas entre ellas. Sin embargo, el atributo astringencia secante, solamente fue percibido en las fracciones procedentes de los vinos W5 y W6, es decir, en los vinos con los mayores IPTs (**Tabla 3.1**). El resto de las fracciones procedentes de vinos que mostraron IPT inferiores fueron descritas con valores  $< 0.4$  en este término. Las puntuaciones dadas para el término astringencia sedosa en las fracciones sin ácidos ( $F_{W/OA}$ ) fueron más altas que las observadas para las LMW-F sin

SPE, por el contrario, las puntuaciones dadas para el término astringencia secante en  $F_{W/OA}$  fueron más bajas que las dadas para las LMW-F sin SPE. Esto puede ser debido a la ausencia de ácidos orgánicos, tales como los ácidos tartárico, succínico, láctico y *cis* y *trans* aconítico, ya que son compuestos que se han descrito como astringentes.<sup>10,13</sup> Otros compuestos fenólicos que han sido parcialmente eliminados en esta  $F_{W/OA}$ , como son el ácido gálico, el ácido protocatéquico, el ácido *trans*-caftárico, el ácido cutárico y la catequina también podrían ser responsables de esta disminución de la astringencia secante, ya que todos estos compuestos han sido descritos con el término de astringencia rugosa.<sup>10,13</sup>

En relación con el sabor amargo, los resultados muestran que las fracciones son significativamente diferentes entre sí, siendo estas diferencias mayores que las diferencias percibidas en las fracciones antes de eliminar los ácidos (**Figura 3.2**). Sin embargo, cabe anotar que las puntuaciones de amargor de las fracciones sin ácidos no están correlacionadas ni con las puntuaciones de amargor de las fracciones con ácidos ni con las de los vinos originales. Este hecho puede ser debido a la presencia de etanol en el vino y no en las fracciones ya que ha sido descrito que el etanol incrementa la percepción del amargor<sup>50</sup> por lo que la ausencia de etanol en las fracciones permitiría poder explicar los menores valores de amargor dados en las fracciones procedentes de los vinos W1, W2, W3 y W4. Sin embargo, esto no puede ser aplicado en el caso de las fracciones procedentes de los vinos W5 y W6, las cuales fueron evaluadas con un amargor similar a los vinos de los que proceden (**Figura 3.6**). La contribución de los ácidos orgánicos al sabor amargo no parece ser importante ya que la eliminación de algunos ácidos orgánicos descritos como amargos<sup>51</sup> no redujeron el amargor percibido en las fracciones ya que todas las fracciones sin ácidos fueron evaluadas como más amargas que sus correspondientes fracciones antes de eliminar los ácidos, a excepción de la muestra 3. Cabe destacar, como se ha anotado anteriormente, los datos del amargor dados por los panelistas a las fracciones sin ácidos procedentes de los vinos W5 y W6 con respecto a las fracciones de los otros cuatro vinos (**Figura 3.6**).



**Figura 3.6.** Gráfica en la que se representa la puntuación dada por los panelistas al atributo amargor en los vinos y en ambas fracciones estudiadas.

Los compuestos de bajo peso molecular presentes en las fracciones LMW<sub>W/OA</sub> están siendo percibidos como amargos en concentraciones bajas y como amargos y astringentes cuando sus concentraciones son más altas. Estos resultados confirman la descripción amarga y astringente existente en la bibliografía para diversos compuestos fenólicos de bajo peso molecular.<sup>13,15,52</sup> Por otro lado, es posible que puedan estar produciéndose efectos de enmascaramiento entre ambos atributos sensoriales. Así, cuando la concentración de los compuestos es baja, como es el caso de las muestras 1, 2, 3 y 4, únicamente es percibido el sabor amargo, mientras que cuando la concentración es mayor, como en las muestras 5 y 6, no solo es posible percibir astringencia sino que la percepción del amargor se incrementa notablemente, alcanzando valores similares a los de los vinos originales. En este caso y de acuerdo con lo apuntado por Stevens<sup>53</sup> el amargor sería la cualidad predominante cuando la astringencia percibida es baja, siendo posible un efecto sinérgico cuando la astringencia, aunque baja, es percibida como ocurre en las muestras 5 y 6. Este efecto podríamos extrapolarlo a los vinos originales (**Figura 3.1**) donde los vinos menos astringentes (W1 y W2) son evaluados más amargos que astringentes. Sin embargo, un perfil contrario se observa en el caso de los vinos más astringentes (W5 y W6), los cuales son evaluados menos amargos que astringentes. Esta modulación sensorial del sabor amargo podría ayudar a entender las pequeñas diferencias encontradas para este atributo en los vinos.

Es importante anotar que todos los panelistas eran capaces de detectar el sabor amargo, es decir, todos participaron en una sesión inicial donde se evaluó su capacidad para detectar este sabor.

En lo que concierne al atributo persistencia, la eliminación de los ácidos (**Figura 3.5**) ha permitido a los panelistas percibir diferencias significativas entre las fracciones; las cuales no fueron observadas en las fracciones con ácidos (**Figura 3.2**). La persistencia mostró una correlación positiva significativa ( $R^2 = 0.86$ ,  $F = 23.78$ ,  $P = 0.0082$ ) con el amargor.

### **3.3.5. Relación entre las propiedades sensoriales en boca y la composición química de la $F_{W/OA}$**

#### **3.3.5.1. Amargor**

El amargor percibido en las seis fracciones sin ácidos ( $F_{W/OA}$ ) está positivamente correlacionado con el ácido cutárico, la procianidina B1, la catequin-galato y el kaempferol ( $P < 0.02$ ), con la (+)-catequina, la procianidina B2, la malvidina-3-*O*-glucósido-8-etil epicatequina + petunidina-3-*O*-(6-acetil)-glucósido, la Vitisina A de malvidina-3-*O*-6-*p*-cumaroil glucósido, la *cis*-malvidina-3-*O*-6-*p*-cumaroil-glucósido ( $P < 0.05$ ), con la quercetina-3-*O*-rutinósido y la petunidin-3-*O*-6-*p*-cumaroil-glucósido ( $P < 0.08$ ) y negativamente con el éster etílico del ácido protocatéquico (**Tabla 3.5**).

**Tabla 3.5.** Coeficientes de correlación de Pearson encontrados entre los atributos sensoriales significativos en boca y los compuestos estudiados en la fracción de bajo peso molecular sin ácidos, LMW<sub>W/OA-F</sub>.

	Amargor	Astringencia secante	Persistencia
Amargor	1		
Astringencia secante	0.93***	1	
Persistencia	0.93***	0.85**	1
Ácido cutárico	0.92***	0.98***	0.82**
Ester etílico del ácido protocatéquico	-0.76*	-0.61	-0.65
Procianidina B1	0.90**	0.99***	0.79*
Catequina	0.85**	0.95***	0.73*
Procianidina B2	0.85**	0.98***	0.79*
Catequina-galato	0.88**	0.72	0.78*
Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosido	0.78*	0.82**	0.89***
Kaempferol	0.90**	0.97***	0.74*
Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-8-etil epicatequina + Petunidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	0.82**	0.89**	0.68
Vitisina A de malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)- glucósido	0.80*	0.93***	0.73
Petunidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	0.85**	0.91**	0.88***
<i>Cis</i> -malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	0.84**	0.71	0.69
Epigallocatequina	0.68	0.84**	0.50
Epicatequina	0.67	0.82**	0.58
Quercetina-3- <i>O</i> -glucurónido	0.48	0.73	0.35
Quercetina	0.69	0.85**	0.47
Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	0.71	0.77*	0.55
Ácido <i>trans</i> -cumárico	0.67	0.60	0.80*
Procianidina C1	0.74	0.83**	0.72

\*\*\*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.05$ , \*  $P < 0.1$

El umbral sensorial del amargor encontrado para algunos de estos compuestos está por encima de las cantidades analizadas en las muestras (**Tabla 3.3**) por lo que resulta difícil predecir si estos compuestos y el resto de compuestos correlacionados para los que se desconoce su valor umbral son capaces de evocar este sabor. Sin embargo, los resultados obtenidos estarían de acuerdo con Scharbert y Hofmann<sup>54</sup> que encontraron que la omisión de flavonoles-3-glicosilados y flavanoles disminuía el amargor percibido, siendo estos compuestos clave en el sabor de las infusiones de té negro. También en esta línea, Laaksonen y col.<sup>55</sup> denotaron como amargos, derivados de los ácidos hidroxicinámicos y Preys y col.<sup>3</sup> anotaron como compuestos amargos a ciertas agliconas de los flavonoles como la miricetina y la quercetina. En relación con las concentraciones detectadas por debajo del umbral de percepción para estos compuestos, Hufnagel y Hofmann<sup>13</sup> anotaron que el amargor del vino puede estar inducido por concentraciones por debajo del umbral sensorial de flavanoles y ésteres etílicos de ácidos fenólicos. Por tanto, en este estudio, dos flavanoles (catequina y catequina-galato), dos dímeros (procianidina B1 y B2), un ácido hidroxicinámico (ácido

cutárico), dos flavonoles (kaempferol y la quercetina-3-*O*-rutinósido) y cuatro antocianos fueron compuestos relevantes en el amargor evaluado en las fracciones, siendo la primera vez, hasta nuestro conocimiento, que el ácido cutárico, el kaempferol y la quercetina-3-*O*-rutinósido han sido descritos como compuestos potencialmente amargos y también la primera vez que el éster etílico del ácido protocatéuico, a pesar de ser descrito como un compuesto amargo ha revelado una correlación significativamente negativa con este atributo. Hasta el momento la quercetina-3-*O*-rutinósido ha sido denotada como un compuesto no amargo pero astringente, y cuya presencia incrementa la intensidad del amargor de otro compuesto amargo como es la cafeína.<sup>54</sup>

#### ***3.3.5.1.1. Predicción del amargor a partir de la composición no volátil mediante PLSR***

La regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR) ha sido aplicada satisfactoriamente en el estudio de la predicción de propiedades sensoriales percibidas en vinos a partir de variables químicas.<sup>56,57</sup> Por esta razón, y con el fin de construir un modelo predictivo para el amargor (variable Y) a partir de la composición no volátil (variable X), se aplicó PLSR y validación completa cruzada.

Como primera aproximación, con el fin de reducir el número de variables predictoras implicadas en modificaciones sensoriales en estas fracciones, solo se consideraron los compuestos que presentaron una correlación de Pearson significativa. Además, se calculó el parámetro DoT<sub>max</sub> (Dose-over-Taste) con el fin de discriminar si los compuestos podrían tener impacto sensorial o no. Para ello, se consideraron los compuestos presentes en concentraciones superiores a su umbral sensorial en al menos una muestra (DoT<sub>max</sub> > 1, ver **Tabla 3.3**). En este caso, el inconveniente es que se desconoce el umbral sensorial del amargor de gran parte de los compuestos. Por ello, teniendo en cuenta que para provocar una diferencia sensorial entre muestras es preciso que existan diferencias en las concentraciones de los compuestos sensorialmente activos; se consideró el cociente de la concentración máxima y mínima (max/min) como criterio de diferenciabilidad.<sup>58</sup> De esta forma, los compuestos que alcanzaron valores de max/min > 2 se consideraron con capacidad suficiente para inducir modificaciones sensoriales. La existencia de diferencias significativas para dichos compuestos entre las fracciones estudiadas se confirmó mediante el análisis de varianza (ANOVA). Tal y como puede observarse en las **Tablas 3.3 y 3.6**, los compuestos sensorialmente activos



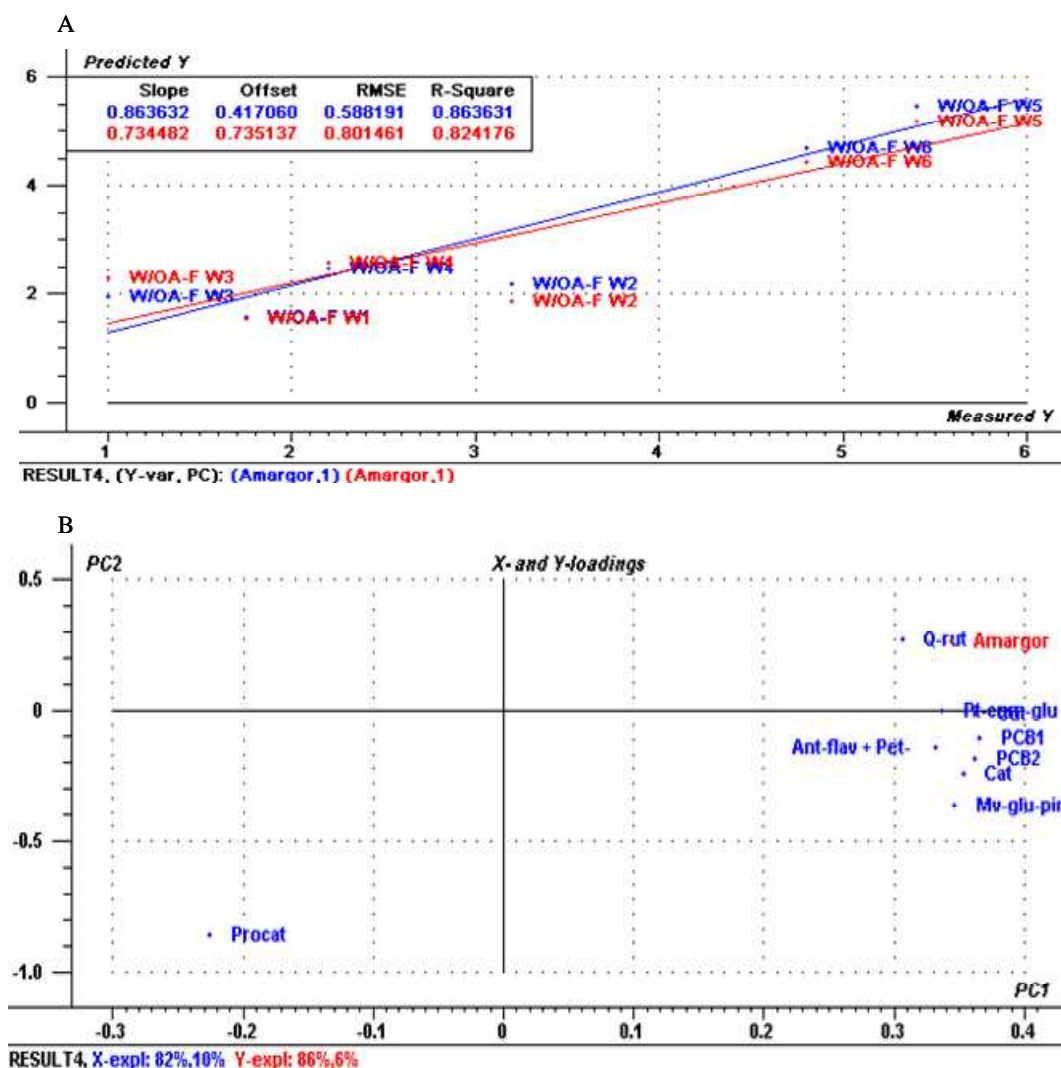
con un mayor poder discriminante en base al cociente max/min fueron: la quercetina-3-*O*-rutinosido (max/min=18.72), la petunidina-3-*O*-6-*p*-cumaroil glucósido (max/min = 13.31), la procianidina B1, (max/min = 9.96), la procianidina B2, (max/min = 6.60), la malvidina-3-*O*-glucósido-8-etil epicatequina que coeluye con la petunidina-3-*O*-(6-acetil)-glucósido (max/min = 5.67) y la catequina (max/min = 4.46). Un segundo grupo estaría formado por las variables con una relación de max/min entre 4 y 2 unidades, en el que se encuentran: la vitisina A de malvidina-3-*O*-6-*p*-cumaroil glucósido, el ácido cutárico y el éster etílico del ácido protocatéquico.

**Tabla 3.6.** Antocianos y derivados analizados mediante UPLC-DAD-MS. Concentración media, máxima (max) y mínima (min) y cálculo de max/min.

Pico <sup>1</sup>	Compuestos*	Media (mg/L)	Max (mg/L)	Min (mg/L)	Max/min
	<b>Antocianos y derivados<sup>2</sup></b>				
1	Vitisina B de delfinidina-3- <i>O</i> -glucósido	0.38	0.71	0.17	4.24
2,2'	Delfinidina-3- <i>O</i> -glucósido + Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-(epi)catequina	12.26	29.79	4.60	6.47
3	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	1.65	3.26	0.70	4.64
4	Petunidina-3- <i>O</i> -glucósido	11.05	26.12	5.22	5.00
5	Peonidina-3- <i>O</i> -glucósido	14.31	26.35	6.31	4.17
6	Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	46.96	80.55	26.03	<b>3.09</b>
7	Vitisina A de peonidina-3- <i>O</i> -glucósido	0.27	0.49	nd	
8	Vitisina A de malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	1.64	2.58	0.91	2.82
9	Delfinidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	1.00	1.96	0.58	3.37
10	Vitisina B de malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	0.39	0.73	0.24	3.09
11	Acetil vitisina B	0.09	0.22	nd	
12	Cianidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	0.24	0.41	nd	
13,13'	<b>Malvidina-3-<i>O</i>-glucósido-8-etil-(epi)catequina + Petunidina-3-<i>O</i>-(6'-acetil)-glucósido</b>	2.65	5.16	0.91	<b>5.67</b>
14	Delfinidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	0.93	2.01	0.43	4.63
15	Malvidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	0.23	0.87	nd	
16	<b>Vitisina A de malvidina-3-<i>O</i>-(6'-<i>p</i>-cumaroil)-glucósido</b>	0.51	0.86	0.21	<b>4.07</b>
17	<b>Petunidina-3-<i>O</i>-(6'-<i>p</i>-cumaroil)-glucósido</b>	1.04	3.51	0.26	<b>13.31</b>
18	<b>Cis-malvidina-3-<i>O</i>-(6'-<i>p</i>-cumaroil)-glucósido</b>	0.14	0.28	nd	
19	Malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido-etil-(epi)catequina	0.05	0.17	nd	
20	Peonidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	0.41	0.68	0.18	3.85
21	Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-4-vinilcatecol + <i>trans</i> -malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	1.54	4.33	nd	
22	Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-4-vinilfenol	0.27	0.57	nd	

\*No se han incluido para estos compuestos los umbrales sensoriales como en la tabla 3 ya que se desconocen. <sup>1</sup>número de pico que aparece en el cromatograma del Anexo X. <sup>2</sup>Compuestos identificados en la fracción metanólica obtenida de SPE. nd: no detectado. En negrita se resaltan los antocianos correlacionados significativamente bien con el amargor, la astringencia o la persistencia.

Tal y como puede observarse en la **Figura 3.7**, la varianza total explicada por la primera componente principal fue del 86 % (82 % por validación cruzada) y la raíz cuadrada del error de predicción (RMSEP) fue de 0.588.



**Figura 3.7.** Representación del amargor predicho frente al dado por el panel con el modelo de calibración (en azul) frente al de validación (en rojo) calculado mediante mínimo cuadrados (PLS1) (A) y gráfico con las variables predictoras significativas del modelo PLS calculado para la predicción del amargor (B).

El modelo incluyó nueve variables significativas: quercetina-3-*O*-rutinósido (Q-rut), petunidina-3-*O*-6-*p*-cumaroil-glucósido (Pet-cum-glu), procianidina B1 (PC-B1), procianidina B2 (PC-B2), malvidina-3-*O*-glucósido-8-etil-epicatequina que coeluye con la petunidina-3-*O*-(6-acetil) glucósido (Ant-flav + Pet-ace-glu), la catequina (Cat), la vitisina A de malvidina-3-*O*-6-*p*-cumaroil-glucósido (Mv-glu-pir), el ácido cutárico (Cut) y el éster etílico del ácido protocatéuico (Procat). Todas las variables se correlacionaron positivamente con el amargor a excepción del éster etílico del ácido

protocatéquico. La importancia de estas variables pueden observarse en el modelo calculado.

$$\text{Amargor} = 1.036 + 0.014*\text{Cut} - 3.928*\text{Procat} + 0.020*\text{PCB1} + 0.009*\text{Cat} + 0.015*\text{PCB2} + 1.273*\text{Q-rut} + 0.126*\text{Ant-flav} + \text{Pet-ace-glu} + 0.656*\text{Mv-glu-pir} + 0.155*\text{Pet-cou-glu}$$

El compuesto que presentó un mayor peso en el modelo fue el éster etílico del ácido protocatéquico. Hasta el momento, parece ser que es la primera vez que tres antocianos muestran correlación con este sabor, siendo la vitisina A de malvidina-3-*O*-6-*p*-cumaroil-glucósido, el antociano que muestra una mayor contribución en el modelo. El flavonol quercetina-3-*O*-rutinósido también presenta una importante contribución mientras que el flavanol monómero, catequina y los dímeros presentan una escasa contribución. De hecho, el trímero C1 identificado también en estas muestras no mostró correlación alguna con el amargor.

En un estudio realizado por Hufnagel y Hofmann<sup>59</sup> se ha observado que las fracciones más amargas son las que contienen ésteres etílicos de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos mientras que las fracciones que contienen flavanoles monómeros y dímeros no son detectadas amargas. Estos resultados parecen estar de acuerdo con la información obtenida en este trabajo debido a la baja contribución presentada por la catequina y las procianidinas B1 y B2 en el modelo. A pesar de ello, estos compuestos han sido considerados clave en el sabor de los vinos.<sup>4</sup> Weber y col.<sup>60</sup>, en un estudio centrado en la caracterización sensorial y química de fracciones fenólicas de vinos tintos obtenidas a partir de cromatografía de permeación en gel, no encontraron ninguna correlación entre los antocianos y los flavanoles estudiados y el sabor amargo; mientras que Soares y col.<sup>20</sup> han detectado diferentes compuestos fenólicos, entre ellos la epicatequina, una procianidina trímera y la malvidina-3-*O*-glucósido capaces de activar en el ser humano distintos receptores del sabor amargo.

### 3.3.5.2. Astringencia

Los flavonoles-3-glicósidos son compuestos que están presentes en las fracciones y que han sido denotados como astringentes, atribuyéndoles la subcualidad de sedosidad.<sup>13</sup> A pesar de ello, no se encontraron diferencias significativas entre las fracciones al estudiar este atributo (**Figura 3.5**). Por el contrario, el término astringencia secante si que fue útil en la caracterización de las muestras, existiendo diferencias significativas entre ellas y por lo tanto, siendo posible la búsqueda de correlaciones entre la composición química y las puntuaciones dadas para este atributo.

Los compuestos químicos que mostraron una correlación significativa positiva con la astringencia secante evaluada en estas fracciones fueron: el ácido cutárico, la (+)-catequina, la procianidina B1, la procianidina B2, el kaempferol y la vitisina A de malvidina-3-*O*-(6'-*p*-cumaroil) glucósido, todos ellos con una  $P < 0.02$ , la (-)-epicatequina, la (-)-epigallocatequina, la procianidina C1, la quercetina-3-*O*-rutinósido, la quercetina, la malvidina-3-*O*-glucósido-8-etil-epicatequina + petunidina-3-*O*-(6'acetil)-glucósido y la petunidina-3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-glucósido con una  $P < 0.05$  y la (-)-catequin-galato y la malvidina-3-*O*-glucósido con una  $P < 0.1$  (**Tabla 3.5**).

De acuerdo a los umbrales sensoriales de todos estos compuestos que se acaban de citar (**Tabla 3.3**), sólo el ácido cutárico y la quercetina-3-*O*-rutinósido presentaron concentraciones por encima de su umbral sensorial, por lo que estos compuestos pueden manifestar astringencia secante en este set de fracciones. La quercetina-3-*O*-rutinósido, junto con otras quercetinas glicosidadas se considera un compuesto clave en la astringencia del té negro<sup>42</sup> siendo capaz de manifestar astringencia aún estando presente en muy bajas concentraciones. Similar a lo descrito para el sabor amargo, Scharbert y Hofmann<sup>54</sup> observaron que la omisión de flavonoles glicosilados afecta significativamente a la percepción de la astringencia, tanto sedosa como secante. Laaksonen y col.<sup>55</sup> encontraron que algunos compuestos fenólicos, en especial, los flavonoles glicosilados y derivados de ácidos hidroxycinámicos se correlacionan fuertemente con la astringencia percibida en fracciones de baya de arándanos. El otro compuesto detectado en concentraciones por encima de su umbral sensorial, el ácido cutárico, ha sido incluido en los modelos de predicción de la astringencia obtenidos por

Sáenz-Navajas y col.<sup>1,10</sup>, en dos grupos de vinos diferentes. En este estudio, cuatro antocianos se correlacionaron con la astringencia percibida.

Oberholster y col.<sup>17</sup> observaron que la presencia de antocianos durante la fermentación incrementaba la intensidad del atributo astringencia, haciendo posible que la presencia de antocianos en los vinos tintos pueda explicar las diferencias percibidas en boca entre vinos blancos y vinos tintos. La adición de antocianos principalmente contribuyó al incremento del sub-atributo astringente de “grano fino” definido por estos autores como una ligera sensación de sequedad percibida en la boca durante la ingesta del vino.<sup>17</sup> Brossaud y col.<sup>61</sup> encontraron que la adición de una mezcla de antocianos a un extracto de taninos procedentes de semillas y hollejos incrementaba la astringencia de la solución por encima de la astringencia detectada en otras fracciones sin antocianos, pero sin tener efecto en el amargor. Otro estudio realizado por Vidal y col.<sup>62</sup> describió que una fracción antociánica incrementaba la astringencia percibida y la sensación de cuerpo de un vino modelo, siendo este incremento considerado irrelevante por estos autores ya que esta fracción fue puntuada en astringencia con puntuaciones más bajas que la fracción proantociánica menos astringente. Es por ello que estos mismos autores, Vidal y col.<sup>28</sup> concluyeron en otro trabajo que una fracción de antocianos altamente purificados no contribuía significativamente al amargor y sí a la astringencia de los vinos.

### 3.3.5.3. Persistencia

La persistencia evaluada en la fracción sin ácidos,  $F_{W/OA}$  estuvo correlacionada con la quercetina-3-*O*-rutinosido y la petunidina-3-*O*-(6'-*p*-cumaroil)-glucósido con una ( $P < 0.02$ ), con el ácido cutárico con una ( $P < 0.05$ ) y con el ácido *trans*-cumárico, la procianidina B1, la procianidina B2, la (+)-catequina, la (+)-catequin-galato y el kaempferol con un ( $P < 0.08$ ) (**Tabla 3.5**). Todos estos compuestos, con la excepción del ácido *trans*-cumárico estuvieron también correlacionados con el amargor y la astringencia percibida. Estos resultados eran esperables ya que como Noble<sup>27</sup> estableció, ambos atributos, amargor y astringencia están caracterizados por una larga persistencia.

### **3.4. CONCLUSIONES**

La fracción de compuestos de bajo peso molecular ha sido evaluada como amarga por los panelistas; sin embargo, no se ha encontrado ninguna correlación entre el amargor evaluado en los vinos y el amargor evaluado en sus correspondientes fracciones de compuestos de bajo peso molecular.

Atributos sensoriales como la acidez y, sobre todo, la astringencia, parecen jugar un papel importante en la percepción del sabor amargo de los vinos.

La eliminación de los compuestos claramente astringentes y ácidos ha permitido poder proporcionar un modelo estadístico significativo para explicar el sabor amargo evaluado en estas muestras por panelistas seleccionados por su capacidad para percibir el sabor amargo.

### 3.5. REFERENCIAS

- (1) Sáenz-Navajas, M.P.; Tao, Y.S.; Dizy, M.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 12407-12416.
- (2) Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, *79*, 1123-1128.
- (3) Preys, S.; Mazerolles, G.; Courcoux, P.; Samson, A.; Fischer, U.; Hanafi, M.; Bertrand, D.; Cheynier, V. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 126-136.
- (4) Arnold, R.A.; Noble, A.C.; Singleton, V.L. Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1980**, *28*, 675-678.
- (5) Gawel, R.; Francis, L.; Waters, E.J. Statistical correlations between the in-mouth textural characteristics and the chemical composition of Shiraz wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 2683-2687.
- (6) Chira, K.; Pacella, N.; Jourdes, M.; Teissedre, P.L. Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1971-1977.
- (7) Blackman, J.; Rutledge, D.N.; Tesic, D.; Saliba, A.; Scollary, G.R. Examination of the potential for using chemical analysis as a surrogate for sensory analysis. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *660*, 2-7.
- (8) Cortell, J.M.; Sivertsen, H.K.; Kennedy, J.A.; Heymann, H. Influence of vine vigor on pinot noir fruit composition, wine chemical analysis, and wine sensory attributes. *American Journal of Enology and Viticulture* **2008**, *59*, 1-10.
- (9) Landon, J.L.; Weller, K.; Harbertson, J.F.; Ross, C.F. Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington State red wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2008**, *59*, 153-158.
- (10) Sáenz-Navajas, M.P.; Avizcuri, J.M.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chemistry* **2012**, *134*, 1484-1493.
- (11) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Avizcuri, J.M.; Valentin, D.; Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V. Contribution of non-volatile and aroma fractions to in-mouth sensory properties of red wines: Wine reconstitution strategies and sensory sorting task. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *732*, 64-72.

- (12) Vidal, S.; Courcoux, P.; Francis, L.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Williams, P.; Waters, E.; Cheynier, V. Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference* **2004**, *15*, 209-217.
- (13) Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 9190-9199.
- (14) Vidal, S.; Francis, L.; Guyot, S.; Marnet, N.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E.J. The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2003**, *83*, 564-573.
- (15) Kallithraka, S.; Bakker, J.; Clifford, M.N. Evaluation of bitterness and astringency of (+)-catechin and (-)-epicatechin in red wine and in model solution. *Journal of Sensory Studies* **1997**, *12*, 25-37.
- (16) Robichaud, J.L.; Noble, A.C. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1990**, *52*, 343-353.
- (17) Oberholster, A.; Francis, I.L.; Iland, P.G.; Waters, E.J. Mouthfeel of white wines made with and without pomace contact and added anthocyanins. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2009**, *15*, 59-69.
- (18) Leach, E.J.; Noble, A.C. Comparison of bitterness of caffeine and quinine by a time-intensity procedure. *Chemical Senses* **1986**, *11*, 339-345.
- (19) Sáenz-Navajas, M.P.; Ferreira, V.; Dizy, M.; Fernández-Zurbano, P. Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *673*, 151-159.
- (20) Soares, S.; Kohl, S.; Thalmann, S.; Mateus, N.; Meyerhof, W.; De Freitas, V. Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 1525-1533.
- (21) Tepper, B.J.; White, E.A.; Koelliker, Y.; Lanzara, C.; D'Adamo, P.; Gasparini, P. Genetic variation in taste sensitivity to 6-n-propylthiouracil and its relationship to taste perception and food selection. *Annals of the New York Academy of Sciences* **2009**, *1170*, 126-139.
- (22) Jones, P.R.; Gawel, R.; Francis, I.L.; Waters, E.J. The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 596-607.
- (23) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Fernández-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 1139-1149.



- (24) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Culleré, L.; Fernández-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 5574-5585.
- (25) Demiglio, P.; Pickering, G.J. The influence of ethanol and pH on the taste and mouthfeel sensations elicited by red wine. *Journal of Food, Agriculture and Environment* **2008**, *6*, 143-150.
- (26) Fischer, U.; Noble, A.C. The Effect of Ethanol, Catechin Concentration, and pH on Sourness and Bitterness of Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **1994**, *45*, 6-10.
- (27) Noble, A.C. Bitterness and astringency in wine , In *Bitterness in Foods and Beverages*, R. L. Rouseff, Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1990**; Vol.25 pp. 145-158.
- (28) Vidal, S.; Francis, L.; Noble, A.; Kwiatkowski, M.; Cheynier, V.; Waters, E. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 57-65.
- (29) Mattes, R.D.; DiMeglio, D. Ethanol perception and ingestion. *Physiology and Behavior* **2001**, *72*, 217-229.
- (30) Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P.L.; Glories, Y. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 286-291.
- (31) Fischer, U.; Boulton, R.B.; Noble, A.C. Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationship between salivary flow rate and temporal perception of gustatory stimuli. *Food Quality and Preference* **1994**, *5*, 55-64.
- (32) Ishikawa, T.; Noble, A.C. Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality and Preference* **1995**, *6*, 27-33.
- (33) Caporale, G.; Policastro, S.; Monteleone, E. Bitterness enhancement induced by cut grass odorant (cis-3-hexen-1-ol) in a model olive oil. *Food Quality and Preference* **2004**, *15*, 219-227.
- (34) De Villiers, A.; Lynen, F.; Crouch, A.; Sandra, P. Development of a solid-phase extraction procedure for the simultaneous determination of polyphenols, organic acids and sugars in wine. *Chromatographia* **2004**, *59*, 403-409.
- (35) González-Hernández, M.; Avizcuri-Inac, J.M.; Dizy, M.; Fernández-Zurbano, P. Ultra performance liquid chromatographic coupled to ultraviolet-vis and mass spectrometry detectors for the screening of organic acids and polyphenols in red wine. In *High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): Principles, Practices and Procedures*, Anonymous ; Nova Science Publishers, Inc: Hauppauge, New York, **2013**.
- (36) Alcalde-Eon, C.; Escribano-Bailón, M.T.; Santos-Buelga, C.; Rivas-Gonzalo, J.C. Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 238-254.

- (37) Gruz, J.; Novák, O.; Strnad, M. Rapid analysis of phenolic acids in beverages by UPLC-MS/MS. *Food Chemistry* **2008**, *111*, 789-794.
- (38) Schwarz, M.; Rodríguez, M.C.; Guillén, D.A.; Barroso, C.G. Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez. *Journal of Separation Science* **2009**, *32*, 1782-1790.
- (39) Guadalupe, Z.; Soldevilla, A.; Sáenz-Navajas, M.P.; Ayestarán, B. Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel permeation chromatography fractionation. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112*, 112-120.
- (40) Hernández, T.; Estrella, I.; Carlavilla, D.; Martín-Álvarez, P.J.; Moreno-Arribas, M.V. Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on lees. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 116-125.
- (41) Bartoshuk, L.M. Separate worlds of taste. (1980) *Psychology Today* *14*, 48.
- (42) Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 3498-3508.
- (43) Dadic, M.; Belleau, G. Proceedings of American Society of Brewing Chemists *American Society of Brewing Chemists* **1973**, 107.
- (44) Kamura, S. & Watanabe, M. Determination of phenolic cinnamates in white wine and their effect on wine quality. *Agricultural and Biological Chemistry* **1981**, *45*, 2063-2070.
- (45) Luna, F.; Crouzillat, D.; Cirou, L.; Bucheli, P. Chemical composition and flavor of Ecuadorian cocoa liquor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2002**, *50*, 3527-3532.
- (46) Frank, S.; Wollmann, N.; Schieberle, P.; Hofmann, T. Reconstitution of the flavor signature of Dornfelder red wine on the basis of the natural concentrations of its key aroma and taste compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 8866-8874.
- (47) Pérez-Magariño, S.; Ortega-Heras, M.; Cano-Mozo, E. Optimization of a solid-phase extraction method using copolymer sorbents for isolation of phenolic compounds in red wines and quantification by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 11560-11570.
- (48) Sun, B.; Leandro, M.C.; de Freitas, V.; Spranger, M.I. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1128*, 27-38.
- (49) Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science* **2007**, *30*, 3268-3295.

- (50) Nurgel, C.; Pickering, G. Modeling of sweet, bitter and irritant sensations and their interactions elicited by model ice wines. *Journal of Sensory Studies* **2006**, *21*, 505-519.
- (51) Whiting, G.C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages-A review. *Journal of the Institute of Brewing* **1976**, *82*, 84-92.
- (52) Drewnowski, A.; Gomez-Carneros, C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: A review. *American Journal of Clinical Nutrition* **2000**, *72*, 1424-1435.
- (53) Stevens, J.C. Detection of very complex taste mixtures: Generous integration across constituent compounds. *Physiology and Behavior* **1997**, *62*, 1137-1143.
- (54) Scharbert, S.; Hofmann, T. Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 5377-5384.
- (55) Laaksonen, O.; Sandell, M.; Kallio, H. Chemical factors contributing to orosensory profiles of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) fractions. *European Food Research and Technology* **2010**, *231*, 271-285.
- (56) Boselli, E.; Boulton, R.B.; Thorngate, J.H.; Frega, N.G. Chemical and sensory characterization of DOC red wines from Marche (Italy) related to vintage and grape cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 3843-3854.
- (57) Koussissi, E.; Paterson, A.; Paraskevopoulos, Y. Factors influencing sensory quality in red wines of the variety Aghiorghitiko (*Vitis vinifera* L.) from Nemea. *European Food Research and Technology* **2008**, *226*, 745-753.
- (58) Escudero, A.; Campo, E.; Fariña, L.; Cacho, J.; Ferreira, V. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 4501-4510.
- (59) Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 1376-1386.
- (60) Weber, F.; Greve, K.; Durner, D.; Fischer, U.; Winterhalter, P. Sensory and chemical characterization of phenolic polymers from red wine obtained by gel permeation chromatography. *American Journal of Enology and Viticulture* **2013**, *64*, 15-25.
- (61) Brossaud, F.; Cheynier, V.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2001**, *7*, 33-39.
- (62) Vidal, S.; Francis, L.; Williams, P.; Kwiatkowski, M.; Gawel, R.; Cheynier, V.; Waters, E. The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry* **2004**, *85*, 519-525.





# **CAPITULO 4.**

**INFLUENCIA DE LOS COMPUESTOS  
FENÓLICOS DE BAJO Y ALTO PESO  
MOLECULAR EN LA PERCEPCIÓN  
GUSTATIVA DE LOS VINOS.**





## 4.1. ANTECEDENTES

El vino es una bebida compleja capaz de evocar múltiples sensaciones en boca.<sup>1</sup> El conocimiento de las interacciones y los equilibrios entre estas sensaciones orales resulta esencial debido a la influencia que éstas ejercen en el gusto del consumidor y por lo tanto, en la aceptación o rechazo del producto degustado. De hecho, los desequilibrios surgidos por la excesiva acidez, astringencia y amargor, son a menudo los primeros defectos percibidos por un catador.<sup>2</sup> Por ello, la mezcla de vinos o “*coupages*” es una técnica antigua de elaboración utilizada para corregir las posibles deficiencias de un vino, para aumentar su complejidad y/o para otorgar e imprimir carácter y tipicidad a vinos elaborados en una determinada bodega o región.

Aunque hay muchos estudios que han descrito las propiedades sensoriales de los compuestos no volátiles presentes en el vino, en especial en vinos tintos<sup>3-7</sup>, el conocimiento de las interacciones sabor-aroma, sabor-sabor y sabor-sensaciones táctiles, se han ido demostrando en los últimos años<sup>6,8-13</sup> siendo la mayor parte de estos trabajos realizados en soluciones modelo sencillas, en su mayoría binarias o ternarias. En esta línea, la realización de estudios de reconstrucción de fracciones no volátiles a partir de un vino tinto<sup>6</sup> así como el estudio del efecto que ejerce la fracción volátil de un vino sobre la composición no volátil y viceversa<sup>12,13</sup> han permitido conocer la influencia, amplificadora o supresora, que ejercen la presencia o ausencia de algunos compuestos en la percepción sensorial de los vinos. Así, Martin<sup>2</sup> en un estudio realizado en un vino base de Champagne demostró que la supresión del sabor ácido (generado por el ácido tartárico) mediante la adición de sacarosa resulta ser significativa y mayor que la supresión del dulzor (generado por la sacarosa) mediante la adición de ácido tartárico, mostrándose por tanto un efecto supresor de la acidez por parte del dulzor. Hufnagel y Hofmann<sup>6</sup> anotaron mediante experimentos de reconstitución que la acidez percibida, impartida por los ácidos tartárico, galacturónico, acético, succínico, málico y láctico era suprimida ligeramente por los cloruros de potasio, de magnesio y de amonio.

Por otro lado, se ha demostrado como la percepción del amargor es suprimida por la presencia de azúcares<sup>14,15</sup> o glicerol<sup>16</sup>, sin que la omisión de compuestos amargos tenga influencia en la sensación de astringencia.<sup>6</sup> En cuanto a esta sensación oral, estudios previos han mostrado que la concentración de taninos no es suficiente para explicar la variación de la percepción de astringencia en vinos.<sup>8,17</sup> Se ha confirmado que los polifenoles asociados con la percepción de astringencia presentan pesos moleculares de entre 500 y 3000 Da<sup>18,19</sup>, sin embargo, también se han encontrado compuestos de bajo peso molecular con capacidad para evocar astringencia, como los flavanoles monómeros<sup>20</sup>, flavonoles glicosilados y ácidos fenólicos<sup>6</sup> y ciertos ácidos orgánicos como el *cis* y *trans* aconítico.<sup>21</sup> Además, como se ha citado en el párrafo anterior, la presencia u omisión de determinados compuestos influye en la percepción de otras cualidades gustativas. Así, la omisión de una fracción vínica que contiene los compuestos de alto peso molecular (fracción astringente) produce una disminución en la puntuación dada para el atributo “cuerpo” y un incremento en la puntuación dada para la acidez<sup>22</sup> mientras que la omisión de los ácidos fenólicos no origina diferencias notables en la percepción de la astringencia, por lo que estos compuestos no parecen contribuir de forma importante en esta percepción.<sup>6</sup>

La interacción dulzor-astringencia ha sido también demostrada en disoluciones sintéticas, observándose como un incremento del dulzor reduce la percepción de la sequedad en boca.<sup>15</sup> En este contexto, un estudio llevado a cabo por Sáenz-Navajas y col.<sup>13</sup> en vinos reconstituidos revela la importancia de la composición volátil de los vinos en la percepción de la astringencia. Estos resultados ponen de manifiesto que un aumento en la concentración de compuestos con notas aromáticas frutales da lugar a un descenso en la percepción de la astringencia y del amargor porque cognitivamente es percibido un aumento del dulzor.

A pesar de la literatura citada, son escasos los trabajos de investigación en vinos enfocados al estudio de las interacciones sensoriales y al estudio del efecto que pueden ejercer los compuestos no volátiles de bajo peso molecular sobre los de alto peso molecular y viceversa, por lo que son necesarias nuevas líneas de investigación que amplíen el conocimiento y aporten luz en el campo de las interacciones en matrices complejas como el vino.



Por esta razón, este trabajo está enfocado al estudio de las interacciones sabor-sabor y sabor-astringencia que tienen lugar en los vinos. Por ello, trabajando con fracciones reconstituidas en una matriz, similar a la matriz vino, se propusieron los siguientes objetivos: (1) obtener vinos reconstituidos con las mismas propiedades sensoriales en boca que los vinos de referencia, (2) comprobar la implicación sensorial de los compuestos no volátiles de bajo y alto peso molecular en la percepción sensorial del vino, (3) relacionar los atributos sensoriales que presentan diferencias significativas entre las muestras con los compuestos químicos implicados en evocar esa percepción.

## 4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 4.2.1. Reactivos

Todos los compuestos químicos utilizados fueron de calidad analítica y todos los disolventes cromatográficos utilizados fueron de grado HPLC. El agua ultrapura fue obtenida a partir del sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia). TSK Toyopearl gel HW-50F fue suministrado por TosoHaas (Montgomeryville, PA, U.S.A). Los cartuchos de polipropileno (6 mL) empaquetados con resina LiChrolut EN fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania). El metanol, etanol, ácido fórmico, acetonitrilo, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, acetona y diclorometano fueron proporcionados por Scharlab (Barcelona, España). El hidroxibutilanisol (BHA), el ácido tánico, vainillina, 6-propil-2-tiouracil, tolueno- $\alpha$ -tiol, (-)-epicatequina-3-*O*-galato (ECG), carbonato de cesio, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ovoalbúmina (V-grade), ácido L-tartárico, L-málico, L-láctico, succínico, cítrico, *cis* y *trans* aconítico, siríngico, (+)-catequina, (-)-epicatequina, miricetina, kaempferol, vainillina, ester etílico del ácido protocatéquico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido cafeico, resveratrol y quercetina fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). Malvidina-3-*O*-glucósido, ester etílico del ácido cafeico, resveratrol, quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-rutinósido, quercetina-3-*O*-galactósido, quercetina-3-*O*-glucurónido, kaempferol-3-*O*-glucósido, isorhamnetin-3-*O*-glucósido, miricetin, kaempferol, isorhamnetin, epicatequina-3-*O*-galato, epigalocatequina-3-galato, epigalocatequina, procianidinas A2, B1 y B2, ácido ferúlico y ácido *p*-cumárico fueron adquiridas en Extrasynthese (Genay, Francia). El sulfato de quinina dihidrato (98 %) se obtuvo en Alfa Aesar (Karlsruhe, Alemania). El sulfato de potasio y aluminio y el cloruro de sodio fueron adquiridos en Panreac (Barcelona, España). El ácido vanílico fue suministrado por Fluka (Buchs, Suiza).

### 4.2.2. Vinos

Los vinos empleados para la obtención de las fracciones no volátiles de bajo y alto peso molecular fueron cuatro vinos tintos jóvenes (W1-W4), un vino tinto envejecido con la categoría de reserva (W5) y un vino rosado (W6). La selección se hizo en base a los diferentes valores del índice de polifenoles totales (IPT), a excepción

de dos de los vinos (W4 y W5) que presentaron valores similares. Ambos se seleccionaron con el fin de comparar vinos de diferentes añadas pero con el mismo IPT. Para la obtención de la fracción volátil se empleó un único vino tinto joven.

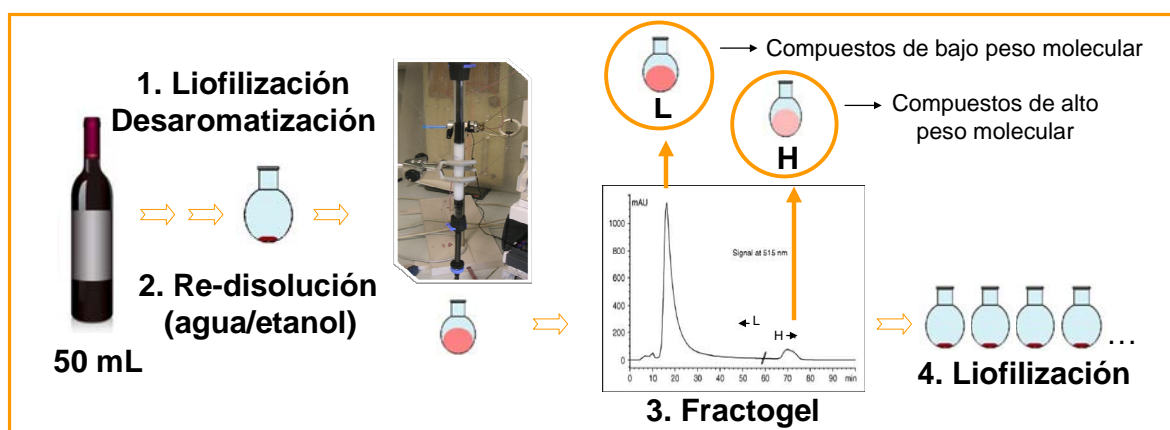
### 4.2.3. Parámetros enológicos convencionales de los vinos

Los parámetros enológicos convencionales de los vinos como el grado alcohólico, pH, acidez volátil, acidez total, ácido málico, ácido láctico y azúcares reductores se determinaron mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (IRTF) con el equipo WineScan™ FT 120 (FOSS®, Barcelona, España), previamente calibrado de acuerdo a los métodos oficiales de la OIV.<sup>23</sup> El índice de polifenoles totales de los vinos fue estimado mediante la medida a 280 nm multiplicada por 100.<sup>24</sup>

### 4.2.4. Deconstrucción y reconstrucción de los vinos

#### 4.2.4.1. Preparación de las fracciones no-volátiles

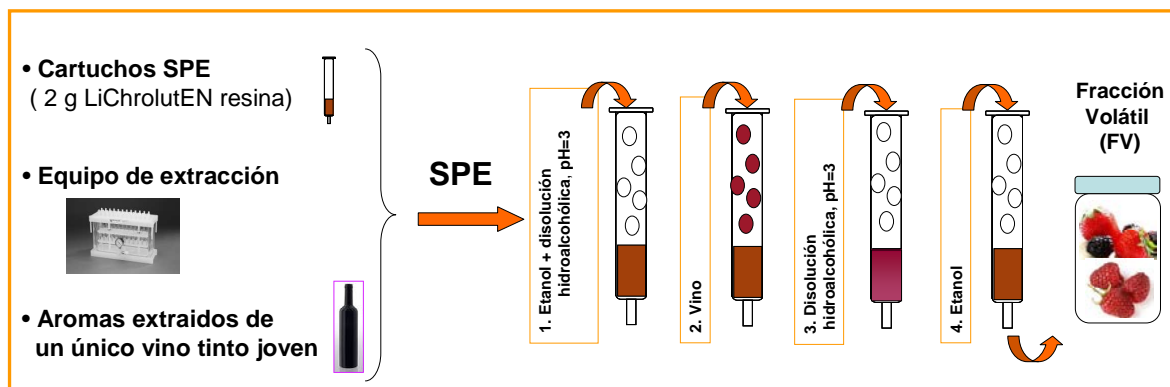
Los seis vinos fueron desalcoholizados, desaromatizados y fraccionados en dos fracciones de bajo y alto peso molecular siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.2.3.1 de esta memoria. El procedimiento seguido se representa de forma gráfica en la **Figura 4.1**.



**Figura 4.1.** Esquema del proceso seguido para la desalcoholización, desaromatización y fraccionamiento del vino.

#### 4.2.4.2. Preparación de la fracción volátil

Los cartuchos de SPE, en reservorios de 6 mL, se rellenaron con 2 g de resina LiChrolut EN. El sistema de extracción empleado fue el VAC ELUT 20 Station de Varian. Los cartuchos fueron acondicionados pasando lentamente 20 mL de etanol y 30 mL de una disolución hidroalcohólica al 12.0 % (v/v), cuyo pH se ajustó a 3.0 con ácido tartárico. Posteriormente se introdujo la muestra en el cartucho, 600 mL de un vino tinto joven. Seguidamente se pasaron por el cartucho 20 mL de disolución hidroalcohólica y los compuestos aromáticos se eluyeron con 20 mL de etanol aplicando presión positiva para evitar así el contacto con el aire. Al extracto se le adicionó butil-hidroxi-anisol (BHA) a una concentración de 10 mg/L y éste se introdujo en viales sin espacio de cabeza libre. Los viales fueron sellados y los extractos se almacenaron a -4 °C hasta la preparación de la muestra. En la **Figura 4.2**, se muestra un esquema del proceso de extracción de la fracción volátil de un vino.



**Figura 4.2.** Proceso de extracción de la fracción volátil de un vino.

#### 4.2.4.3. Muestras reconstituidas

##### 4.2.4.3.1. Vinos reconstituidos

Se prepararon 31 vinos reconstituidos, tal y como se muestra en la **Tabla 4.1**, por combinación de las fracciones de bajo peso molecular (L1, L2, L3, L4, L5, L6) con las fracciones de alto peso molecular de cuatro de los vinos considerados más relevantes para el estudio (H2, H3, H5, H6). Además, una fracción extra (H7), correspondiente a la dilución a la mitad de la fracción H2, fue también incluida en el estudio. Cada fracción

obtenida se disolvió en agua/etanol (13.5 % v/v) y la combinación de ambas fracciones se llevó a 50 mL con esta disolución hidroalcohólica. Todos los vinos reconstituidos fueron dopados con el extracto aromático correspondiente a 50 mL del mismo vino tinto joven.

#### 4.2.4.3.2. Vinos referentes

Se prepararon cinco vinos referentes. La diferencia de estos vinos con respecto a los reconstituidos estribó en que los vinos referentes no fueron fraccionados, pero igualmente, posterior a su liofilización, el grado alcohólico fue ajustado a 13.5 % y fueron dopados con el mismo aroma que los vinos nombrados como reconstituidos. Todas las muestras se reconstituyeron justo antes de llevar a cabo la evaluación sensorial de las mismas.

**Tabla 4.1.** Combinación de las fracciones de alto y bajo peso molecular para la obtención de los vinos reconstituidos.

		Fracciones de bajo peso molecular					
		L1	L2	L3	L4	L5	L6
Fracciones de alto peso molecular	H2	L1H2	L2H2-RW <sub>2</sub>	L3H2	L4H2	L5H2	L6H2
	H3	L1H3	L2H3	L3H3-RW <sub>3</sub>	L4H3	L5H3	L6H3
	H4	----	----	----	L4H4 RW <sub>3</sub>	----	----
	H5	L1H5	L2H5	L3H5	L4H5	L5H5- RW <sub>5</sub>	L6H5
	H6	L1H6	L2H6	L3H6	L4H6	L5H6	L6H6- RW <sub>6</sub>
	H7 (H2 <sub>1/2</sub> )	L1H7	L2H7	L3H7	L4H7	L5H7	L6H7

LxHy: Vinos reconstituidos; RW<sub>x</sub>: vinos referentes. Las líneas punteadas indican que esas combinaciones no fueron realizadas. Los distintos colores indican las muestras evaluadas en cada una de las sesiones sensoriales.

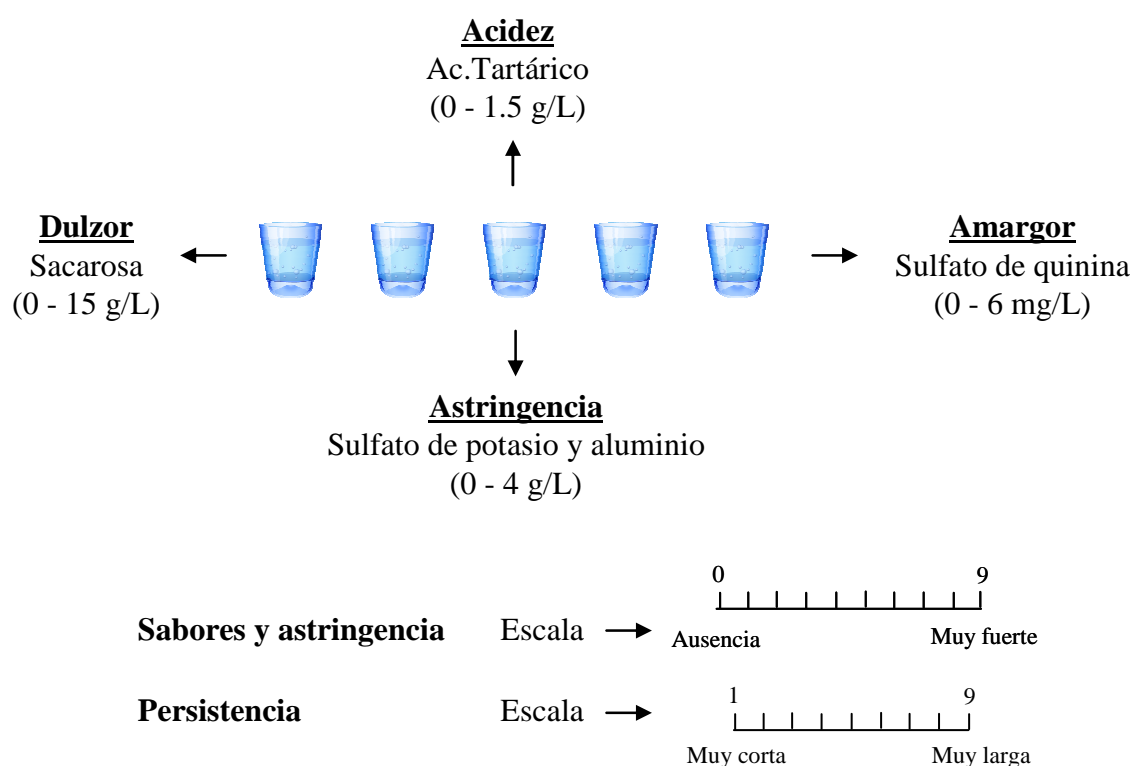
## 4.2.5. Análisis Sensorial

### 4.2.5.1. Panelistas

Un total de 13 personas (5 hombres y 8 mujeres, de edades comprendidas entre 23 y 45 años), todos ellos estudiantes o personal de la Universidad de La Rioja, seleccionados por su capacidad para detectar el amargor (Test de Tepper<sup>25</sup>), participaron en este estudio sensorial.

#### 4.2.5.2. Entrenamiento sensorial

El periodo de entrenamiento consistió en ocho sesiones de una hora de duración, contemplando cuatro sesiones de entrenamiento general y cuatro correspondientes a un entrenamiento específico. El entrenamiento general comenzaba con la presentación a los jueces de diferentes disoluciones representativas de sabores y de sensaciones en boca como la astringencia con el fin de que las ordenasen en función de su intensidad en una escala, tal y como ha sido descrito en el apartado 1.2.6.2 y se representa en la **Figura 4.3.**



**Figura 4.3.** Entrenamiento general en sabores y astringencia junto con las escalas utilizadas.

Durante el entrenamiento específico, los panelistas siguieron evaluando disoluciones de sabores y sensaciones en boca, además de puntuar cuatro vinos reconstituidos y un vino referente, diferentes de los del estudio, pero obtenidos de acuerdo con los protocolos que se han citado previamente. Al final de la sesión, cada panelista exponía la evaluación sensorial que había hecho de cada muestra detallando la puntuación dada a los atributos percibidos.

#### 4.2.5.3. Evaluación de las muestras

La evaluación de las muestras se llevó a cabo en cuatro sesiones, una sesión por semana. En la primera sesión los panelistas describieron los cinco vinos referentes y sus correspondientes cinco vinos reconstituidos, puntuando los atributos mencionados previamente. En las tres sesiones siguientes evaluaron los 26 vinos reconstituidos restantes introduciéndose una muestra repetida por sesión. La ficha entregada a los catadores para la puntuación de las muestras se incluye en el apartado B del **Anexo I**. En la **Tabla 4.1** se representa mediante distintos colores las muestras evaluadas por sesión. Siete mililitros de muestra fueron servidos en copas negras normalizadas<sup>26</sup>, cubiertas por placas Petri, codificadas con números de tres cifras y colocadas de acuerdo a un orden aleatorio para evitar así efecto de acumulación. Durante la evaluación, los panelistas siguieron el protocolo de enjuague propuesto por Colonna y col.<sup>27</sup> y recogido en el **Anexo II**. Todas las muestras se sirvieron a temperatura ambiente y se evaluaron en cabinas individuales. Los panelistas no recibieron información de la naturaleza de las muestras hasta una vez acabado el experimento.

#### 4.2.6. Caracterización química de las fracciones de bajo peso molecular

La composición química de las fracciones de bajo peso molecular (L) fue analizada con los métodos detallados y empleados en los Capítulos 2 y 3. Las distintas fracciones L se disolvieron en 50 mL de agua milliQ con el fin de que los compuestos a analizar se encontrasen en la misma concentración que en el vino de partida. Los análisis realizados se listan a continuación:

- *Análisis de ácidos orgánicos mediante UPLC-UV/Vis-MS*. Las fracciones se decoloraron con carbón activo y se filtraron por 0.22  $\mu\text{m}$ . Previo a la inyección en el cromatógrafo se realizó una dilución 1 a 10 (*apartado 3.2.4.1*).
- *Análisis de compuestos fenólicos mediante UPLC-UV/Vis-MS*<sup>28</sup> (*apdo. 3.2.4.2*).
- *Análisis de proantocianidinas mediante tiolisis-UPLC-MS*<sup>29</sup> (*apartado 1.2.5.2.1*).
- *Índice de polifenoles totales*<sup>24</sup> (*apartado 2.2.4.1*).

#### 4.2.7. Caracterización química de las fracciones de alto peso molecular

La composición química de las fracciones de alto peso molecular fue analizada con los métodos detallados y empleados en los Capítulos 2 y 3, siendo los análisis realizados los que se listan a continuación:

- *Análisis de proantocianidinas mediante tiolisis-UPLC-MS<sup>29</sup>(apartado 1.2.5.2.1).*
- *Análisis de las proantocianidinas precipitables con proteínas<sup>30</sup>(apdo. 2.2.4.2).*
- *Determinación de las proantocianidinas totales mediante el índice de la vainillina<sup>31</sup>(apartado 1.2.5.2.2).*
- *Índice de polifenoles totales<sup>24</sup>(apartado 2.2.4.1).*

#### 4.2.8. Análisis estadístico

Las tres muestras evaluadas por duplicado por los panelistas permitieron determinar la consistencia del panel. Para ello, se calculó para cada atributo (dulzor, acidez, amargor, astringencia y persistencia) un ANOVA a tres factores, con los factores fijos: vino (W), juez (J) y réplica (R). También se realizó un ANOVA a tres factores para evaluar si los vinos referentes y los vinos reconstituidos eran considerados semejantes o no. Para ello, el vino reconstituido fue tratado como una réplica de su vino referente. En ambos casos se usó el software SPSS (IBM, Statistics version 19, Inc., Chicago, IL).

Las diferencias significativas entre compuestos químicos en función de las distintas muestras fueron determinadas realizando un análisis de la varianza (ANOVA) a un factor. Se calcularon correlaciones de Pearson entre las variables químicas y sensoriales. Las diferencias significativas se comprobaron mediante el Test de Tukey para un umbral de error del 5% ( $P < 0.05$ ) mediante el programa estadístico InfoStat, versión 2011 ([www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)).

Se aplicó el análisis de componentes principales (PCA) con las puntuaciones medias de todos los jueces de los cinco atributos evaluados en las muestras reconstituidas. Los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico SPAD (versión 5.5, CISIA-CESRESTA, Montreuil, Francia).



Finalmente, se utilizó la regresión por mínimos cuadrados (*Partial Least Square Regression*) con el algoritmo PLS1 con el fin de obtener una explicación de las puntuaciones dadas por el panel a cada uno de los atributos en boca y los compuestos químicos correlacionados significativamente con cada atributo. El programa utilizado para este fin fue Unscrambler 9.7 (CAMO, Trondheim, Noruega).

## 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.3.1. Vinos

Los parámetros químicos convencionales de los vinos seleccionados en este trabajo se muestran en la **Tabla 4.2**. El rango de IPT de los vinos osciló entre 10 y 84, siendo el valor más bajo el perteneciente a un vino rosado de la variedad Garnacha. Los vinos W4 y W5 presentaron un valor similar, en torno a 56, siendo el W4 un vino joven mientras que el W5 correspondía a un vino envejecido en madera con la categoría de reserva. Los valores de pH oscilaron entre 3.28 y 3.87, mostrando el vino W6 el valor más bajo de pH y a su vez, el valor más alto de acidez total, 7.40 g/L. Los vinos W1 y W6 mostraron un contenido superior de ácido málico e inferior de ácido láctico ya que estos vinos no habían realizado la fermentación maloláctica. La cantidad presente de ácido málico en estos vinos fue de 1.41 y 0.78 g/L, respectivamente, siendo cero el contenido encontrado en el resto de vinos. En todos los vinos, el valor de acidez volátil fue inferior a 0.34 g/L, mostrando por tanto, todos ellos, una buena conservación. El contenido de azúcares reductores fue inferior a 5 g/L, lo esperado en vinos secos, a excepción del vino rosado, W6, el cual mostró un valor ligeramente superior, 5.20 g/L. En cuanto al grado alcohólico, estos vinos presentaron valores (12.5-14.3 % v/v) muy similares a los presentes en otros vinos secos.

**Tabla 4.2.** Denominación de origen, añada, variedad y parámetros enológicos convencionales de los vinos del estudio.

Vinos	Denominación de origen	Añada	Variedad	Etanol (v/v)	pH	Acidez volátil <sup>a</sup>	Acidez total <sup>b</sup>	Ácido málico <sup>c</sup>	Ácido láctico <sup>c</sup>	AR <sup>d</sup>	IPT <sup>e</sup>
W1	Rioja	2010	Tempranillo	12.5	3.87	0.31	6.99	1.41	0.62	4.07	84
W2	Rioja	2010	Tempranillo	14.3	3.58	0.21	6.73	0	2.68	2.34	64
W3	Rioja	2010	Tempranillo	13.75	3.62	0.20	6.25	0	2.53	2.12	49
W4	Somontano	2010	Tempranillo/ Cabernet Sauvignon	13.7	3.48	0.18	7.12	0	1.61	3.04	57
W5	La Mancha	2006	Tempranillo/ Cabernet Sauvignon	13.4	3.63	0.34	6.70	0	3.04	3.40	56
W6	Navarra	2010	Garnacha	13.5	3.28	0.27	7.40	0.78	0.25	5.20	10

<sup>a</sup>Expresado en gramos de ácido acético por litro, <sup>b</sup>Expresado en gramos de ácido tartárico por litro, <sup>c</sup>Expresado en gramos por litro. <sup>d</sup>Azúcares reductores expresados en gramos por litro, <sup>e</sup>Índice de polifenoles totales expresado en unidades de absorbancia.

### 4.3.2. Vinos referencia y vinos reconstituidos

El ANOVA aplicado a los datos sensoriales de los tres vinos introducidos como repetición en cada una de las sesiones de evaluación reflejó que los panelistas entrenados eran reproducibles y consistentes (**Tabla 4.3**).

**Tabla 4.3.** ANOVAs a tres factores calculados para los atributos evaluados por los 13 jueces en las tres muestras introducidas como repetición.

Atributos	Juez (J)		Vino (W)		Réplicas (R)		W*J		J*R		W*R	
	(gl = 12)		(gl = 2)		(gl = 1)		(gl = 24)		(gl = 12)		(gl = 2)	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Dulce	11.152	<0.001	10.654	0.002	0.651	0.433	2.013	0.101	2.388	0.079	0.380	0.691
Ácido	4.937	<0.001	2.582	0.096	0.266	0.611	1.284	0.273	1.965	0.077	0.022	0.978
Amargo	16.841	<0.001	5.995	0.008	0.349	0.56	1.221	0.314	0.663	0.768	2.354	0.117
Astringencia	2.809	0.015	1.442	0.256	0.15	0.903	0.836	0.667	0.559	0.852	0.666	0.523
Persistencia	6.264	<0.001	0.074	0.929	0.011	0.919	1.462	0.179	0.853	0.601	0.704	0.505

Los efectos significativos ( $P < 0.05$ ) se muestran marcados en negrita, grados de libertad (gl), estadístico F y valores de P.

Los cinco vinos referencia ( $RW_x$ ) y los cinco vinos reconstituidos a partir de sus fracciones ( $LxHy$ ) (**Tabla 4.1**) fueron evaluados sensorialmente en boca por el panel entrenado. En ambas preparaciones (referencia y reconstituidos), los vinos fueron desalcoholizados y desaromatizados de acuerdo con el procedimiento descrito por Sáenz-Navajas y col.<sup>13</sup> y posteriormente fueron reconstituidos con el mismo contenido alcohólico y dopados con el mismo extracto aromático. La elección de esta homogeneidad en alcohol y aromas se llevó a cabo debido al posible efecto que tanto el contenido alcohólico como los aromas presentan en la percepción del amargor y de la astringencia. Así, ha sido descrito que una disminución en el contenido alcohólico puede incrementar la astringencia percibida<sup>32</sup>, mientras que un incremento en el contenido alcohólico incrementa el amargor percibido.<sup>33</sup> Por otra parte, Sáenz-Navajas y col.<sup>13</sup> observaron como la adición de aromas frutales a un vino modelo reconstituido provocaba la disminución en la percepción de la astringencia y del amargor.

El ANOVA realizado con las puntuaciones dadas a los atributos evaluados en boca para los cinco pares de vinos, vino referencia y su correspondiente vino reconstituido, ( $RW_x$  y  $LxHx$ ) se muestra en la **Tabla 4.4**.

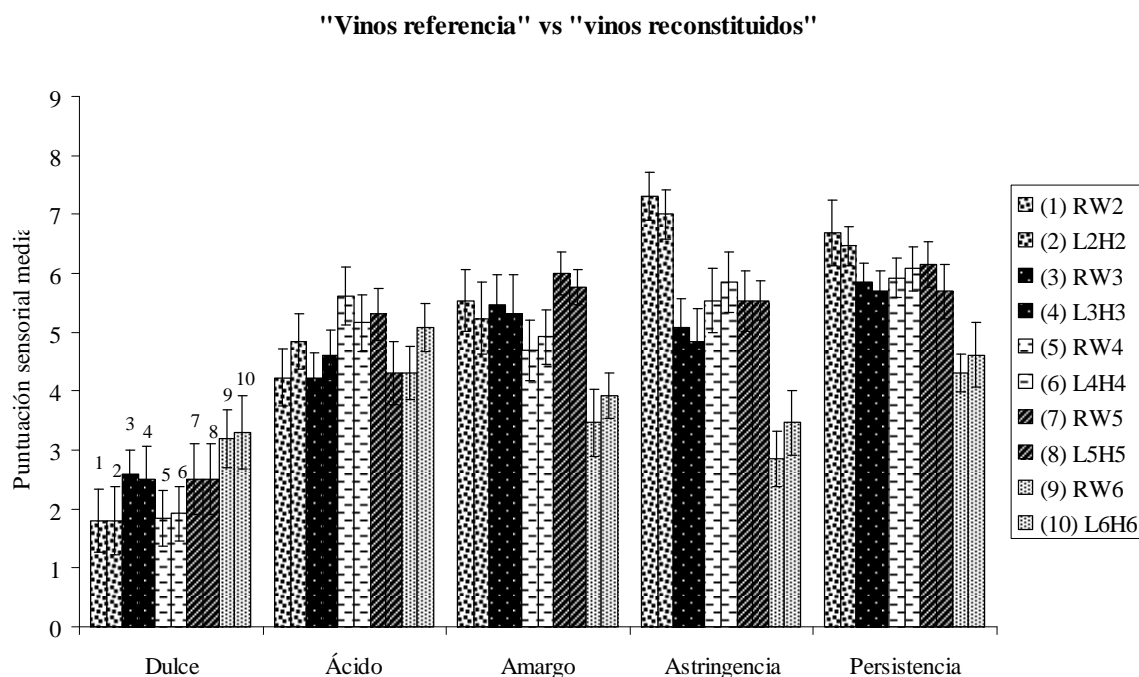
**Tabla 4.4.** ANOVAs a tres factores calculados para los atributos evaluados en boca por los 13 jueces en los 5 vinos reconstituidos y referentes.

Atributos	Juez (J)		Vino (W)		Réplicas (R)		W*J		J*R		W*R	
	(gl = 12)		(gl = 4)		(gl=1)		(gl=48)		(gl=12)		(gl=4)	
	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Dulce	19.382	<0.001	7.243	<0.001	0.350	0.852	1.616	0.077	1.137	0.354	0.254	0.906
Ácido	6.516	<0.001	2.139	0.090	0.072	0.789	1.246	0.224	0.847	0.603	2.211	0.082
Amargo	4.922	<0.001	8.275	<0.001	0.000	1.000	1.323	0.168	0.745	0.701	0.321	0.862
Astringencia	2.626	<b>0.009</b>	19.52	<0.001	0.069	0.794	0.915	0.620	0.649	0.789	0.345	0.846
Persistencia	6.348	<0.001	11.565	<0.001	0.140	0.710	1.102	0.369	1.102	0.381	0.449	0.72

Los efectos significativos ( $P < 0.05$ ) se muestran marcados en negrita, grados de libertad (gl), estadístico F y valores de P.

Como puede ser observado en la **Tabla 4.4**, no existen diferencias significativas en el efecto réplica en ninguno de los atributos estudiados, es decir, no existen diferencias entre muestras referentes (RWx) y muestras reconstituidas (LxHx), teniendo por tanto, ambas, las mismas propiedades sensoriales. Estos resultados muestran que los compuestos no volátiles responsables de los atributos en boca se retienen en las muestras reconstituidas a pesar del fraccionamiento realizado. En un experimento previo llevado a cabo en nuestro grupo de investigación se demostró que no existían diferencias en la composición no volátil entre vinos referencia y vinos embotellados<sup>34</sup>, por lo que se puede considerar, que en cuanto a su composición no volátil, los vinos reconstituidos de este trabajo podrían ser comparables a los vinos comercialmente embotellados. Por lo tanto, los resultados obtenidos muestran que tanto el método de separación como la posterior combinación de las fracciones se llevaron a cabo de manera correcta ya que los panelistas no fueron capaces de encontrar diferencias sensoriales entre ambas muestras, muestras referentes y reconstituidas.

El ANOVA realizado mostró diferencias significativas en cuatro de los cinco atributos evaluados: dulzor, amargor, astringencia y persistencia (**Tabla 4.4**). Los resultados obtenidos de las diez muestras evaluadas se muestran en la **Figura 4.4**.



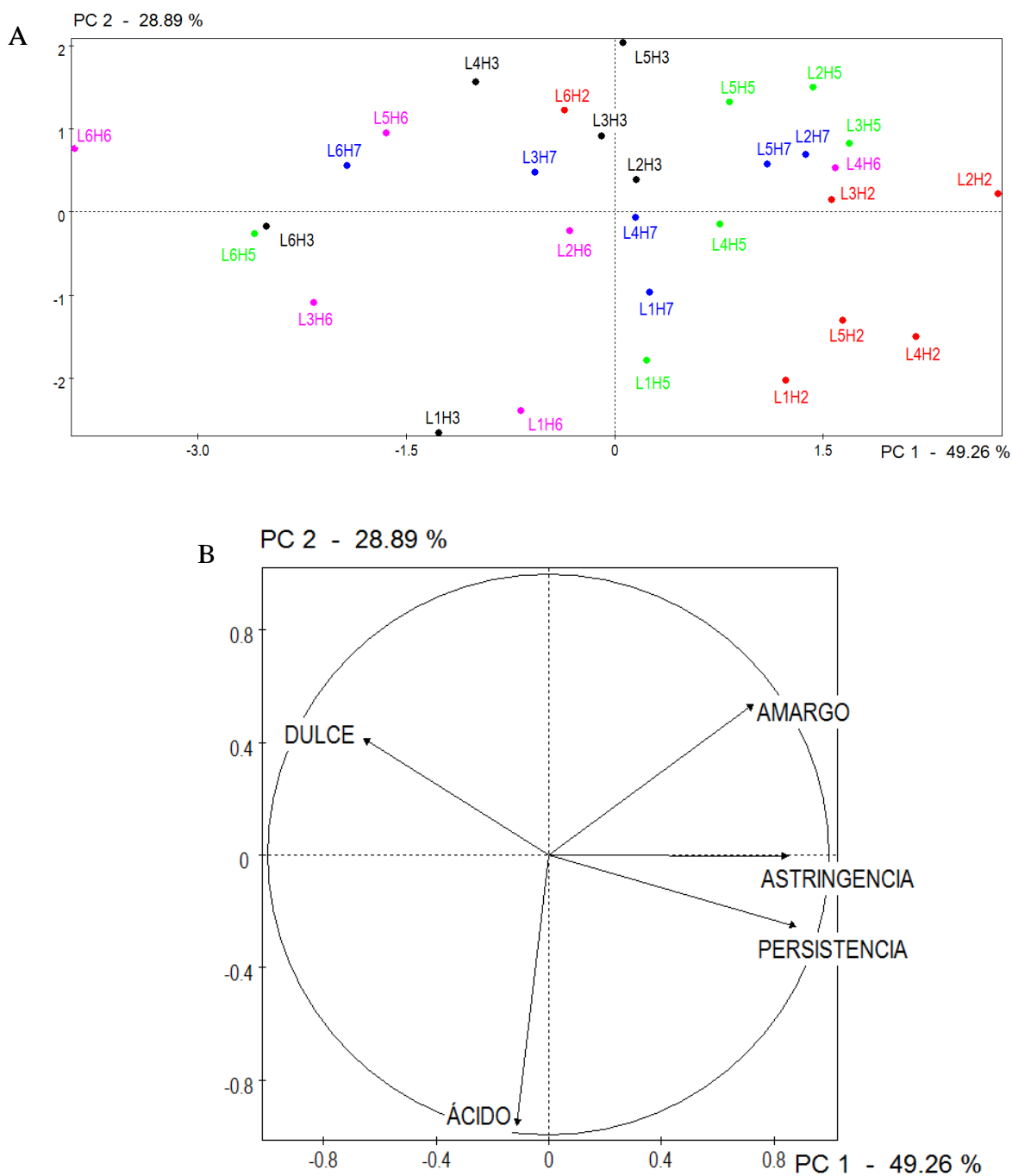
**Figura 4.4.** Gráfico con las puntuaciones sensoriales medias de los cinco vinos referentes (ej. RW2) y sus correspondientes reconstituidos (ej. L2H2). Las barras de error están calculadas como  $s/(n)^{1/2}$ ; (s) desviación estándar; (n) número de panelistas.

Las muestras RW6 y L6H6 fueron percibidas diferentes del resto en el caso del dulzor, del amargor, de la astringencia y de la persistencia. Así, esta muestra fue considerada la más dulce y la menos amarga, astringente y persistente. El vino más amargo fue el RW5 y L5H5, pero sin observarse diferencias significativas con los vinos RW2 y L2H2 y RW3 y L3H3. En cuanto a la astringencia, el ANOVA realizado mostró tres grupos de vinos claramente diferenciados. Las muestras RW6 y L6H6, fueron las menos astringentes (puntuación = 3), siendo su IPT = 10, las muestras RW2 y L2H2 fueron las más astringentes (puntuación = 7) con un IPT de 64, el mayor de los vinos estudiados en este trabajo. Las otras tres muestras con IPTs de 49, 57 y 56 fueron puntuadas con valores en torno a 5 puntos, sin mostrar diferencias significativas entre ellas.

### 4.3.3. Implicación de las fracciones de bajo peso molecular en las características sensoriales de los vinos

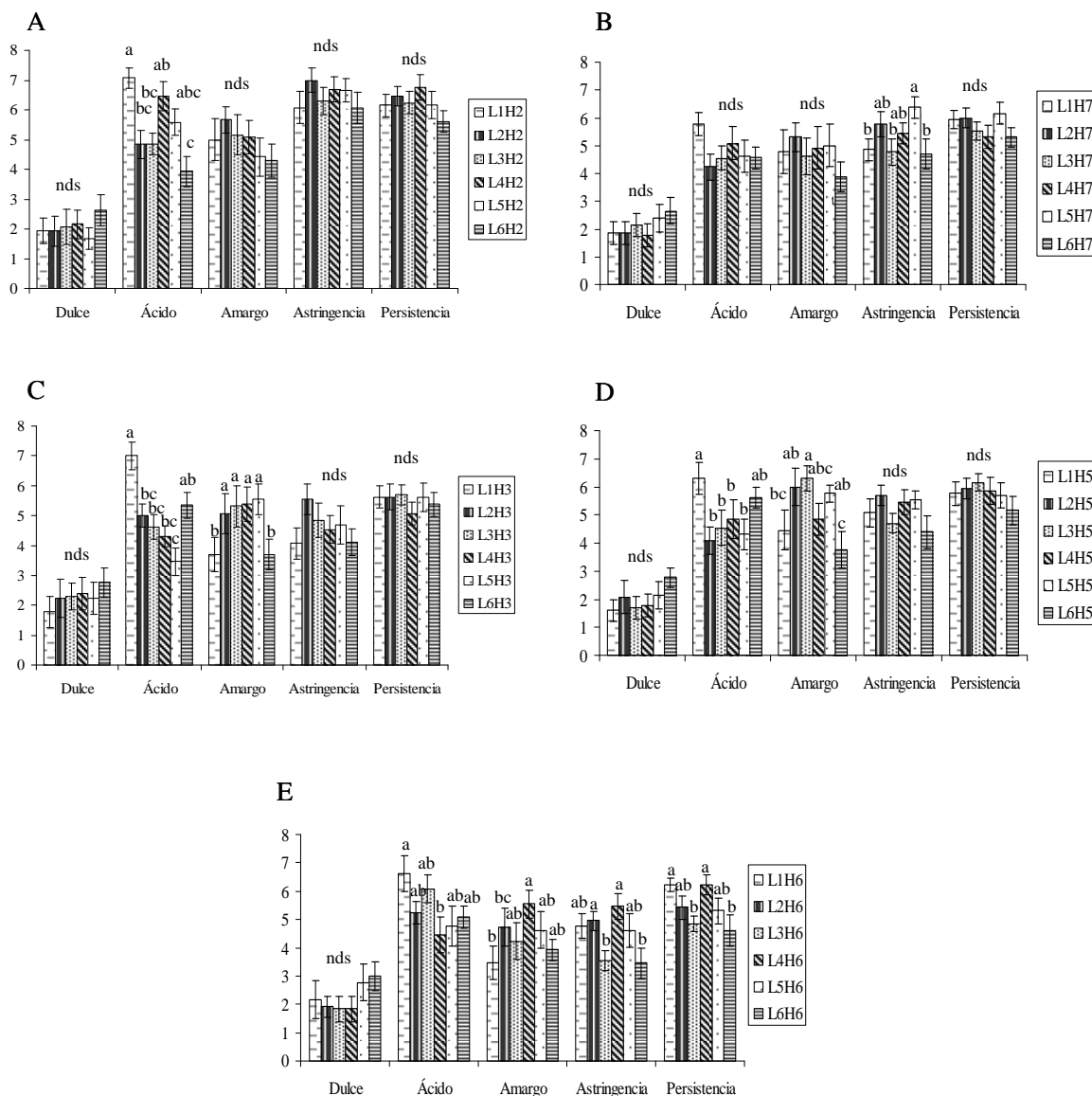
#### 4.3.3.1. Propiedades sensoriales en boca de las muestras reconstituidas

Los resultados del análisis sensorial en boca de las muestras reconstituidas en las que una misma fracción de alto peso molecular (H) se combinó con las diferentes fracciones de bajo peso molecular (Lx) procedentes de los vinos descritos anteriormente se muestran en las **Figuras 4.5 y 4.6**. En la **Figura 4.5** se muestra el plano bidimensional resultante del análisis de componentes principales (PCA) cuyas dos primeras componentes principales (PC) acumularon más del 78 % de la varianza total. Puede observarse que en el caso de las muestras reconstituidas con la fracción H6 (procedente de un vino rosado) estas aparecen dispersas por el plano. Así, la adición de distintas fracciones de bajo peso molecular (Lx) a la fracción H6, fracción con un bajo contenido en proantocianidinas (38 mg/L de PAs), provoca un desplazamiento de las muestras hacia valores más altos de la primera componente (hacia la derecha de la muestra L6H6). En el caso de las muestras reconstituidas con fracciones H procedentes de vinos tintos, H2, H3, H4, H5 y H7 puede observarse, en general, una menor dispersión de las muestras, así algunas muestras con la misma fracción H aparecen agrupadas a pesar de estar reconstituidas con diferentes fracciones L, sin embargo, en todos los casos hay muestras reconstituidas con algunas fracciones L alejadas de su grupo. Así mirando el grupo de muestras reconstituidas con la misma fracción H2 (1039 mg/L de PAs), dos muestras se sitúan a la derecha del plano (L2H2 y L3H2), tres en la parte inferior derecha del plano (L1H2, L5H2 y L4H2) y una (L6H2) en el centro superior del plano. Algo similar puede ser observado con los grupos de muestras reconstituidas con fracciones con un contenido en proantocianidinas intermedio (LxH3, LxH5 y LxH7). Estas muestras se proyectan en el centro del plano del PCA agrupadas principalmente por la fracción H y únicamente algunas muestras, las reconstituidas con las fracciones L6 (vino rosado) y L1 (vino tinto sin fermentación maloláctica) son desplazadas de su grupo correspondiente.



**Figura 4.5.** Proyección de las 30 muestras reconstituidas (A) y de los atributos sensoriales (B) en el plano definido por las dos primeras componentes principales.

En la **Figura 4.6** se muestra más detalladamente las variaciones sensoriales en boca que las distintas fracciones de bajo peso molecular (fracciones L) pueden provocar en cada grupo de muestras.



**Figura 4.6.** Gráficos con las puntuaciones sensoriales medias de los vinos reconstituidos del estudio comparando en cada gráfico, A) LxH2, B) LxH7, C) LxH3, D) LxH5, E) LxH6. Las barras de error están calculadas como  $s/(n)1/2$ ; (s) desviación estándar; (n) número de panelistas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre vinos ( $P \leq 0.05$ ) (test de Duncan); nds, diferencias no significativas.



En el grupo de muestras reconstituidas con la misma fracción H2 (**Figura 4.6A**), la acidez es el atributo que marca las diferencias sensoriales más importante entre las muestras, siendo la muestra L1H2 la que presenta mayor acidez en este grupo y la muestra L6H2 la de menor acidez. En las muestras reconstituidas con la fracción proantocianina H7 (H2 diluida a la mitad, **Figura 4.6B**) al igual que en el grupo LxH2 puede observarse que la muestra L1H7 fue la más ácida. Como era de esperar todas las muestras LxH7 fueron evaluadas menos astringentes que sus homólogas LxH2, pero a diferencia de lo observado con estas últimas muestras, la adición de diferentes fracciones L produjo diferencias en la sensación de astringencia. La muestra L5H7 fue la más astringente y las muestras L1H7, L3H7 y L6H7 fueron las menos astringentes. Así mientras la menor astringencia de la muestra L1H7 podría ser debida a la mayor acidez percibida en esta muestra, no existen diferencias significativas en otros atributos sensoriales que permitan explicar la menor astringencia de las otras dos muestras (L3H7 y L6H7). Sin embargo, ambas fracciones L3 y L6 son las que presentan los menores valores de IPT (**Tabla 4.5**).

**Tabla 4.5.** Índice de polifenoles totales, grado medio de polimerización y porcentaje de procianidinas, prodelfinidinas y galatos presentes en las fracciones de bajo peso molecular.

	Fracciones de bajo peso molecular					
	L1	L2	L3	L4	L5	L6
IPT	63.70 ± 0.12 a	51.81 ± 0.08 b	37.08 ± 0.10 e	45.78 ± 0.17 d	46.14 ± 0.15 c	11.43 ± 0.09 f
mDP	2.85 ± 0.02 a	2.95 ± 0.13 a	2.22 ± 0.07 b	1.91 ± 0.02 c	1.64 ± 0.01 d	1.1 ± 0.05 e
% PC	70.82 ± 0.23 c	69.53 ± 3.55 cd	66.14 ± 0.70 d	79.1 ± 0.33 b	83.41 ± 0.30 a	50.30 ± 1.49 e
% PD	19.87 ± 0.37 b	24.82 ± 3.80 a	23.98 ± 0.75 a	14.45 ± 0.29 c	11.2 ± 0.33 c	0.00 d
% G	9.31 ± 0.35 b	5.65 ± 0.25 c	9.88 ± 0.39 b	6.45 ± 0.25 c	5.39 ± 0.10 c	49.70 ± 1.49 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre fracciones para cada parámetro estudiado.

En las **Figuras 4.6C** y **4.6D** se muestran los datos sensoriales correspondientes al grupo de muestras LxH3 (548 mg/L de PAs) y LxH5 (213 mg/L de PAs), respectivamente. Como cabía esperar en ninguno de los dos casos se observan diferencias significativas en la astringencia pero en ambos casos la reconstitución con diferentes fracciones L ha provocado en ambos grupos de muestras diferencias significativas en los atributos acidez y amargor. Finalmente en el grupo de muestras LxH6 (38 mg/L de PAs, **Figura 4.6E**) los cambios introducidos por las fracciones L han provocado diferencias significativas en todos los atributos excepto en el dulzor.

Esto parece indicar que cuanto menor es la concentración de PAs en las muestras se manifiesta una mayor influencia de los compuestos de bajo peso molecular en las características sensoriales.

#### 4.3.3.2. Relación entre el contenido de compuestos no-volátiles de bajo peso molecular y los cambios sensoriales percibidos en boca

##### 4.3.3.2.1. Compuestos de bajo peso molecular analizados en la fracción L

Tal y como se ha comentado, las series de muestras reconstituidas con la misma fracción H y distintas fracciones L han mostrado diferencias en el atributo acidez y en menor extensión en los atributos amargor, astringencia y persistencia. En este apartado se muestran las relaciones entre las diferencias sensoriales detectadas y la composición química evaluada en dichas fracciones. Los compuestos analizados en las distintas fracciones de bajo peso molecular, L, se muestran en la **Tabla 4.6**.

**Tabla 4.6.** Compuestos analizados por UPLC-DAD-MS en las fracciones de bajo peso molecular. Concentración media, máxima (max), mínima (min), max/min, umbral sensorial (expresado en mg/L) y factor DoT (Dose-over-threshold) para acidez, amargor y astringencia. Compuestos citados en orden decreciente de concentración, dentro de cada grupo.

Compuestos	Media (mg/L)	Max (mg/L)	Min (mg/L)	Max/min	Umbral* (mg/L)	DoT factor <sup>a</sup>
<i>Ácidos orgánicos</i>						
Ácido láctico	1790	3050	250	12.2	1393 <sup>b</sup>	2.18 <sup>b</sup>
Ácido tartárico	1450	2430	930	2.61	44 <sup>b</sup>	55.23 <sup>b</sup>
Ácido málico	1090	1410	nd		494 <sup>b</sup>	2.85 <sup>b</sup>
Ácido fumárico	690	890	nd		n.a	
Ácido succínico	310	530	50	10.6	106 <sup>b</sup>	5.00 <sup>b</sup>
Ácido citramálico	80	90	nd		n.a	
Ácido cítrico		tr	nd		499 <sup>b</sup>	
Ácido <i>trans</i> -aconítico	2.26	3.24	0.59	5.49	87 <sup>b</sup> /0.09 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>b</sup> /36.00 <sup>c</sup>
Ácido <i>cis</i> -aconítico	1.17	1.91	0.5	3.82	87 <sup>b</sup> /0.09 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>b</sup> /21.22 <sup>c</sup>
<i>Ácidos fenólicos y derivados</i>						
Ácido <i>trans</i> -caftárico	75.04	141.32	68.14	2.07	5.00 <sup>c</sup>	28.26 <sup>c</sup>
Ácido gálico	56.44	99.57	9	11.06	50.00 <sup>c</sup>	1.99 <sup>c</sup>
Ácido cutárico	25.79	72.62	5.05	14.38	10.00 <sup>c</sup>	7.26 <sup>c</sup>
Ácido elágico	6.93	12.51	0.1	125.1	1.99 <sup>c</sup>	6.28 <sup>c</sup>
Ester etílico del ácido ferúlico	6.65	6.93	6.33	1.09		
Ester etílico del ácido cafeico	6.04	10.29	1.79	5.75	58 <sup>c</sup> /229 <sup>d</sup>	0.17 <sup>c</sup> / $<0.1^d$
Ácido cafeico	5.32	17.64	1.96	9.00	13.00 <sup>c</sup>	1.35 <sup>c</sup>
Ácido <i>cis</i> -caftárico	3.28	4.65	1.63	2.85	5.00 <sup>c</sup>	0.93 <sup>c</sup>
Ácido siríngeo	3.00	4.93	0.24	20.54	52 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Ácido vainílico	2.81	4.21	1.14	3.69	53 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Ácido protocatequico	1.23	1.41	1.12	1.26	32.00 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Ácido p-cumárico	1.02	3.64	0.12	3.03	23.00 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Ácido ferúlico	0.91	1.31	0.69	1.90	13.00 <sup>c</sup>	0.1 <sup>c</sup>
<i>Cis</i> -resveratrol	0.30	0.48	nd			
Ester etílico del ácido protocatéquico	0.27	0.27	nd		9 <sup>c</sup> /182 <sup>d</sup>	<0.1 <sup>c</sup> / $<0.1^d$

Tabla 4.6. Continuación.

Compuestos	Media (mg/L)	Max (mg/L)	Min (mg/L)	Max/min	Umbral* (mg/L)	DoT factor <sup>a</sup>
Ácido cinámico	0.21	0.3	nd			
<i>Trans</i> -resveratrol	0.20	0.22	nd		n.a	
Ácido o-cumárico	0.06	0.35	nd		n.a	
<b>Flavonoles</b>						
Quercetin-3- <i>O</i> -glucurónido	12.50	17.63	0.55	32.05	1.00 <sup>c</sup>	17.63 <sup>c</sup>
Miricetina	3.95	11.19	tr		10.00 <sup>c</sup> /10.00 <sup>d</sup>	1.12 <sup>c</sup> /1.12 <sup>d</sup>
Quercetina	2.70	8.17	nd		10.00 <sup>c</sup> /10.00 <sup>d</sup>	0.87 <sup>c</sup> /0.87 <sup>d</sup>
Quercetin-3- <i>O</i> -glucósido	1.98	11.17	tr		1.0 <sup>c</sup>	11.17 <sup>c</sup>
Siringetin-3- <i>O</i> -glucósido	1.0	1.29	0.14	9.21	n.a	
Quercetin-3- <i>O</i> -galactósido	0.54	2.46	0.03	0.82	0.20 <sup>c</sup>	12.3 <sup>c</sup>
Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	0.36	1.97	tr		0.3 <sup>c</sup>	6.56 <sup>c</sup>
Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucósido	0.12	0.31	tr		1.10 <sup>c</sup>	0.28 <sup>c</sup>
Kaempferol	0.07	0.36	nd		20.00 <sup>c</sup> /20.00 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup> / <sup>c</sup> <0.1 <sup>d</sup>
Isorhamnetina	0.06	0.14	tr		n.a	
<b>Flavanoles</b>						
Procianidina B1	14.03	24.75	0.64	38.67	139 <sup>c</sup> /231 <sup>d</sup>	0.2 <sup>c</sup> /0.1 <sup>d</sup>
Epicatequina	4.38	10.39	0.43	24.16	270 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Procianidina B2	3.80	8.75	tr		110 <sup>c</sup> /280 <sup>d</sup>	<0.1 <sup>c</sup> / <sup>c</sup> <0.1 <sup>d</sup>
Catequina	2.66	6.47	0.71	9.11	119 <sup>c</sup> /290 <sup>d</sup>	<0.1 <sup>c</sup> / <sup>c</sup> <0.1 <sup>d</sup>
Epicatequina galato	2.49	8.36	tr		115 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Epigallocatequina	0.88	1.74	0.19	9.16	159 <sup>c</sup>	<0.1 <sup>c</sup>
Procianidina C1	0.47	0.65	nd		260 <sup>c</sup> /347 <sup>d</sup>	<0.1 <sup>c</sup> / <sup>c</sup> <0.1 <sup>d</sup>
Procianidina A2	0.34	0.42	0.26	1.60	n.a	
Epigallocatequin galato	0.05	0.13	nd		87 <sup>d</sup>	<0.1 <sup>d</sup>
<b>Tiólisis</b>						
Epicatequina terminal	2.31	5.32	0.09	59.1		
Catequina terminal	2.26	5.21	0.12	43.4		
Epicatequingalato terminal	1.38	1.87	0.30	6.23		
Epigallocatequina terminal	0.42	0.68	nd			
Epicatequina de extensión	5.19	8.80	tr			
Epigallocatequina de extensión	2.71	5.44	nd			
Catequina de extensión	0.49	0.90	nd			
Epicatequingalato de extensión	0.15	0.39	tr			
<b>Antocianos</b>						
Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	34.83	73.33	3.14	23.35		
Delfinidina-3- <i>O</i> -glucósido + Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-(epi)catequina	10.27	26.03	0.26	100.11		
Petunidina-3- <i>O</i> -glucósido	9.49	22.93	0.26	88.19		
Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-4-vinilcatecol + <i>trans</i> -malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	3.79	6.66	tr			
Malvidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	3.20	4.14	tr			
Vitisina A de malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	2.57	8.22	0.08	102.75		
Peonidina-3- <i>O</i> -glucósido	2.24	5.79	0.11	52.63		
Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-8-etil-(epi)catequina + Petunidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	1.75	3.72	tr			
Delfinidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	1.49	3.44	tr			
Petunidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	1.42	2.47	nd			
Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	1.20	3.08	0.08	38.5		

**Tabla 4.6.** Continuación.

Compuestos	Media (mg/L)	Max (mg/L)	Min (mg/L)	Max/min	Umbral* (mg/L)	DoT factor <sup>a</sup>
Vitisina A de malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	1.08	2.79	nd			
Cianidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	0.68	2.22	tr			
Vitisina B de delphinidina-3- <i>O</i> -glucósido	0.30	0.64	tr			
Vitisina A de peonidina-3- <i>O</i> -glucósido	0.30	0.55	tr			
Malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido-etil-(epi)catequina	0.23	0.36	tr			
Vitisina B de malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	0.21	0.47	nd			
<i>Cis</i> -malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	0.21	0.38	tr			
Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-4-vinilfenol	0.12	0.22	nd			

tr: trazas; nd: no detectado; n.a: no disponible. <sup>a</sup>DoTmax se calcula como el cociente de la concentración y el umbral. <sup>b</sup>Factor DoT para la acidez. <sup>c</sup>Factor DoT para la astringencia. <sup>d</sup>Factor DoT para el amargor. \*Los umbrales sensoriales citados han sido tomados de los trabajos de Hufnagel y Hofmann<sup>6</sup>; Scharbert y col.<sup>35</sup> Dadic y col.<sup>36</sup> y Kamura y col.<sup>37</sup>

#### 4.3.3.2.2. Correlaciones con la acidez

La adición de las diferentes fracciones L a una misma fracción H provocó cambios en la percepción sensorial del sabor ácido (**Figura 4.6**) en las siguientes series de vinos reconstituidos: LxH2, LxH3, LxH5 y LxH6. Sin embargo, solo se ha encontrado correlación significativa en la acidez entre las series LxH3/LxH5 ( $R^2 = 0.5870$ ,  $P = 0.046$ ). La ausencia de correlación entre el resto de las series de muestras parece indicar que la existencia de cambios en la percepción del sabor ácido depende de la fracción polimérica presente en las muestras y por lo tanto de la astringencia percibida en las mismas. De acuerdo con los resultados obtenidos en el Capítulo 3 de esta memoria, son los compuestos de bajo peso molecular, es decir, los compuestos presentes en las fracciones L, los responsables de evocar este sabor. En la **Tabla 4.7** se muestran los compuestos que se han encontrado correlacionados con la acidez en cada serie de vinos reconstituidos. Así, en las series de muestras LxH3, LxH5 y LxH6, la acidez estuvo correlacionada con algunos ácidos como el málico, fumárico o láctico pero también con otros ácidos presentes en menor concentración como el *cis*-aconítico y algunos ácidos hidroxicinámicos. Estos últimos también han sido descritos como compuestos con implicación en la sensación de astringencia.<sup>6,7,21</sup> En el caso de las muestras LxH2 (evaluadas como las más astringentes) ninguno de los ácidos mayoritarios (málico o láctico) se encontró correlacionado con la acidez evaluada en

esta serie de muestras. En este caso, la acidez se encontró correlacionada con compuestos de bajo peso molecular que han sido descritos por su implicación en la astringencia, como el ácido *trans*-aconítico<sup>6</sup>, el flavanol trímero<sup>6</sup>, la concentración en ECe<sup>38</sup>, los ácidos vanílic y siríngico<sup>39</sup> e incluso con el IPT medido en las fracciones. A la vista de los resultados obtenidos, la acidez percibida no está marcada por un determinado grupo de compuestos sino que este sabor en los vinos depende de forma importante de como estos compuestos son percibidos en presencia de otros, por ejemplo de los compuestos poliméricos presentes en la fracción H.

**Tabla 4.7.** Compuestos correlacionados significativamente con la acidez en cada serie de muestras.

LxH2	$r^I$	LxH3	$r$	LxH5	$r$	LxH6	$r$
Ác <i>trans</i> -aconítico	0.88**	Ácido <i>cis</i> -caftárico	0.84**	Ácido fumárico	0.95***	Ácido <i>cis</i> -caftárico	0.78*
IPT	0.81**	Ácido <i>trans</i> -caftárico	0.89**	Ácido málico	0.95***	Ácido <i>trans</i> -caftárico	0.77*
Procianidina C1	0.76*	Ácido fumárico	0.90**	Ácido láctico	-0.91**	Ácido cutárico	0.82**
Ácido vainílic	0.96***	Ácido málico	0.90**	Etanol	-0.83**	Ácido <i>cis</i> -aconítico	0.78*
Ácido siríngico	0.88**	Ácido láctico	-0.82**			Ácido succínico	0.75*
Ácido ferúlico	-0.90**	Ácido cutárico	0.93**				
ECe	0.83**						

<sup>I</sup>Coeficiente de correlación de Pearson. \*\*\* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.05$ , \* $P < 0.1$

#### 4.3.3.2.3. Correlaciones con el amargor

En el estudio del amargor, en el Capítulo 3 de esta memoria, se ha confirmado que es la fracción de bajo peso molecular la fracción descrita como amarga, existiendo a su vez, interacciones con otros sabores y sensaciones como la acidez y la astringencia. De acuerdo con los resultados obtenidos en las distintas series de muestras reconstituidas para evaluar el efecto de modificar la composición de bajo peso molecular (distintas fracciones L y la misma fracción H), únicamente se han observado cambios en el sabor amargo en tres series de muestras LxH3, LxH5 y LxH6 (**Figuras 4.6C, 4.6D y 4.6E**, respectivamente), es decir, los panelistas han percibido diferencias significativas en el amargor cuando diferentes fracciones de bajo peso molecular (L) se han combinado con la fracción de alto peso molecular procedente de un vino joven (H3), de un vino envejecido (H5) o de un vino rosado (H6), mientras que no se observan diferencias en el amargor de las muestras LxH2 y LxH7, en las cuales

fracciones de bajo peso molecular se han adicionado a un vino joven muy astringente (H2) y a una dilución de H2 (H7).

Teniendo en cuenta los tres grupos de muestras en los que se detecta diferencias en el sabor amargo, se observa una correlación significativamente negativa entre amargor y acidez ( $P < 0.05$ ). Así, las muestras reconstituidas con L1 y L6 (fracciones más ácidas) fueron las puntuadas con un menor amargor. Esto es fácilmente observable en el grupo de muestras LxH3, donde las muestras L2H3, L3H3, L4H3 y L5H3 fueron evaluadas con similar amargor (5.1-5.5) mientras que las muestras L1H3 y L6H3 fueron puntuadas con un valor más bajo (3.9). En relación con los otros dos grupos de muestras en los que existen diferencias significativas en el atributo amargor (LxH5 y LxH6), en la **Tabla 4.8** se muestran los compuestos de bajo peso molecular que podrían ser sensorialmente activos en el amargor evaluado en ambas series de vinos reconstituidos. Para seleccionar los compuestos sensorialmente activos se aplicó el criterio de diferenciabilidad<sup>40</sup> en la concentración de máx/min  $> 2$ , (calculado sin incluir el vino rosado, ya que en muchos casos su concentración era de trazas), sobre los compuestos que habían mostrado una correlación significativa en el amargor.

**Tabla 4.8.** Compuestos de bajo peso molecular correlacionados significativamente con el amargor y compuestos sensorialmente activos en el amargor (en negrita) en las series de muestras LxH5 y LxH6.

LxH5	$r^1$	LxH6	$r$
<b>Quercetin-3-O-glucurónido</b>	0.81**	Isorhamnetina	0.90***
<b>Miricetina</b>	0.77*	<b>Ce</b>	0.75*
<b>Quercetina</b>	0.76*	<b>ECe</b>	0.78*
Acidez total	-0.93***	Procianidina C1	0.73*
<b>Ácido láctico</b>	0.87**		
<b>Azúcares reductores</b>	-0.92***		
Ácido málico	-0.75*		
<b>Vitisina B de delphinidina-3-O-glucosido</b>	0.76*		
Malvidina-3-O-(6-O-acetil)-glucósido	0.81*		
<b>Cis-malvidina-3-O-(6-O-p-cumaroil)-glucósido</b>	0.88**		
<b>Malvidina-3-O-(6-O-p-cumaroil)-glucósido etil epicatequina</b>	0.76*		
<b>Malvidina-3-O-glucósido-4-vinilfenol A</b>	0.76*		

<sup>1</sup>Coeficiente de correlación de Pearson. \*\*\*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.05$ , \*  $P < 0.1$ .

Puede observarse que los compuestos con capacidad de poder generar amargor son distintos en cada una de las series de vinos reconstituidos. Así en la serie LxH5 son sensorialmente activos tres flavonoles, miricetina, quercetina y quercetina-glucurónido, cuatro antocianos y el ácido láctico, mientras que los azúcares reductores muestran una correlación negativa con el amargor. En el caso de las muestras reconstituidas con la fracción H6, los compuestos correlacionados con el amargor son un flavonol, la isorhamnetina, dos flavanoles obtenidos a partir de la reacción de tiólisis, la Ce y la ECe y la procianidina C1, siendo de entre ellos los compuestos sensorialmente activos, los dos flavanoles monómeros procedentes de la reacción de depolimerización. Preys y col.<sup>4</sup> han apuntado la hipótesis de una correlación entre ciertos flavonoles agliconas (miricetina y quercetina) y el sabor amargo. Sharbert y Hofmann<sup>41</sup> han observado que la omisión de flavonoles-3-glicosilados y flavanoles disminuye el amargor percibido. Por el contrario, Villamor y col.<sup>42</sup> han observado niveles relativamente bajos de asociación entre el atributo amargor y compuestos poliméricos de bajo y alto peso molecular, antocianos y taninos, en vinos elaborados con cv. Cabernet Sauvignon y cv. Merlot. En el modelo predictivo del amargor, obtenido a partir de la evaluación sensorial y la composición química analizada en diferentes fracciones L (capítulo 3 de esta memoria), puede observarse que el peso de los flavanoles en este sabor es inferior al peso ejercido por un flavonol glicosilado, la quercetina-3-*O*-rutinósido.<sup>43</sup> No obstante, ninguno de los compuestos con capacidad para predecir el amargor de las fracciones coincide con los compuestos correlacionados con el amargor en el presente estudio en vinos reconstituidos. Este hecho se pone de manifiesto bastante habitualmente en la bibliografía<sup>39,40</sup> ya que ambos grupos de compuestos, flavanoles y flavonoles son citados como compuestos que contribuyen al sabor amargo, sin embargo, en unos trabajos aparecen significativos unos compuestos<sup>6,40</sup> y en otros estudios se citan como relevantes otros compuestos.<sup>39</sup> Parece por tanto, que la implicación de los compuestos de bajo peso molecular que pueden inducir sabor amargo es diferente en función del tipo de vino. Esto puede ser debido a complejas interacciones a nivel de receptores bucales, en las que pueden tener influencia el contenido polimérico de los vinos y/o otros compuestos de bajo peso molecular, incluso de la misma familia de compuestos, como ha sido apuntado por Sáenz-Navajas y col.<sup>21</sup>

#### 4.3.3.2.4. Correlaciones con la astringencia

En relación al atributo astringencia, los panelistas únicamente observaron diferencias significativas entre las distintas fracciones L cuando estas se combinaron con H6 (fracción polimérica procedente de un vino rosado y por tanto con muy bajo contenido proantocianínico) y con H7 (fracción polimérica del vino W2, con alto contenido polifenólico, pero cuya fracción polimérica se había diluido a la mitad). En la **Tabla 4.9** se muestran los compuestos que se han encontrado correlacionados con la astringencia y los compuestos sensorialmente activos en la astringencia (aplicando el criterio de  $\max/\min > 2$ ) en ambas series de vinos reconstituidos.

**Tabla 4.9.** Compuestos de bajo peso molecular correlacionados significativamente con la astringencia y compuestos sensorialmente activos en la astringencia (en negrita) en las series de muestras LxH6 y LxH7.

LxH6	$r^1$	LxH7	$r$
<b>Procianidina B1</b>	0.72*	<b>Catequina</b>	0.88**
% PC	0.74*	<b>Epicatequina</b>	0.81*
IPT	0.72*	<b>Procianidina B2</b>	0.78*
Procianidina C1	0.82**	% PC	0.76*
<b>Trans/cis aconítico</b>	0.84**	<b>Ct</b>	0.91**
		<b>ECt</b>	0.93***

<sup>1</sup>Coeficiente de correlación de Pearson. \*\*\*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.05$ , \*  $P < 0.1$

Únicamente cuando la fracción de bajo peso molecular se combina con una fracción con un bajo contenido en proantocianidinas, algunos compuestos de bajo peso molecular explican las diferencias en astringencia percibidas en los vinos. Los compuestos correlacionados con esta sensación en boca, en ambos casos, pertenecen a la familia de los flavanoles. Así, en el caso de la reconstitución con H6, la astringencia estuvo correlacionada con la procianidina dímera B1, el porcentaje de procianidinas (% PC), el contenido de polifenoles totales (IPT), la procianidina trímera C1 y con la relación *trans/cis* aconítico. En esta serie de muestras los compuestos sensorialmente activos en la astringencia fueron la procianidina B1 y la relación *trans/cis* aconítico. En muestras reconstituidas con H7, el atributo astringencia mostró correlación con la catequina y epicatequina, con las unidades monoméricas procedentes de la



depolymerización, Ct y ECt, con la procianidina dímera B2 y con el % PC, siendo los compuestos sensorialmente activos los flavanoles monómeros y la procianidina dímera B2. La contribución de los flavanoles en la astringencia ha sido corroborada en numerosos trabajos.<sup>44-46</sup> Además, la influencia de la relación *trans/cis* aconítico con la astringencia también ha sido anotada en un estudio enfocado a modelizar la astringencia percibida en vinos tintos españoles.<sup>21</sup> Sin embargo, en este estudio, ningún ácido fenólico mostró correlación con la astringencia. Resultados contradictorios aparecen en la literatura descritos respecto a la influencia que presentan estos compuestos en esta percepción. Así, Sáenz-Navajas y col.<sup>21</sup> han destacado el papel de los ácidos cutárico, caftárico y del ester etílico del ácido protocatéquico en la percepción de la astringencia; sin embargo, trabajos llevados a cabo por Hufnagel y Hofmann<sup>6</sup> descartan la contribución de estos compuestos en el sabor del vino. Nuevamente, como en el caso del amargor, parece que la astringencia que manifiestan los compuestos fenólicos de bajo peso molecular se ve altamente influenciada por la fracción proantociánica. Este efecto puede explicar el hecho de que los compuestos que expresan astringencia sean diferentes en función de la fracción de alto peso molecular con la que se combinen. Así también en la bibliografía<sup>6,39,44-46</sup> se citan diferentes compuestos relacionados con la percepción de esta sensación táctil.

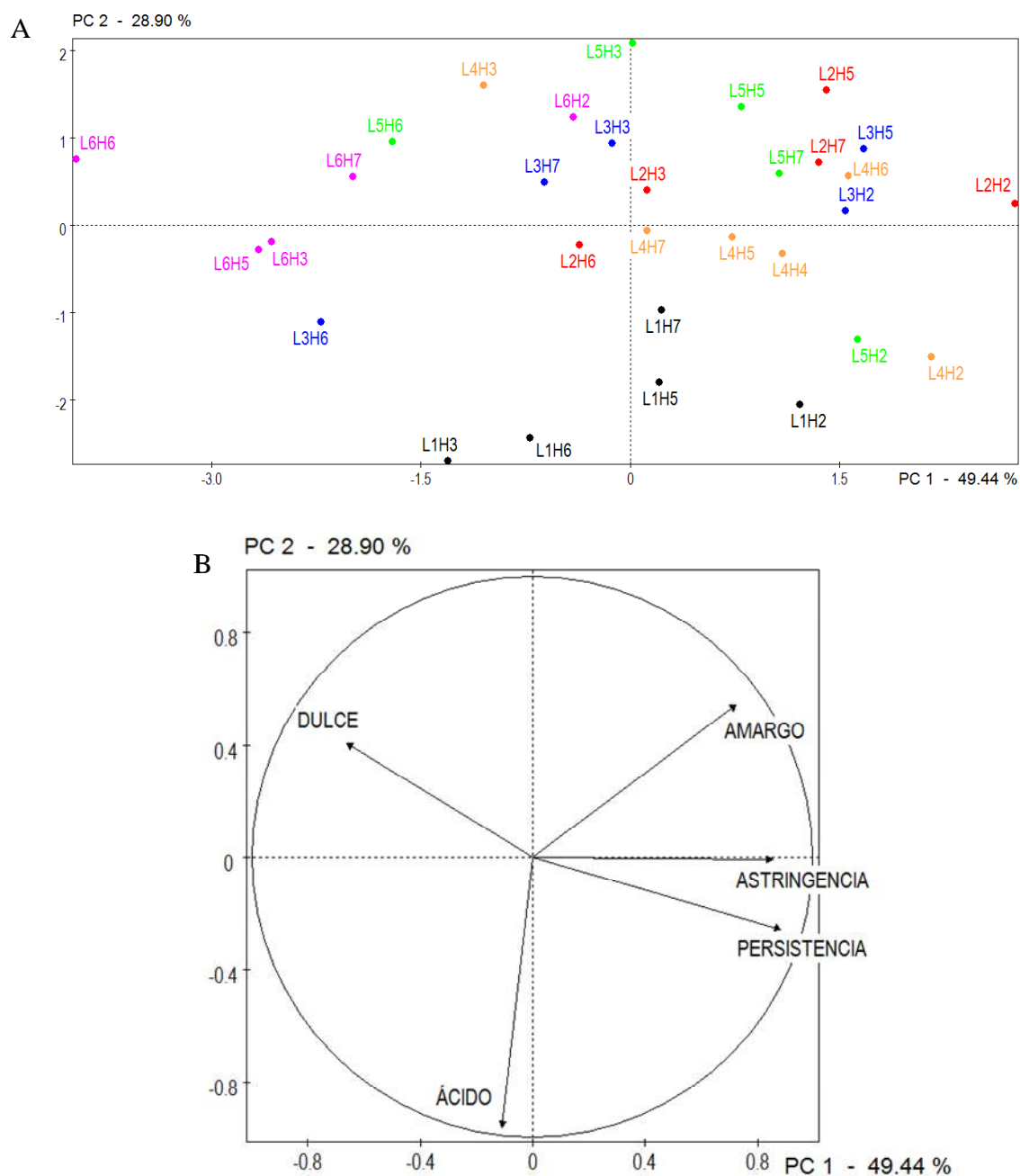
#### 4.3.3.2.5. Correlaciones con la persistencia

La persistencia únicamente se modificó en el estudio de muestras reconstituidas con la fracción H6 (**Figura 4.6E**). Los compuestos correlacionados positivamente con este atributo fueron el ácido *trans*-aconítico, el índice de polifenoles totales, la procianidina C1 y la Vitisina-B de malvidina ( $P < 0.1$ ). Todos ellos, a excepción de la vitisina y del ácido *trans*-aconítico mostraron correlación con la astringencia. Esta observación era esperada, ya que la persistencia está correlacionada positivamente con la astringencia ( $F = 12.84$ ,  $P = 0.0231$ ,  $R^2 = 0.76$ ). Noble<sup>47</sup> estableció que los atributos amargor y astringencia están caracterizados por una larga persistencia.

Por lo tanto, en vista a estos últimos resultados, podemos confirmar que el papel que juegan los compuestos de bajo peso molecular en la astringencia y persistencia es más relevante cuando se trata de vinos elaborados sin una maceración prolongada del mosto con los hollejos, como es el caso de vinos rosados.

#### **4.3.4. Implicación de las fracciones de alto peso molecular en las características sensoriales de los vinos**

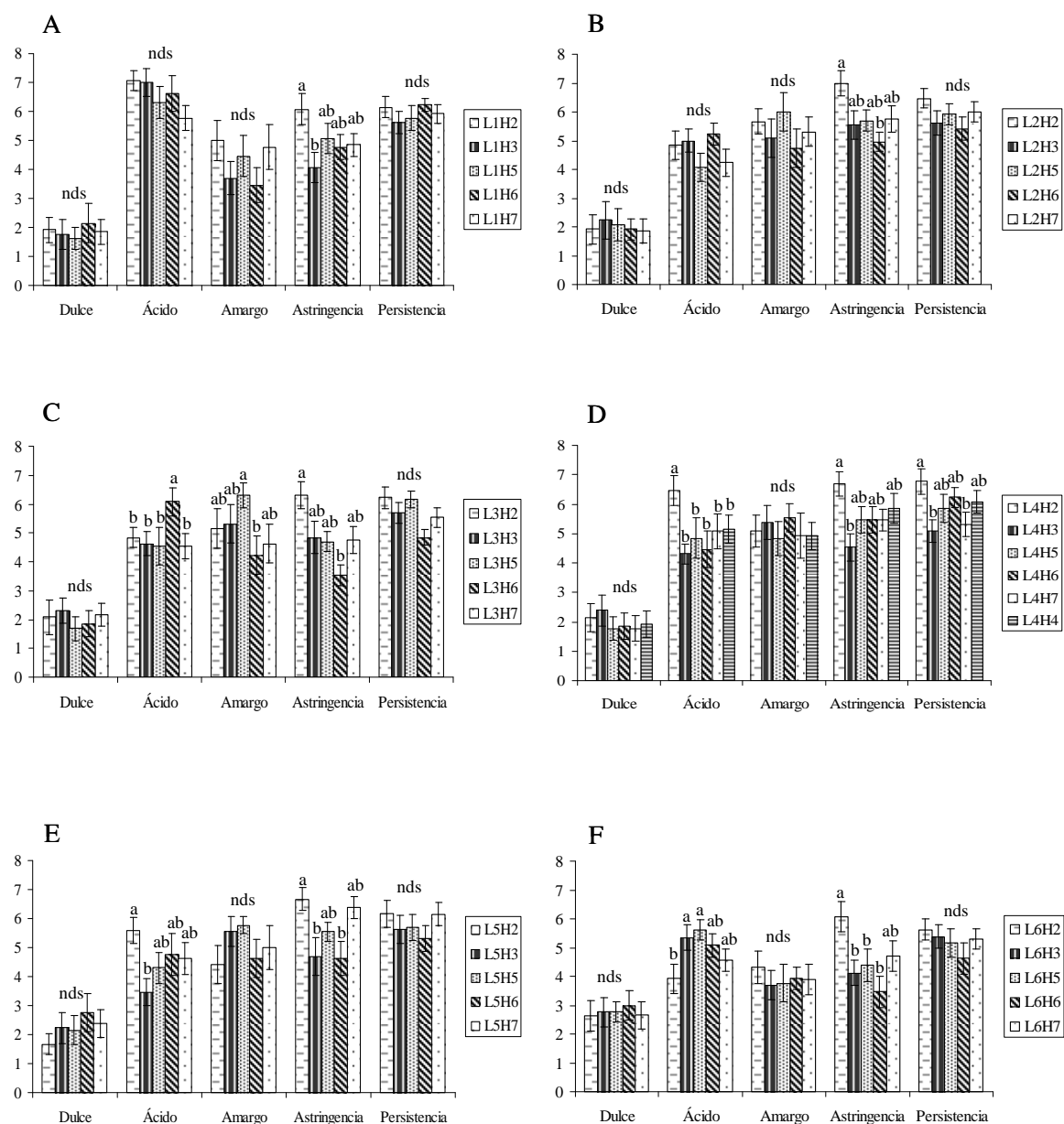
Para evaluar la influencia de la fracción de alto peso molecular en las características organolépticas en boca de los vinos, se compararon muestras reconstituidas con la misma fracción L y distintas fracciones H. Los resultados de aplicar el análisis de componentes principales a los datos del análisis sensorial, así como las medias y desviaciones estándar de estos datos se muestran en las **Figuras 4.9** y **4.10**. En el PCA obtenido a partir de los datos sensoriales puede observarse que las muestras (**Figura 4.9A**) no se agrupan por la fracción L, a excepción de las muestras L1Hx que se sitúan en la parte central inferior del PCA mostrando que todas ellas han sido evaluadas con alta acidez. Esto parece lógico ya que la fracción L1 procede de un vino tinto con alta acidez (6.99 g/L de acidez total y 1.41 g/L de ácido málico), sin embargo esto no parece ocurrir con el grupo de muestras reconstituidas con la fracción L6 (7.40 g/L de acidez total y 0.78 g/L de ácido málico).



**Figura 4.9.** Proyección de las 31 muestras reconstituidas (A) y de los atributos sensoriales (B) en el plano definido por las dos primeras componentes principales.

Con el fin de ver más detalladamente las posibles diferencias para cada serie de muestras, en la **Figura 4.10** se muestran las gráficas obtenidas para las seis series de vinos reconstituidos con la misma fracción L y diferente fracción H.

Capítulo 4. Influencia de los compuestos fenólicos de bajo y alto peso molecular en la percepción gustativa de los vinos



**Figura 4.10.** Gráficos con las puntuaciones sensoriales medias de los vinos reconstituidos del estudio comparando en cada gráfico, A) L1Hx, B) L2Hx, C) L3Hx, D) L4Hx, E) L5Hx y F) L6Hx. Las barras de error están calculadas como  $s/(n)1/2$ ; (s) desviación estándar; (n) número de panelistas. Letras diferentes indican diferencias significativas entre vinos ( $P \leq 0.05$ ) (test de Duncan); nds, diferencias no significativas.

En estas gráficas puede verse que independientemente de la fracción L estudiada la presencia de diferentes fracciones H genera cambios en la astringencia de las muestras lo que estaría de acuerdo con nuestra hipótesis de partida, la cual establece que distinto contenido en PAs provoca diferencias en la percepción de la astringencia. Además, en todos los casos, las muestras reconstituidas con la fracción de mayor

contenido en PAs (H2) son las más astringentes de su grupo. Sin embargo, y en contra de lo que hubiésemos esperado por las características sensoriales de la fracción H descrita como astringente y persistente (capítulo 2 de esta memoria), se observan cambios en algunos atributos, los cuales, a priori, solamente se hubiesen esperado por cambios en la fracción de bajo peso molecular (fracción L). En las series de muestras L1Hx (**Figura 4.10A**) y L2Hx (**Figura 4.10B**) las diferentes fracciones H provocan cambios únicamente en la astringencia, aunque estos cambios son menores de lo que previamente se hubiesen esperado en relación con el diferente contenido en PAs de las fracciones H (**Tabla 4.10**). En los otros cuatro grupos de muestras L3Hx, L4Hx, L5Hx y L6Hx, además del atributo astringencia también se observan diferencias significativas en la acidez. En el grupo L3Hx también en el amargor y en la serie L4Hx en la persistencia.

**Tabla 4.10.** Parámetros químicos relacionados con la concentración de polifenoles (IPT) y de proantocianidinas en las fracciones de alto peso molecular.

	Fracciones de alto peso molecular				
	H2	H3	H4	H5	H6
IPT	10.68 ± 0.07 b	5.83 ± 0.05 c	3.61 ± 0.01 d	3.51 ± 0.03 d	1.37 ± 0.03 e
PPAS	0.25 ± 0.01 b	0.19 ± 0.10 bc	0.05 ± 0.01 bc	0.03 ± 0.01 c	0.00 c
TPAs	1039.04 ± 28.31 b	547.67 ± 27.39 c	395.94 ± 13.70 cd	212.82 ± 0.46 de	38.61 ± 7.94 e
mDP	16.27 ± 1.64 a	17.40 ± 1.21 a	11.96 ± 1.34 b	11.09 ± 0.97 b	0.00
% PC	57.64 ± 0.29 d	60.48 ± 0.50 c	66.27 ± 0.21 b	73.29 ± 0.60 a	0.00
% PD	38.15 ± 0.12 a	37.27 ± 0.51 a	31.75 ± 0.37 b	24.14 ± 0.66 c	0.00
% G	4.21 ± 0.23 a	2.25 ± 0.13 bc	1.98 ± 0.17 c	2.57 ± 0.08 b	0.00

Letras diferentes indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre fracciones para cada parámetro estudiado.

Con el fin de conocer la influencia que pueden ejercer en las características sensoriales de los vinos los cambios en la concentración y en la estructura de la fracción tánica, en las **Tablas 4.11 y 4.12** se muestran los datos resultantes de la comparación entre muestras con la misma fracción L y diferente composición en PAs. Así cuando comparamos la serie LxH2 (1039 mg/L de PAs), con sus respectivas muestras de las series LxH7, LxH3, LxH5 y LxH6 (520, 548, 213 y 38 mg/L de PAs, respectivamente) (**Tabla 4.11**), en todos los casos se observan diferencias significativas en la astringencia mientras que estas diferencias no se detectan entre los siguientes grupos de muestras LxH3/LxH6; LxH5/LxH6 o LxH7/LxH6 (**Tabla 4.12**), tal y como hubiésemos esperado en base al diferente contenido en PAs de estas fracciones.

**Tabla 4.11.** Comparación sensorial de la fracción más tánica (H2) con el resto de las fracciones (H3, H5, H6 y H7) dejando fija la fracción de bajo peso molecular.

	Dulce	Ácido	Amargo	Astringencia	Persistencia
L1H2	1.92	7.08	5.00	6.08	6.15
L1H3	1.77	7.00	3.69	4.08 **	5.62
L2H2	1.92	4.85	5.23	7.00	6.46
L2H3	2.23	5.00	5.08	5.54 **	5.62
L3H2	2.08	4.85	5.15	6.31	6.23
L3H3	2.31	4.62	5.31	4.85 **	5.69
L4H2	2.15	6.46	5.08	6.69	6.77
L4H3	2.38	4.31 **	5.38	4.54 **	5.08
L5H2	1.67	5.58	4.42	6.67	6.17
L5H3	2.23	3.46 **	5.54	4.69 **	5.62
L6H2	2.62	3.92	4.31	6.08	5.62
L6H3	2.77	5.35 **	3.69	4.12 **	5.38
L1H2	1.92	7.08	5.00	6.08	6.15
L1H5	1.62	6.31	4.46	5.08	5.77
L2H2	1.92	4.85	5.23	7.00	6.46
L2H5	2.08	4.08	6.00	5.69 **	5.92
L3H2	2.08	4.85	5.15	6.31	6.23
L3H5	1.69	4.54	6.31	4.69 **	6.15
L4H2	2.15	6.46	5.08	6.69	6.77
L4H5	1.77	4.85 *	4.85	5.46 **	5.85
L5H2	1.67	5.58	4.42	6.67	6.17
L5H5	2.15	4.31 *	5.77 *	5.54 **	5.69
L6H2	2.62	3.92	4.31	6.08	5.62
L6H5	2.77	5.62 **	3.77	4.38 **	5.15
L1H2	1.92	7.08	5.00	6.08	6.15
L1H6	2.15	6.61	3.46 *	4.77 *	6.23
L2H2	1.92	4.85	5.23	7.00	6.46
L2H6	1.92	5.23	4.73	4.96 **	5.42 **
L3H2	2.07	4.85	5.15	6.31	6.23
L3H6	1.85	6.08 *	4.23	3.54 **	4.85 **
L4H2	2.15	6.46	5.08	6.70	6.77
L4H6	1.85	4.46 **	5.54	5.46 **	6.23
L5H2	1.67	5.58	4.42	6.67	6.17
L5H6	2.77	4.77	4.61	4.61 **	5.31
L6H2	2.61	3.92	4.31	6.08	5.61
L6H6	3.00	5.08 **	3.92	3.46 **	4.61
L1H2	1.92	7.08	5.00	6.08	6.15
L1H7	1.85	5.77 **	4.77	4.85 *	5.92
L2H2	1.92	4.85	5.23	7.00	6.46
L2H7	1.85	4.23	5.31	5.77 **	6.00
L3H2	2.08	4.85	5.15	6.31	6.23
L3H7	2.15	4.54	4.61	4.77 **	5.54
L4H2	2.15	6.46	5.08	6.69	6.77
L4H7	1.77	5.08 *	4.92	5.46 **	5.31 **
L5H2	1.67	5.58	4.42	6.67	6.17
L5H7	2.38	4.61	5.00	6.38	6.15
L6H2	2.61	3.92	4.31	6.08	5.61
L6H7	2.65	4.58	3.89	4.69 *	5.31

\*\*muestran diferencias significativas a  $P < 0.05$ , \*muestra diferencias significativas a  $P < 0.10$ .

**Tabla 4.12.** Comparación de la descripción sensorial de fracciones proantociánicas de contenido intermedio (H3, H5, H7) con la fracción de menor contenido proantociánico (H6), dejando en todos los casos fija la fracción de bajo peso molecular.

	Dulce	Ácido	Amargo	Astringencia	Persistencia
L1H3	1.77	7.00	3.69	4.08	5.62
L1H6	2.15	6.62	3.46	4.77	6.23
L2H3	2.23	5.00	5.08	5.54	5.62
L2H6	1.92	5.23	4.73	4.96	5.42
L3H3	2.31	4.62	5.31	4.85	5.69
L3H6	1.85	6.08 **	4.23	3.54 *	4.85 *
L4H3	2.38	4.31	5.38	4.54	5.08
L4H6	1.85	4.46	5.54	5.46	6.23 **
L5H3	2.23	3.46	5.54	4.69	5.62
L5H6	2.77	4.77	4.62	4.62	5.31
L6H3	2.77	5.35	3.69	4.12	5.38
L6H6	3.00	5.08	3.92	3.46	4.62
L1H5	1.62	6.31	4.46	5.08	5.77
L1H6	2.15	6.62	3.46	4.77	6.23
L2H5	2.08	4.08	6.00	5.69	5.92
L2H6	1.92	5.23 *	4.73	4.96	5.42
L3H5	1.69	4.54	6.31	4.69	6.15
L3H6	1.85	6.08 *	4.23 **	3.54 **	4.85 **
L4H5	1.77	4.85	4.85	5.46	5.85
L4H6	1.85	4.46	5.54	5.46	6.23
L5H5	2.15	4.31	5.77	5.54	5.69
L5H6	2.77	4.77	4.62	4.62	5.31
L6H5	2.77	5.62	3.77	4.38	5.15
L6H6	3.00	5.08	3.92	3.46	4.62
L1H7	1.85	5.77	4.77	4.85	5.92
L1H6	2.15	6.62	3.46	4.77	6.23
L2H7	1.85	4.23	5.31	5.77	6.00
L2H6	1.92	5.23	4.73	4.96	5.42
L3H7	2.15	4.54	4.62	4.77	5.54
L3H6	1.85	6.08 **	4.23	3.54 **	4.85
L4H7	1.77	5.08	4.92	5.46	5.31
L4H6	1.85	4.46	5.54	5.46	6.23 *
L5H7	2.38	4.62	5.00	6.38 **	6.15
L5H6	2.77	4.77	4.62	4.62 **	5.31
L6H7	2.65	4.58	3.88	4.69	5.31
L6H6	3.00	5.08	3.92	3.46	4.62

\*\*muestran diferencias significativas a  $P < 0.05$ , \*muestra diferencias significativas a  $P < 0.10$ .

De acuerdo con estos datos podemos afirmar que solo cuando las muestras presentan un alto contenido en PAs, caso de las fracciones reconstituidas con la fracción H2, las características sensoriales aportadas por la fracción L no parecen ejercer una

influencia determinante en las características orosensoriales de las muestras. Sin embargo, cuando el contenido en PAs es menor (resto de fracciones H), la fracción L puede influir sensorialmente minimizando las diferencias esperables en la astringencia en base al contenido en PAs.

En relación con las muestras LxH2 y LxH7, las cuales solo se diferencian en la concentración de PAs (1039 y 520 mg/L, respectivamente), ya que las PAs presentan el mismo grado de polimerización y la misma estructura, se observa entre ellas diferencias significativas en la astringencia, siendo siempre mayor la astringencia evaluada en las muestras reconstituidas con la fracción H2 independientemente de la fracción L empleada para la reconstitución. Únicamente las muestras L5H2 y L5H7 no presentan diferencias significativas en dicho atributo. Estas diferencias entre LxH2 y LxH7 parecen indicar que la concentración de PAs tiene mayor influencia que el grado de polimerización de las mismas. Esto también parece deducirse de la comparación entre las muestras LxH2 y LxH3, las cuales contienen 1039 y 549 mg/L de PAs. Nuevamente las muestras reconstituidas con la fracción H2 fueron evaluadas significativamente más astringentes que las reconstituidas con la fracción H3, a pesar de que ambas fracciones tienen un grado de polimerización similar ( $mDP = 16.3$  y  $17.4$ , respectivamente). Sin embargo, cabe destacar que las muestras LxH3 y LxH5 con 548 y 213 mg/L de PAs y con un grado de polimerización medio de  $17.4$  y  $11.1$ , respectivamente, no presentan diferencias sensoriales entre ellas. Wollmam y col.<sup>48</sup> han corroborado el papel irrelevante del grado de polimerización en la astringencia de los vinos. En relación con la estructura de las proantocianidinas analizadas en las fracciones H (**Tabla 4.9**) la astringencia no se ha encontrado correlacionada ni con el porcentaje de procianidinas (% PC) ni con el de prodelfinidinas (% PD), mientras que el porcentaje de galoilados (% G) podría estar marcando algunas de las diferencias encontradas en la astringencia ya que la fracción H2 presenta mayor porcentaje (6.2 %) que las fracciones H3 y H5 (3.33 y 3.82 %, respectivamente). Este parámetro junto con la concentración en PAs podría ayudar a explicar las diferencias en la astringencia de las muestras LxH2/LxH3 y LxH2/LxH5, así como la no existencia de diferencias entre las muestras LxH3 y LxH5; sin embargo, esto no permite explicar porque las muestras LxH3/LxH6 y LxH5/LxH6 no presentan diferencias en el atributo astringencia.



## **4.4. CONCLUSIONES**

En este trabajo se ha demostrado la posibilidad de preparar muestras reconstituidas que presentan las mismas propiedades sensoriales que los vinos referentes.

Se ha puesto de manifiesto el papel de los compuestos de bajo peso molecular en el amargor, la astringencia y persistencia de los vinos, siendo más notable su aportación a la astringencia y a la persistencia en el estudio de vinos rosados que de vinos tintos.

El amargor y la astringencia aportada por los compuestos fenólicos de bajo peso molecular parece ser vino dependiente, ya que no se reproducen los cambios sensoriales en las distintas series de muestras reconstituidas preparadas.

En vinos tintos, la percepción de la astringencia es debida a la concentración de proantocianidinas por encima del grado medio de polimerización de los taninos y de las diferencias estructurales de estos compuestos.

La omisión y la disminución en la concentración de los compuestos de alto peso molecular produce un claro descenso de la sensación de astringencia.

La concentración de proantocianidinas que presenta un vino es determinante ya que parece modular la percepción de otros sabores como el amargor y la acidez, jugando por tanto un papel muy importante en el equilibrio final de los vinos.

## 4.5. REFERENCIAS

- (1) Nurgel, C.; Pickering, G. Modeling of sweet, bitter and irritant sensations and their interactions elicited by model ice wines. *Journal of Sensory Studies* **2006**, *21*, 505-519.
- (2) Martin, N. Sweet/sour balance in champagne wine and dependence on taste/ odour interactions. *Food Quality and Preference* **2002**, *13*, 295-305.
- (3) Vidal, S.; Francis, L.; Noble, A.; Kwiatkowski, M.; Cheynier, V.; Waters, E. Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta* **2004**, *513*, 57-65.
- (4) Preys, S.; Mazerolles, G.; Courcoux, P.; Samson, A.; Fischer, U.; Hanafi, M.; Bertrand, D.; Cheynier, V. Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 126-136.
- (5) Boselli, E.; Giomo, A.; Minardi, M.; Frega, N.G. Characterization of phenolics in Lacrima di Morro d'Alba wine and role on its sensory attributes. *European Food Research and Technology* **2008**, *227*, 709-720.
- (6) Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 9190-9199.
- (7) Hufnagel, J.C.; Hofmann, T. Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 1376-1386.
- (8) Ishikawa, T.; Noble, A.C. Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality and Preference* **1995**, *6*, 27-33.
- (9) Zamora, M.C.; Goldner, M.C.; Galmarini, M.V. Sourness-sweetness interactions in different media: White wine, ethanol and water. *Journal of Sensory Studies* **2006**, *21*, 601-611.
- (10) Pfeiffer, J.C.; Hort, J.; Hollowood, T.A.; Taylor, A.J. Taste-aroma interactions in a ternary system: A model of fruitiness perception in sucrose/acid solutions. *Perception and Psychophysics* **2006**, *68*, 216-227.
- (11) Hewson, L.; Hollowood, T.; Chandra, S.; Hort, J. Taste-aroma interactions in a citrus flavoured model beverage system: Similarities and differences between acid and sugar type. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 323-334.
- (12) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Culleré, L.; Fernández-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58*, 5574-5585.

- (13) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Fernández-Zurbano, P.; Valentin, D.; Ferreira, V. An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry* **2010**, *121*, 1139-1149.
- (14) Keast, R.S.J.; Canty, T.M.; Breslin, P.A.S. The influence of sodium salts on binary mixtures of bitter-tasting compounds. *Chemical Senses* **2004**, *29*, 431-439.
- (15) Lyman, B.J.; Green, B.G. Oral astringency - effects of repeated exposure and interactions with sweeteners. *Chemical Senses* **1990**, *15*, 151-164.
- (16) Jones, P.R.; Gawel, R.; Francis, I.L.; Waters, E.J. The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 596-607.
- (17) Gawel, R. Red wine astringency: A review. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **1998**, *4*, 73-95.
- (18) Bakker, J. Astringency: A matter of taste. *Biologist* **1998**, *45*, 104-107.
- (19) Lesschaeve, I.; Noble, A.C. Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Clinical Nutrition* **2005**, *81*, 330S-335S.
- (20) Peleg, H.; Gacon, K.; Schlich, P.; Noble, A.C. Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1999**, *79*, 1123-1128.
- (21) Sáenz-Navajas, M.P.; Avizcuri, J.M.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chemistry* **2012**, *134*, 1484-1493.
- (22) Frank, S.; Wollmann, N.; Schieberle, P.; Hofmann, T. Reconstitution of the flavor signature of Dornfelder red wine on the basis of the natural concentrations of its key aroma and taste compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 8866-8874.
- (23) O.I.V. Recueil des methods internationales d'analyse des vins et des mouts. Vienne, **2005**.
- (24) Ribereau-Gayon, P. Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique* **1970**, *52*, 627-631.
- (25) Tepper, B.J.; Christensen, C.M.; Cao, J. Development of brief methods to classify individuals by PROP taster status. *Physiology and Behavior* **2001**, *73*, 571-577.
- (26) ISO NORM 3591 International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, **1977**.

- (27) Colonna, A.E.; Adams, D.O.; Noble, A.C. Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2004**, *10*, 26-31.
- (28) González, M.; Avizcuri-Inac, J.M.; Dizy, M.; Fernández-Zurbano, P. Rapid screening for polyphenols and organic acids in red wine by ultra performance liquid chromatographic coupled to ultraviolet-vis and mass spectrometry detectors. In Anonymous; **2013**.
- (29) Gonzalo-Diago, A.; Dizy, M.; Fernández-Zurbano, P. Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 8861–8870.
- (30) Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, J.M.; Rozés, N.; Arola, L.; Zamora, F. New Method for Evaluating Astringency in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 742-746.
- (31) Guadalupe, Z.; Soldevilla, A.; Sáenz-Navajas, M.P.; Ayestarán, B. Analysis of polymeric phenolics in red wines using different techniques combined with gel permeation chromatography fractionation. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1112*, 112-120.
- (32) Fontoin, H.; Saucier, C.; Teissedre, P.L.; Glories, Y. Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference* **2008**, *19*, 286-291.
- (33) Fischer, U.; Noble, A.C. The Effect of Ethanol, Catechin Concentration, and pH on Sourness and Bitterness of Wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **1994**, *45*, 6-10.
- (34) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Avizcuri, J.M.; Valentin, D.; Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V. Contribution of non-volatile and aroma fractions to in-mouth sensory properties of red wines: Wine reconstitution strategies and sensory sorting task. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *732*, 64–72.
- (35) Scharbert, S.; Holzmann, N.; Hofmann, T. Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 3498-3508.
- (36) Dadic, M.; Belleau, G. Proceedings of American Society of Brewing Chemists *American Society of Brewing Chemists* **1973**, 107.
- (37) Kamura, S. & Watanabe, M. Determination of phenolic cinnamates in white wine and their effect on wine quality. *Agricultural and Biological Chemistry* **1981**, *45*, 2063-2070.
- (38) Quijada-Morín, N.; Williams, P.; Rivas-Gonzalo, J.C.; Doco, T.; Escribano-Bailón, M.T. Polyphenolic, polysaccharide and oligosaccharide composition of Tempranillo red wines and their relationship with the perceived astringency. *Food Chemistry* **2014**, *154*, 44-51.

- (39) Sáenz-Navajas, M.P.; Ferreira, V.; Dizy, M.; Fernández-Zurbano, P. Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *673*, 151-159.
- (40) Escudero, A., Campo, E., Fariña, L., Cacho, J., & Ferreira, V. Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odor families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55*, 4501–4510.
- (41) Scharbert, S.; Hofmann, T. Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005**, *53*, 5377-5384.
- (42) Villamor, R.R.; Harbertson, J.F.; Ross, C.F. Influence of tannin concentration, storage temperature, and time on chemical and sensory properties of cabernet Sauvignon and Merlot wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **2009**, *60*, 442-449.
- (43) Gonzalo-Diago, A.; Dizy, M.; Fernández-Zurbano, P. Contribution of low molecular weight phenols to bitter taste and mouthfeel properties in red wines. *Food Chemistry* **2014**, *154*, 187-198.
- (44) Fischer, U. The influence of ethanol, pH, and phenolic composition on the temporal perception of bitterness and astringency, and parotid salivation. **1990**, pp. 504.
- (45) Robichaud, J.L.; Noble, A.C. Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **1990**, *52*, 343-353.
- (46) Chira, K.; Pacella, N.; Jourdes, M.; Teissedre, P.L. Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry* **2011**, *126*, 1971-1977.
- (47) Noble, A.C. Bitterness and astringency in wine, In *Bitterness in Foods and Beverages*, R. L. Rouseff, Ed.; Elsevier: Amsterdam, **1990**; Vol.25 pp. 145-158.
- (48) Wollmann, N.; Hofmann, T. Compositional and sensory characterization of red wine polymers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, *61*, 2045-2061.





# **CAPITULO 5.**

**EFFECTO DEL ACLAREO MANUAL Y DE LA APLICACIÓN DE LA PROHEXADIONA DE CALCIO EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA DE UVAS Y VINOS. INFLUENCIA EN LAS PROPIEDADES SENSORIALES DE LOS VINOS**



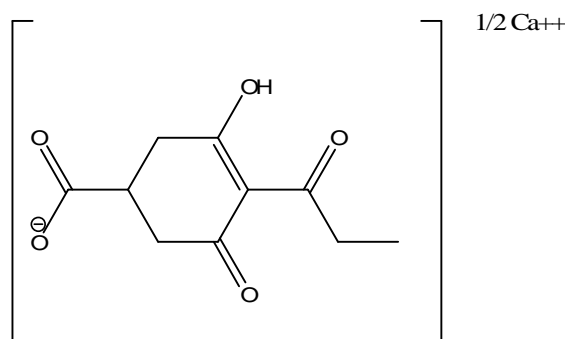




## 5.1. ANTECEDENTES

La producción de uvas de calidad requiere del control exhaustivo de múltiples parámetros en el viñedo. Entre ellos, la gestión de la producción resulta un parámetro a tener en cuenta en el avance hacia una vitivinicultura de calidad.<sup>1</sup> Hoy en día, el aclareo manual de racimos es la técnica comúnmente utilizada para controlar la producción en viñedos con mucho vigor. En muchos casos, el aclareo induce una maduración más temprana de la uva y mejora la calidad, pero depende de forma importante del momento en el que se realice.<sup>2</sup> Algunos autores han demostrado que el periodo más efectivo para realizar el aclareo es el envero.<sup>3-5</sup> La influencia de esta técnica sobre el pH y la acidez total es menor que sobre la acumulación de azúcares, los cuales se incrementan. Además, diversos autores han encontrado que el aclareo de racimos produce un aumento en la intensidad colorante (IC), en los antocianos, así como en el resto de compuestos polifenólicos, debido al incremento del ratio área foliar/producción.<sup>4-7</sup> Aunque efectivo, el aclareo manual de racimos es una técnica vitícola muy cara ya que requiere de elevada mano de obra y tiempo.<sup>8</sup>

Un método alternativo para controlar la producción es la aplicación en el viñedo de reguladores de crecimiento, los cuales han proporcionado resultados satisfactorios en otras frutas. Los reguladores de crecimiento permiten el control de diversos parámetros fisiológicos envueltos en el desarrollo vegetativo y reproductivo.<sup>9</sup> De entre ellos, la prohexadiona de calcio (Pro-Ca) (3,5-dioxo-4-propionilciclohexanocarboxilato de calcio) (**Figura 5.1**) muestra especial importancia.<sup>10</sup>



**Figura 5.1.** Estructura de la prohexadiona de calcio

La Pro-Ca pertenece al grupo de las acilciclohexanodionas y es un mimético estructural del ácido 2-oxo-glutárico, el cual actúa como co-sustrato de las dioxigenasas, catalizando los últimos pasos de la síntesis de las giberelinas (GAs). La Pro-Ca bloquea particularmente la  $3\beta$ -hidroxilación, inhibiendo de ese modo la formación de GAs biológicamente activas a partir de GAs biológicamente inactivas.<sup>11</sup> La interferencia que ejerce la Pro-Ca en el metabolismo de las giberelinas, el etileno y los flavonoides reviste especial importancia debido a su implicación práctica. Tales interferencias producen una disminución en el contenido de giberelinas bioactivas y reducen la formación de etileno, lo cual causa la reducción del crecimiento vegetativo y del desarrollo del fruto<sup>12</sup>, y por consiguiente, la posibilidad de aumentar la calidad.<sup>9</sup>

La Pro-Ca es capaz de alterar el metabolismo de los flavonoides, generándose nuevos flavonoides que fueron previamente identificados como 3-deoxicatequinas en las hojas más jóvenes de manzanos<sup>13-15</sup>, perales<sup>14</sup>, en las hojas de viña<sup>16</sup> y en bayas o frutas silvestres.<sup>17</sup> Sin embargo resulta necesario estudiar el efecto que muestra la Pro-Ca en la composición fenólica de uvas y vinos y profundizar en el conocimiento de los efectos que su aplicación podría tener en el desarrollo de la fermentación alcohólica. Además, la alteración de la composición de los flavonoides parece estar relacionada con un incremento en la resistencia a infecciones microbianas en diversas plantas.<sup>15,16,18,19</sup> La Pro-Ca carece por sí misma de actividad antimicrobiana, pero su aplicación conlleva a una reducción de la infección causada por la bacteria *Erwinia amylovora* en manzanos<sup>13,20,21</sup> y en perales.<sup>22</sup> Muchos estudios sugieren que los compuestos fenólicos pueden jugar un papel relevante en la resistencia de la planta actuando como compuestos antimicrobianos<sup>23-26</sup> o como barreras mecánicas.<sup>27-30</sup>

La Pro-Ca se aplica sencillamente mediante pulverización y no constituye riesgo aparente ni para el consumidor ni para el medio ambiente<sup>31</sup> ya que su probabilidad de dejar residuos en las plantas es muy baja.<sup>32</sup> La Pro-Ca es absorbida completamente en menos de ocho horas. En la planta tiene una vida media de unas pocas semanas y en el suelo su vida media es inferior a una semana, sin que su degradación produzca metabolitos tóxicos.<sup>33</sup> Este regulador de crecimiento ha sido patentado por Kumiai Chemical Industry Co. y ha sido registrado como regulador de crecimiento en arroz en

Japón.<sup>34</sup> Posteriormente, la Pro-Ca fue registrado en Estados Unidos bajo el nombre comercial de Apogee®, (27.5 % Pro-Ca), como sustituto de daminozide, usado en manzanos y como Regalis® (10 % Pro-Ca) en Europa a través de la empresa BASF.<sup>35</sup> La Pro-Ca ha sido aplicada en árboles frutales con resultados altamente satisfactorios.<sup>16,36-38</sup>

Disegna y col.<sup>39</sup> observaron que el tratamiento con Pro-Ca en la variedad Tannat produce una reducción del crecimiento vegetativo, de la producción de uvas y del tamaño y peso de las bayas. Los vinos elaborados son percibidos como más afrutados, más alcohólicos, con más color, con mayor volumen en boca y complejidad, más persistentes y más intensos aromáticamente. Estos vinos presentan una mayor concentración de terpenos y norisoprenoides con respecto al vino control. Posteriormente, Lo Giudice y col.<sup>40,41</sup> estudiaron el impacto de la aplicación de Pro-Ca en vides de *Vitis vinifera*, especialmente en cv. Chardonnay, Cabernet Franc, Cabernet Sauvignon y Seyval. Se observó que Pro-Ca produce una disminución en el tamaño de la baya. En cv. Cabernet Sauvignon, la reducción del peso de baya está correlacionada con un aumento en la intensidad de color y en el contenido de antocianos y fenoles totales. Los efectos observados en la composición de la uva son generalmente positivos, pero el efecto en la calidad y en las características organolépticas de los vinos es aún desconocido.<sup>41</sup>

En un trabajo previo llevado a cabo en nuestro grupo de investigación en cv. Tempranillo, el tratamiento con Pro-Ca produjo una reducción en el rendimiento, en el tamaño de bayas y de racimos. Además se produjo una maduración más homogénea y temprana, con altos valores de grados Brix. En los vinos elaborados se observó un incremento en el índice de polifenoles totales (IPT), taninos e intensidad colorante (IC) siendo estos vinos mejor evaluados organolépticamente.<sup>42</sup>

El objetivo de este estudio es obtener una información más precisa y detallada del efecto de la Pro-Ca en la composición fenólica de uvas y vinos tintos de las variedades cv. Tempranillo y cv. Garnacha, la cual es una de las variedades tintas más ampliamente cultivada en el mundo.

## **5.2. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.2.1. Viñedos**

Este trabajo experimental se llevó a cabo en dos viñedos comerciales de Tempranillo y Garnacha, no irrigados y situados en dos poblaciones próximas pertenecientes a la Denominación de Origen Calificada Rioja, durante dos años consecutivos, 2007 y 2008.

El viñedo correspondiente a la variedad Tempranillo (clon 51) sobre el portainjerto 110R está localizado en Aldeanueva de Ebro (42°13'47"N 1°53'16"O, 346 msnm). El viñedo, de 1 ha, fue plantado en el año 2000. El sistema de plantación es el vaso con un marco de plantación de 2.6 m x 1.2 m. Las cepas están podadas a 12 pámpanos.

El viñedo correspondiente a la variedad Garnacha (clon 70) sobre el portainjerto 110R está localizado en Rincón de Soto (42°14'4"N 1°51'03"O, 216 msnm). El viñedo de 2.5 ha, fue plantado en el año 1998. El sistema de plantación es la espaldera con un marco de plantación de 2.6 m x 1.2 m. Las cepas están podadas a 12 pámpanos.

Ambas parcelas estuvieron gestionadas de acuerdo a las prácticas estándar de viticultura para la variedad y la región. Todas las aplicaciones de fertilizantes y pesticidas y prácticas de gestión de plagas y enfermedades fueron realizadas lo más uniformemente posible en ambos viñedos.

### **5.2.2. Tratamiento en campo**

Los tratamientos se llevaron a cabo a lo largo de seis filas consecutivas, dejando tres filas de separación entre los tratamientos de aclareo manual y Pro-Ca. Cada fila estaba compuesta aproximadamente por unas 100 cepas. La Pro-Ca, bajo el nombre comercial de Regalis®, 10 % Pro-Ca, (BASF, Ludwigshafen, Alemania) fue aplicada en un única dosis de 3 kg/ha en prefloración utilizando un atomizador ILEMO-HARDI® (Taastrup, Dinamarca). El tratamiento se realizó a ambos lados de la pared vegetativa

(en el caso del viñedo en espaldera), mojando los pámpanos. Las aplicaciones se realizaron cuando no existía riesgo de precipitaciones, al menos, en las siguientes 24 horas. Los tratamientos que se llevaron a cabo fueron los siguientes: cepas testigo o control, cepas tratadas con Pro-Ca y cepas donde se realizó un aclareo manual de racimos, el cual se llevó a cabo a comienzos del envero y en la siguiente proporción: 30 % en Tempranillo y 50 % en Garnacha, en ambos años, excepto en la variedad Tempranillo, en la cual, en el año 2008 no se realizó el aclareo manual debido a la baja producción que presentaba. El racimo distal fue eliminado, al igual que racimos de pámpanos débiles, dejando como mucho un sólo racimo por pámpano.

### **5.2.3. Proceso de Vinificación**

Se vendimiaron 40 cepas al azar pertenecientes a las dos filas centrales de cada tratamiento, con el objetivo de evitar así interferencias con los tratamientos realizados en filas vecinas. Las cinco cepas iniciales y finales de cada fila no fueron consideradas. Las fechas de vendimia escogidas en función de la madurez de la uva fueron el 11 de octubre de 2007 y el 7 de octubre de 2008. La vendimia se realizó de manera manual y para ello se emplearon cajas de plástico de 15 kg. La vinificación tuvo lugar en la bodega experimental de la Universidad de La Rioja. Después del estrujado y despalillado, la pasta y el mosto se encubaron en depósitos de acero inoxidable de 50 L, 3 depósitos por tratamiento con el fin de tener 3 repeticiones para cada uno de ellos. En el momento del encubado, se adicionó metabisulfito potásico (100 mg/kg). Posteriormente, se inoculó con levaduras secas activas *Saccharomyces cerevisiae* (30 g/hL) (VRB Uvaferm®, Lallemand, Australia). El proceso de prefermentación duró 24 horas. Durante la vinificación se efectuaron dos bazuqueos diarios. La fermentación alcohólica se controló midiendo diariamente la evolución de la densidad y la temperatura. Una vez acabada la fermentación alcohólica se descubaron los vinos, llevándose a cabo la fermentación maloláctica en depósitos de acero inoxidable de 15 L. Esta última fermentación se realizó inoculando bacterias lácticas *Oenococcus oeni* (1 g/hL) (MRB® Alpha, Lallemand, Australia) con el fin de llevar a cabo una fermentación maloláctica lo más homogénea posible. El control de la fermentación maloláctica se llevó a cabo midiendo el consumo del ácido málico y la formación del ácido láctico. Finalizada la fermentación maloláctica, se trasegaron los vinos, se

tomaron muestras y se ajustó la concentración de anhídrido sulfuroso a 30 mg/L. Los vinos se clarificaron por frío a 4 °C durante 4 semanas y fueron embotellados.

## **5.2.4. Análisis Químicos**

### **5.2.4.1. Reactivos**

Todos los compuestos químicos fueron de pureza analítica. Todos los disolventes fueron de grado HPLC. El agua ultrapura se obtuvo a partir del sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia). El gel TSK Toyopearl HW-50F fue suministrado por TosoHaas (Montgomeryville, PA, USA). El metanol, ácido fórmico, etanol, acetonitrilo, ácido sulfúrico, acetato de sodio, metabisulfito sódico y el ácido clorhídrico se adquirieron en Scharlab (Barcelona, España). El sulfato de quinina dihidrato (98 %) se obtuvo en Alfa Aesor (Karlsruhe, Alemania). El sulfato de potasio y aluminio y el ácido tánico fueron adquiridos en Panreac (Barcelona, España). La ovoalbúmina (V-grade), catequina, epicatequina, miricetina, kaempferol, ácido gálico, ácido cafeico, quercetina, siringaldazina y la polivinilpolipirrolidona fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid, España). Quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-galactósido, quercetina-3-*O*-glucurónido, kaempferol-3-*O*-glucósido, epicatequina galato, epigallocatequina galato, epigallocatequina, y *p*-ácido cumárico fueron proporcionados por Extrasynthèse (Genay Cedex, Francia). El ácido trifluoroacético (TFA) fue suministrado por Fluka (Buchs, Suiza). La metilcelulosa fue suministrada por Acros Organics (New Jersey, USA).

### **5.2.4.2. Análisis de las uvas**

#### **5.2.4.2.1. Preparación de las muestras**

El muestreo de las bayas, consistió en una selección al azar dentro del racimo pero siguiendo un muestreo metódico de recogida de 5 bayas a lo largo de éste; dos de los hombros, dos del centro del racimo y una de la parte inferior. Muestras de 50 bayas, correspondientes a cada uno de los tratamientos, se recogieron por triplicado después de vendimiar para determinar el peso medio de las bayas. Estas muestras se conservaron a -20 °C para posteriores análisis. Además, se recogieron muestras de 100 bayas para determinar el tamaño y la relación sólido/líquido.

#### **5.2.4.2.2. Madurez Tecnológica**

Para el estudio de la madurez tecnológica, 100 bayas, muestreadas al azar y por triplicado por cada tratamiento, fueron pesadas y colocadas en unas bandejas que presentaban agujeros de diferentes diámetros, (18, 16, 14, 12 y 10 mm). Se realizó el conteo del número de bayas en función de su diámetro, es decir, número de bayas retenidas en cada bandeja. Posteriormente las bayas fueron manualmente estrujadas y filtradas. Las partes sólidas fueron separadas y pesadas y se midió el volumen de líquido. Los parámetros enológicos convencionales (densidad, °Brix, pH, acidez total, y ácido málico) fueron determinados mediante GrapeScan FT 120 (FOSS, Dinamarca), previamente calibrado con muestras de uva analizadas por los métodos oficiales de la OIV. La concentración de lacasa fue determinada usando el método descrito por Dubourdieu y col.<sup>43</sup>

#### **5.2.4.2.3. Madurez Fenólica**

Para el estudio de la madurez fenólica, tres muestras de 50 bayas, muestreadas al azar, fueron tratadas de acuerdo al método propuesto por Iland y col.<sup>44</sup> Este método está basado en la maceración de bayas estrujadas en una disolución metanólica (50 %) durante una hora. Los polifenoles totales y los antocianos fueron estimados midiendo la absorbancia a 280 y 520 nm, respectivamente y en medio ácido. Los taninos fueron evaluados una vez que tuvo lugar su precipitación con metilcelulosa. La cuantificación se llevó a cabo a partir de la catequina, expresado como miligramos de catequina equivalente por gramo fresco de peso de muestra. Los antocianos fueron expresados como miligramos de malvidina-3-glucósido por gramo fresco de peso de muestra. Los valores triestímulo ( $L^*$ ,  $C^*$  y  $H^*$ ) fueron calculados para obtener las coordenadas cromáticas CIELab,  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (rojo/verde) y  $b^*$  (amarillo/azul), usando como iluminante D65 y el observador CIE 1964 basado en el método de la OIV descrito por Ayala y col.<sup>45</sup> El espectro del mosto se obtuvo en el rango del visible (380-770 nm), usando una cubeta de 1 mm de paso óptico. Todos los análisis se realizaron por triplicado.

### **5.2.4.3. Análisis de los vinos**

#### **5.2.4.3.1. Fraccionamiento de los compuestos fenólicos del vino**

El fraccionamiento llevado a cabo en este estudio ha sido descrito previamente en el apartado 1.2.3.1. La fracción etánolica, en la cual se recogen los compuestos de bajo peso molecular fue la analizada por HPLC-DAD y HPLC-MS. Todos los vinos fueron fraccionados tres veces y filtrados por 0.45  $\mu\text{m}$  antes del análisis.

#### **5.2.4.3.2. Análisis de los compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD**

Antocianos, ácidos hidroxycinámicos, flavanoles y flavonoles fueron analizados por inyección directa en el HPLC, a partir de la fracción obtenida mediante cromatografía de permeación en gel. El análisis mediante HPLC-DAD se realizó con un cromatógrafo líquido modular de la casa Agilent y modelo 1100 (Waldbronn, Alemania) equipado con un inyector G1313A, una bomba cuaternaria G1311A, un desgasificador en línea G1379A, un horno G1316A, un detector de fila de fotodiodos G1315B y el programa de Agilent Chemstation. La columna de fase reversa fue una Kromasil 100-C18 (5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula y 250 mm  $\times$  46 mm d.i.), protegida con una precolumna del mismo material (Teknokroma, Barcelona, España). Los compuestos fenólicos se eluyeron mediante las siguientes condiciones: 1 mL/min de velocidad de flujo; horno a 40 °C; disolvente A: ácido fórmico/agua (5:95, v/v); disolvente B: acetonitrilo (100 %); gradiente: isocrático 0 % B durante 2 min, de 0 a 8 % de B en 3 min, de 8 a 20 % de B en 55 min, de 20 a 30 % de B en 10 min, de 30 a 50 % de B en 1 min, de 50 a 100 % de B en 2 min, isocrático en 100 % de B durante 7 min, de 100 a 0.0 % B en 1 min y 0 % de B durante 9 min, seguido de un lavado y acondicionamiento de la columna.

Se inyectaron 30  $\mu\text{L}$  de la fracción a estudio disuelta en ácido fórmico/agua, (5:95 v/v) directamente en el sistema de HPLC y fueron cromatografiados. Los espectros en el UV-Vis se adquirieron entre 220 y 700 nm, con un ancho de banda de 2.0 nm. La determinación de los antocianos se realizó a 520 nm, la de los flavonoles a 365 nm, la de los ácidos fenólicos a 313 nm y la de los flavanoles a 280 nm. Los



diferentes compuestos fueron identificados en base a los espectros UV-Vis así como a los tiempos de retención de los estándares comerciales correspondientes.

Las curvas de calibración se obtuvieron inyectando diferentes concentraciones de los estándares. Los contenidos de antocianos, flavonoles, ácidos hidroxicinámicos y flavanoles fueron expresados como malvidina-3-*O*-glucósido, quercetina, ácido cafeico y catequina, respectivamente. El rango lineal de las curvas de calibración ( $r^2 > 0.993$  en todos los casos) fue de 0.01 (límite de cuantificación) a 1 mg/L para los compuestos con concentraciones más bajas y de 1.0 a 100 mg/L para los compuestos presentes en concentraciones más altas. Las concentraciones fueron determinadas a partir de las ecuaciones de regresión lineal. Los datos cuantitativos de los compuestos identificados se obtuvieron mediante interpolación de las áreas relativas en las rectas de calibrado construidas a partir de los compuestos puros. Cada medida se realizó por triplicado. El método analítico mostró una exactitud de 97.1 % y 103.6 % y precisiones (repetibilidad) de 0.9 %.

#### **5.2.4.3.3. Análisis de los compuestos fenólicos mediante HPLC-ESI-MS**

Con el fin de confirmar la naturaleza de los compuestos, se llevó a cabo un análisis mediante espectroscopía de masas acoplando la salida del HPLC a un espectrómetro de masas con analizador doble cuadrupolo con una fuente de ionización electrospray (HP 59987A) (ESI) y controlado por el software de MS Agilent 1200. La separación cromatográfica se llevó a cabo de acuerdo al método descrito en el apartado 5.2.4.3.2 de este mismo capítulo. Para asegurar que el flujo que pasaba al ESI era de 19  $\mu\text{L}/\text{min}$  durante la LC-MS, el eluyente procedente del cromatógrafo se dividió mediante una pieza en forma de T, que poseía un volumen muerto nulo. Esta velocidad de flujo fue encontrada como la más óptima bajo las condiciones de análisis. Como gas nebulizador se utilizó nitrógeno a una presión de entrada de 80 psi y una temperatura de 225 °C. Todos los datos obtenidos de la espectrometría de masas se adquirieron en el rango de  $m/z$  150 a 700 en modo negativo para los ácidos hidroxicinámicos, flavanoles y flavonoles y en modo positivo para los antocianos. En la **Tabla 5.1** se muestra la identificación de todos los compuestos realizada mediante UV-Vis y MS.

**Tabla 5.1.** Compuestos analizados mediante HPLC-DAD y MS en los vinos del estudio.

TR (min)	Compuestos identificados	$\lambda_{(\max)}$ (nm)	[M-H] <sup>-</sup> (m/z)	Fragmentos MS/MS (m/z)
<b>Ácidos</b>				
3.7	Ácido gálico	216, 272	169	125
<b>Flavanoles</b>				
9.3	Catequin-3-galato	202, 277	441	289
9.6	Catequina	203, 279	289	203
11.2	Epigallocatequina-3-galato	203, 271	457	305
13.7	Epicatequin-3-galato	203, 279	441	289
17.2	Epicatequina	203, 279	289	203
11.9	Epigallocatequina	206, 271	305	203
<b>Ácidos hidroxicinámicos</b>				
8.4	(Z)-ácido caftárico	330	311	179
8.6	(E)-ácido caftárico	331	311	179
10.6	Ácido cutárico	313	295	149
11.2	Ácido cafeico	218, 238, 324	179	135
16.8	Ácido cumárico	212, 226, 310	163	119
<b>Flavonoles</b>				
20.5	Miricetina-3-glucósido	254, 365	479	151
22.7	Quercetina-3-galactósido	256, 354	463	301
27.6	Quercetina-3-glucósido	256, 355	463	301
35.4	Kaempferol-3-glucósido	265, 346	447	285
42.4	Miricetina	254, 371	317	151
54.7	Quercetina	255, 369	301	151
67.5	Kaempferol	253, 362	285	269
<b>Antocianos</b>			[M-H] <sup>+</sup> (m/z)	
12.8	Delfinidina-3-O-glucósido	277, 342, 524	465	303
15.7	Cianidina-3-O-glucósido	279, 516	449	287
18.4	Petunidina-3-O-glucósido	277, 347, 525	479	317
22.1	Vitisina B de petunidina-3-O-glucósido	492	503	341
25.5	Malvidina-3-O-glucósido	277, 348, 527	493	331
29.2	Vitisina A	299, 372, 510	561	399
30.3	Delfinidina-3-O-6-acetilglucósido	276, 346, 527	507	303
38.8	Malvidina-3-O-glucósido-catequina	280, 532	781	619
42.6	Petunidina-3-O-6-acetilglucósido	270, 529	521	317
46.9	Peonidina-3-O-6-acetilglucósido	280, 522	505	301
47.9	Malvidina-3-O-6-acetilglucósido	278, 350, 530	535	331
52.4	Delfinidina-3-O-6-p-cumaroil-glucósido	282, 313, 531	611	303
54.3	Cianidina-3-O-6-p-cumaroil-glucósido	284, 314, 524	595	287
55.9	Petunidina-3-O-6-p-cumaroil-glucósido	282, 313, 532	625	317
62.6	Peonidina-3-O-6-p-cumaroil-glucósido	283, 313, 526	609	301
64.3	Malvidina-3-O-6-p-cumaroil-glucósido	282, 313, 532	639	331

#### **5.2.4.3.4. Análisis de proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs)**

Las proantocianidinas precipitables con ovoalbúmina presentes en los vinos se determinaron siguiendo el método propuesto por Llaudy y col.<sup>46</sup>, el cual ha sido descrito en el apartado 2.2.4.2.

#### **5.2.4.3.5. Determinación de parámetros enológicos convencionales y medidas de color**

Los parámetros enológicos convencionales de los vinos (contenido en etanol, pH, azúcares reductores, acidez total, acidez volátil y SO<sub>2</sub> libre y total) se determinaron de acuerdo a las prácticas oficiales de la OIV.<sup>47</sup> El ácido L-málico y L-láctico se determinaron mediante métodos enzimáticos de acuerdo con los métodos oficiales de análisis AOAC.<sup>48</sup> La intensidad colorante (IC) fue calculada como la suma de las absorbancias a 420 nm, 520 nm y 620 nm y multiplicada por 10 ya que las medidas se realizaron en cubetas de cuarzo de 1 mm de paso óptico. La tonalidad (T) se calculó como el cociente entre la absorbancia a 420 nm y la absorbancia a 520 nm. El índice de polifenoles totales (IPT) fue estimado como la absorbancia a 280 nm. Los taninos se determinaron usando el método descrito por Ribéreau-Gayon y Stonestreet.<sup>49</sup> El índice de etanol (IET) que refleja la condensación tanino-polisacárido fue calculado usando el método descrito por Glories.<sup>50</sup> Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

### **5.2.5. Análisis Sensorial de los vinos**

En Febrero de 2008 y 2009, se llevó a cabo el análisis sensorial de los vinos. El panel sensorial estuvo formado por expertos de la Asociación de Enólogos de La Rioja y Licenciados en Enología por la Universidad de La Rioja. Todos los panelistas habían participado previamente en el análisis descriptivo de vinos y estaban habituados a puntuar el perfil aromático y gustativo de variedades tintas como Garnacha y Tempranillo. El panel estuvo formado por 30 panelistas (13 hombres y 17 mujeres de entre 28 y 56 años) y 32 panelistas (17 hombres y 15 mujeres de entre 26 y 62 años) en 2008 y 2009, respectivamente.

### **5.2.5.1. Test Dúo-Trío**

El primer objetivo de la evaluación sensorial era determinar si los vinos obtenidos a partir de los tratamientos en campo (aclareo manual y aplicación de Pro-Ca) eran significativamente diferentes al control. Para ello, se realizó un test dúo-trío, ya que es una aplicación clásica de un test discriminativo.<sup>51</sup> Se presentaron tres muestras a los expertos, una de ellas identificada como referencia. Una de las otras dos era idéntica a la referencia. A los panelistas se les preguntó cual de las dos muestras presentadas era igual a la muestra referencia, por lo que se utilizó un test binomial unilateral. Los panelistas evaluaron el aroma, el sabor y las percepciones en boca.

### **5.2.5.2. Entrenamiento sensorial**

Los panelistas participaron en cuatro sesiones de entrenamiento sensorial de aproximadamente 45 minutos de duración cada una. En estas sesiones se recordaron términos aromáticos típicos de cada variedad y se hizo también un recordatorio de sabores y sensaciones en boca. En la primera sesión, a los panelistas se les pidió describir los atributos aromáticos de los vinos Tempranillo y Garnacha con sus propias palabras. Los descriptores y sus definiciones fueron discutidos entre los panelistas y el director del panel. Los panelistas seleccionaron ocho atributos aromáticos que se acordaron como los mejores descriptores para definir las características sensoriales de los vinos. Todos los términos generados fueron términos generalmente utilizados en la descripción de vinos tintos (**Tabla 5.2**). Estos mismos descriptores fueron usados también en 2009 para poder realizar una comparación entre años, así que en ese año no hubo discusión respecto a la elección de términos. Durante el entrenamiento, se presentaron diferentes estándares, representativos de aromas, sabor y astringencia. Los estándares utilizados fueron o bien odorantes comerciales suministrados por Sentosphère (Paris, Francia), “Le Nez du Vin” (Jean Lenoir, Provence, Francia), o productos naturales (frutas, zumos, especias, verduras, etc.) preparados al comienzo de cada sesión. Para el entrenamiento del sabor y la astringencia se prepararon disoluciones con distintas concentraciones de azúcar de mesa (0 - 12 g/L) para el dulzor, ácido tartárico (0 - 1.5 g/L) para la acidez, sulfato de quinina (0 - 10 mg/L) para el amargor, glicerol (0 - 30 g/L) para el volumen en boca y sulfato de potasio y aluminio (0 - 5 g/L)

para la astringencia. Así, durante el entrenamiento, estas disoluciones ayudaron a los panelistas a aprender a reconocer y discriminar entre las diferentes sensaciones orales.

**Tabla 5.2.** Lista final de los descriptores usados para el análisis descriptivo del aroma, sabor y sensaciones en boca, con los correspondientes estándares de referencia presentados durante el entrenamiento del panel.

<b>Atributo</b>	<b>Estándar de referencia*</b>
<b>Aroma</b>	
Frutas blancas y amarillas	14 mL de zumo de manzana + 14 mL de zumo de melocotón + 20 gotas de extracto de naranja + 0.5 mL de acetato de isoamilo
Frutas rojas y negras	15 mL de agua con sabor a cassis + 5 g de mermelada de moras + 5 g de mermelada de fresa + 5 g de mermelada de frambuesa + 5 g de mermelada de cereza
Floral	50 µL del nº 25 de “Le Nez Du Vin” + 50 µL del nº 29 de “Le Nez Du Vin” + 5 pétalos de jazmín + 5 pétalos de rosa
Láctico	30 mL de nata líquida
Especiado	2 g de pimienta negra + regaliz de palo + nuez moscada
Balsámico	1 g de caramelo de menta en trozos
Alcohólico	15 mL de alcohol etílico
Herbáceo	4 g de hierba fresca cortada
<b>Sabor y sensaciones en boca</b>	
Dulzor	0-12 g/L Sacarosa
Acidez	0-1.5 g/L Ácido tartárico
Amargor	0-10 mg/L Sulfato de quinina
Astringencia	0-5 g/L Sulfato de potasio y aluminio
Volumen en boca	0-30 g/L Glicerol

\*Los estándares se prepararon en 30 mL de agua desionizada

Durante la fase de entrenamiento general (cuatro sesiones), los panelistas se familiarizaron con los atributos aromáticos y con la evaluación de la intensidad del dulzor, acidez, amargor, volumen en boca, astringencia, intensidad aromática y retronasal e intensidad global así como persistencia. En una sesión típica de entrenamiento, los panelistas tuvieron que evaluar de entre dos y cuatro vinos diferentes y puntuar los atributos aromáticos seleccionados, el dulzor, acidez, amargor, volumen en boca y astringencia en una escala de seis puntos (0 = “ausencia”, 1 = “muy bajo” y 5 = “muy alto”), mientras que la intensidad aromática y retronasal, la intensidad global y la persistencia se puntuaron en una escala de cinco puntos (1 = “muy débil” y 5 = “muy fuerte”) ya que para estos atributos el “0” carece de sentido.

### **5.2.5.3. Evaluación de las muestras**

Los panelistas entrenados evaluaron los vinos por duplicado. Los vinos fueron servidos en un orden aleatorio, en copas negras normalizadas ISO<sup>52</sup>, (20 mL) codificadas por un número de tres cifras y cubiertas por una placa Petri. Los panelistas tuvieron que oler cada vino y puntuar los atributos aromáticos. A continuación debían introducirse el vino en la boca y puntuar las intensidades del dulzor, acidez, amargor, volumen en boca, astringencia, intensidad aromática, intensidad retronasal, intensidad global y persistencia usando las escalas descritas en la sección anterior. Entre muestra y muestra se impuso un intervalo de 5 minutos para limitar los efectos de acumulación. Durante este tiempo debían enjuagarse la boca con agua, comer pan desalado (crackers) y nuevamente enjuagarse con agua. Todos los vinos se sirvieron a temperatura ambiente (20 – 22 °C) y se evaluaron en cabinas individuales.

### **5.2.6. Análisis estadístico**

Se realizaron ANOVAs a un factor para cada uno de los parámetros evaluados en uvas con tres repeticiones por muestra. El método de comparación utilizado para identificar diferencias significativas entre las uvas tratadas y las control fue el Test de Duncan a un nivel de significación del 0.05 %.

Se aplicó un ANOVA a un factor a todos los datos químicos obtenidos para identificar diferencias significativas entre el vino control y los vinos tratados. Las diferencias entre las muestras fueron referidas a diferencias significativas al menos  $P < 0.05$ . Un ANOVA a dos factores fue aplicado para evaluar las interacciones “tratamiento x variedad” y “tratamiento x año” con una probabilidad de  $P < 0.05$ . Los análisis estadísticos se llevaron a cabo usando el programa SPSS 15 (IBM®, Chicago, IL, U.S.A). También se aplicó un modelo de ANOVA mixto sobre los datos procedentes del análisis sensorial descriptivo considerando a los jueces como un efecto aleatorio. Los factores tratamientos, réplicas y jueces así como los dos tipos de interacciones, “tratamiento-vino x juez” y “tratamiento-vino x réplica” fueron evaluados a una significación ( $P < 0.05$ ) usando un modelo lineal general. Las diferencias de medias entre tratamientos fueron calculadas aplicando la diferencia mínima significativa (Test de Fisher).

Se aplicó el análisis de componentes principales (PCA) empleando las puntuaciones promedio dadas por los panelistas a los atributos sensoriales y a los parámetros de color.

## 5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.3.1. Condiciones climáticas

Los datos meteorológicos mensuales desde prefloración a vendimia se muestran en la **Tabla 5.3**. Las temperaturas mensuales fueron similares en ambos años, excepto en Agosto donde las temperaturas fueron más altas en 2008, y Octubre, con temperaturas más bajas en 2008. Las precipitaciones fueron diferentes, siendo menores en 2008. La integral térmica calculada desde el 1 de Junio hasta la vendimia fue mayor en 2007, existiendo diferencias entre el mismo mes de diferentes años.

**Tabla 5.3.** Datos climáticos de Aldeanueva de Ebro proporcionados por la estación meteorológica del Gobierno de La Rioja.

Meses	Temperatura máxima <sup>a</sup> (°C)		Temperatura media <sup>a</sup> (°C)		Temperatura mínima <sup>a</sup> (°C)		Precipitación acumulada (L/m <sup>2</sup> )		IT <sup>b</sup> (°C)	
	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008	2007	2008
<b>Junio</b>	27.5	27.3	20.2	20.6	13.4	14.7	11.4	17.0	219.7	230.8
<b>Julio</b>	29.9	29.6	22.1	21.9	15.0	14.9	0.0	32.8	385.8	331.0
<b>Agosto</b>	28.2	30.1	21.2	22.2	15.1	15.3	16.8	1.8	361.9	394.5
<b>Septiembre</b>	25.3	25.0	18.5	18.2	12.9	12.3	10.2	13.6	272.7	260.0
<b>Octubre<sup>c</sup></b>	22.2	19.5	17.2	12.9	13.7	6.5	51	0	87.5	21.2
	<b>TOTAL</b>						89.4	65.2	1327.6	1237.5

<sup>a</sup>Media completa del mes, <sup>b</sup>Integral térmica (base 10°C), <sup>c</sup>datos recogidos desde el 1 de octubre hasta el día de la vendimia

### 5.3.2. Peso y tamaño de bayas. Rendimiento

La efectividad de los tratamientos respecto a la disminución de la producción en ambas variedades y años se muestra en la **Tabla 5.4**. Los resultados muestran como la aplicación de Pro-Ca produjo una reducción en el rendimiento del 29 % y 15 %, en la variedad Garnacha, en 2007 y 2008, respectivamente; y en Tempranillo del 24 % en 2007, mientras que no se observó reducción en el 2008. El aclareo manual produjo una reducción de la producción en Tempranillo del 25 % en 2007, y en Garnacha del 41 % y 42 % en 2007 y 2008, respectivamente. La efectividad de la reducción de la producción debido a la aplicación de Pro-Ca fue observada por tanto en ambas variedades



estudiadas, Tempranillo y Garnacha, confirmando estos resultados los estudios previos llevados a cabo por Lo Giudice y col.<sup>41</sup> y Vaquero-Fernández y col.<sup>42</sup>

En la **Tabla 5.4** se muestra también el tamaño de las bayas así como la relación sólido/líquido. En todos los casos, excepto para la variedad Tempranillo 2008, las uvas procedentes de cepas tratadas con Pro-Ca mostraron un peso significativamente menor que las uvas procedentes de cepas control. Este hecho concuerda con los resultados de Lo Giudice y col.<sup>41</sup> y Vaquero y col.<sup>42</sup> Un comportamiento menos regular mostraron las uvas de cepas sometidas a un aclareo manual de racimos. Como se observa en el año 2007, las cepas de la variedad Tempranillo en las cuales se realizó el aclareo manual de racimos presentaron un peso significativamente superior respecto a las uvas control y a las procedentes del tratamiento con Pro-Ca. En el caso de la variedad Garnacha, en el año 2007, las uvas procedentes de cepas en las que se realizó un aclareo manual de racimos no mostraron diferencias significativas con respecto a las uvas control, sin embargo, en el año 2008, el peso de las uvas procedentes de cepas sometidas a un aclareo manual fueron significativamente inferiores que las uvas control y significativamente superiores que las uvas tratadas con Pro-Ca. Resultados similares se han obtenido con respecto al tamaño de las bayas (**Tabla 5.4**).

Respecto a la relación sólido/líquido, sólo se encontraron diferencias en el año 2007, pero con un comportamiento diferente en cada una de las variedades estudiadas. Mientras que en el caso de la variedad Tempranillo, el aclareo manual y la Pro-Ca produjeron una mayor relación sólido/líquido que las uvas control, en la variedad Garnacha, solo las uvas control y las procedentes de la aplicación de Pro-Ca mostraron diferencias significativas, siendo en este caso las uvas control las que presentaron una mayor relación sólido/líquido.

Como se ha mencionado en el apartado 5.2.2 la baja producción presente en las cepas de Tempranillo en el año 2008, impidió la realización del aclareo manual de racimos y por lo tanto sólo fue posible para esa variedad en ese año la vinificación de vinos procedentes de cepas control y de cepas tratadas con Pro-Ca.

**Tabla 5.4.** Efecto del aclareo manual de racimos y del tratamiento con Pro-Ca en los rendimientos de producción, en el peso de baya, en el tamaño de baya y en la relación sólido/líquido en las variedades estudiadas, Tempranillo y Garnacha.

	Producción (t/ha)	Peso baya (g)				Tamaño baya* (diámetro, mm)				% sólido/líquido (m/v)
		10-12	12-14	14-16	16-18	18-20				
<b>TEMPRANILLO</b>										
<b>2007</b>										
Control	7.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.02 <sup>b</sup>	54 ± 7 <sup>a</sup>	32 ± 7 <sup>b</sup>	8 ± 0 <sup>a</sup>	42.2 ± 2.4 <sup>b</sup>				
Aclareo manual	6.0 ± 0.1 <sup>c</sup>	2.13 ± 0.02 <sup>a</sup>	44 ± 3 <sup>b</sup>	50 ± 3 <sup>a</sup>	6 ± 1 <sup>a</sup>	59.7 ± 4.1 <sup>a</sup>				
Pro-Ca	6.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.01 <sup>c</sup>	57 ± 4 <sup>a</sup>	19 ± 2 <sup>c</sup>	3 ± 1 <sup>b</sup>	57.1 ± 4.3 <sup>a</sup>				
<b>2008</b>										
Control	7.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.27 ± 0.10 <sup>a</sup>	24 ± 6 <sup>a</sup>	59 ± 5 <sup>a</sup>	16 ± 7 <sup>a</sup>	58.4 ± 9.5 <sup>a</sup>				
Pro-Ca	7.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.31 ± 0.19 <sup>a</sup>	19 ± 4 <sup>a</sup>	52 ± 8 <sup>a</sup>	25 ± 4 <sup>a</sup>	52.6 ± 0.6 <sup>a</sup>				
<b>GARNACHA</b>										
<b>2007</b>										
Control	8.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	2.36 ± 0.02 <sup>a</sup>	31 ± 6 <sup>b</sup>	54 ± 5 <sup>a</sup>	16 ± 4 <sup>a</sup>	55.2 ± 1.3 <sup>a</sup>				
Aclareo manual	4.8 ± 0.0 <sup>c</sup>	2.36 ± 0.13 <sup>a</sup>	38 ± 7 <sup>b</sup>	51 ± 4 <sup>a</sup>	11 ± 3 <sup>b</sup>	53.1 ± 2.1 <sup>ab</sup>				
Pro-Ca	5.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.72 ± 0.05 <sup>b</sup>	64 ± 4 <sup>a</sup>	27 ± 5 <sup>b</sup>	6 ± 1 <sup>c</sup>	50.0 ± 2.5 <sup>b</sup>				
<b>2008</b>										
Control	8.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.99 ± 0.08 <sup>a</sup>	57 ± 2 <sup>c</sup>	38 ± 4 <sup>a</sup>	6 ± 2 <sup>a</sup>	73.4 ± 5.1 <sup>a</sup>				
Aclareo manual	4.5 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.86 ± 0.09 <sup>b</sup>	64 ± 2 <sup>b</sup>	32 ± 3 <sup>a</sup>	4 ± 2 <sup>ab</sup>	71.6 ± 5.1 <sup>a</sup>				
Pro-Ca	6.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.67 ± 0.06 <sup>c</sup>	74 ± 3 <sup>a</sup>	24 ± 4 <sup>b</sup>	2 ± 1 <sup>b</sup>	75.1 ± 4.6 <sup>a</sup>				

\* % de bayas de cada diámetro; <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes en la misma columna y año muestran diferencias significativas al 5 %.

La ausencia de diferencias significativas en el peso, tamaño y en la relación sólido/líquido entre las uvas Tempranillo control y las procedentes del tratamiento con Pro-Ca en el año 2008, podría haber sido debida a un pobre cuajado del fruto, mostrando las cepas control un comportamiento similar a las cepas tratadas químicamente. Este hecho fue debido posiblemente a las condiciones climáticas presentes durante la inducción floral, la cual tuvo lugar a primeros de Junio del año anterior. Este proceso es promovido por altas temperaturas y escasas precipitaciones que tuvieron lugar en el año 2006, mientras que en 2007 las condiciones climáticas no fueron tan favorables (mayor número de días lluviosos y húmedos).

### **5.3.3. Madurez Tecnológica**

Los resultados de la madurez tecnológica en las uvas se muestran en la **Tabla 5.5**. En 2007, la aplicación del aclareo manual proporcionó uvas con un mayor contenido en azúcares (°Brix), mientras que las uvas procedentes del tratamiento con Pro-Ca no mostraron diferencias significativas en comparación con las uvas control. En 2008 no hubo diferencias significativas respecto a los °Brix. En 2007, las uvas de la variedad Tempranillo procedentes del aclareo manual presentaron valores de pH inferiores que las control, mientras que las uvas de la variedad Garnacha procedentes de los tratamientos mostraron valores de pH superiores. Los valores de acidez total en 2007 fueron superiores en las uvas Tempranillo y en uvas Garnacha tratadas con Pro-Ca que en uvas procedentes del aclareo manual. En 2008 no hubo diferencias significativas ni en el pH ni en la acidez total. Las uvas procedentes del aclareo manual, en ambas variedades, mostraron los valores más bajos en contenido de ácido málico.

Entre años se observaron diferencias en la maduración de las uvas. En 2008, las uvas procedentes de ambas variedades presentaron mayores °Brix, menor acidez total y menor concentración de ácido málico ( $P < 0.05$ ). Esto pudo ser debido a las diferentes condiciones climáticas presentes durante el periodo de maduración. Las altas temperaturas y las bajas precipitaciones en Agosto de 2008 adelantaron la maduración, incrementando el contenido de azúcares y la degradación de los ácidos. En 2007, la gran cantidad de precipitaciones coincidentes con el último periodo de maduración (septiembre y octubre) propiciaron un menor contenido en azúcares.

En ambos años y variedades, los valores de lacasa fueron bajos, no observándose diferencias significativas entre muestras. Vail y Marois<sup>53</sup> encontraron una correlación significativa entre la compacidad del racimo y la susceptibilidad de podredumbre del racimo causada por *Botrytis cinerea*. La aplicación de Pro-Ca proporcionó bayas más pequeñas reduciéndose este efecto, como señalaron Vaquero-Fernández y col.<sup>42</sup>

**Tabla 5.5.** Efecto del aclareo manual de racimos y del tratamiento con Pro-Ca en la madurez tecnológica de uvas Tempranillo y Garnacha

	° Brix	pH	Acidez total (g/L) <sup>c</sup>	Ácido málico (g/l)	Lacasa <sup>d</sup>
<b>TEMPRANILLO</b>					
<b>2007</b>					
Control	22.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.53 ± 0.08 <sup>a</sup>	6.26 ± 1.07 <sup>b</sup>	2.43 ± 0.11 <sup>a</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
Aclareo manual	24.1 ± 0.4 <sup>a</sup>	3.41 ± 0.02 <sup>b</sup>	6.32 ± 1.29 <sup>b</sup>	2.19 ± 0.04 <sup>b</sup>	0.18 ± 0.26 <sup>a</sup>
Pro-Ca	23.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	3.38 ± 0.02 <sup>b</sup>	6.83 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.28 ± 0.05 <sup>ab</sup>	0.08 ± 0.05 <sup>a</sup>
<b>2008</b>					
Control	24.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	3.40 ± 0.05 <sup>a</sup>	4.14 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.16 <sup>b</sup>	0.00 ± 0.00 <sup>a</sup>
Pro-Ca	24.4 ± 1.1 <sup>a</sup>	3.34 ± 0.01 <sup>a</sup>	4.69 ± 0.37 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.18 ± 0.08 <sup>a</sup>
<b>GARNACHA</b>					
<b>2007</b>					
Control	20.60 ± 0.5 <sup>b</sup>	3.24 ± 0.02 <sup>b</sup>	6.78 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.03 <sup>a</sup>	3.43 ± 4.11 <sup>a</sup>
Aclareo manual	25.33 ± 0.8 <sup>a</sup>	3.29 ± 0.02 <sup>a</sup>	6.09 ± 0.24 <sup>b</sup>	1.15 ± 0.18 <sup>b</sup>	2.25 ± 1.94 <sup>a</sup>
Pro-Ca	20.83 ± 1.8 <sup>b</sup>	3.26 ± 0.03 <sup>ab</sup>	6.54 ± 0.16 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.23 <sup>a</sup>	0.25 ± 0.39 <sup>a</sup>
<b>2008</b>					
Control	25.54 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.26 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.56 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.71 ± 0.93 <sup>a</sup>
Aclareo manual	25.84 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.27 ± 0.02 <sup>a</sup>	5.40 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.91 ± 0.15 <sup>a</sup>
Pro-Ca	25.51 ± 0.7 <sup>a</sup>	3.25 ± 0.04 <sup>a</sup>	5.68 ± 0.38 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.29 ± 0.48 <sup>a</sup>

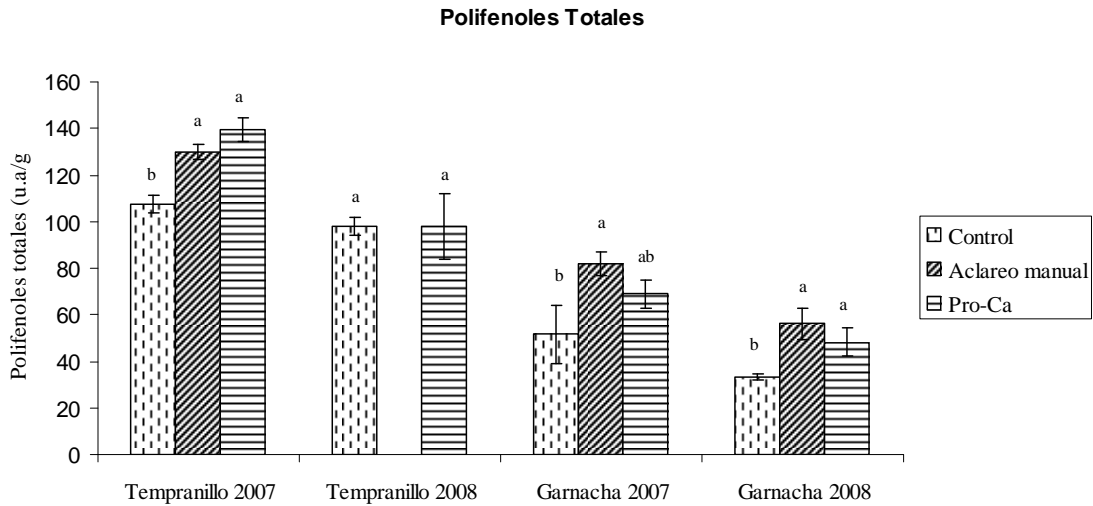
<sup>a,b</sup>Letras diferentes en la misma columna y año muestran diferencias significativas al 5 %.

<sup>c</sup>Expresado como g/L de ácido tartárico. <sup>d</sup>Expresado como nmol/L de lacasa.

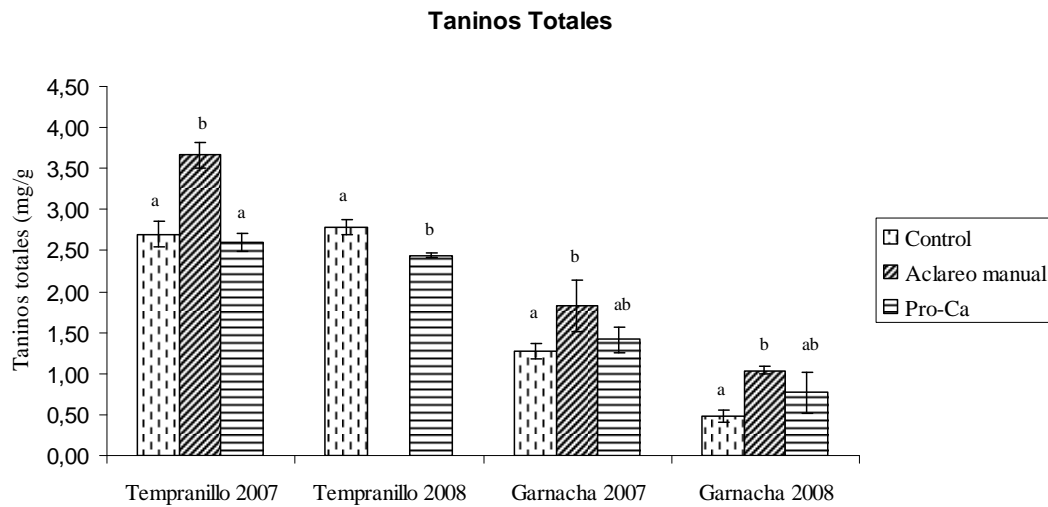
El adelanto de la maduración de la uva como resultado del aclareo manual ha sido descrito por diferentes autores en estudios realizados en diferentes variedades, tales como, Cabernet Sauvignon<sup>1</sup>, Shiraz<sup>54</sup>, Tempranillo<sup>55</sup> y Garnacha.<sup>56</sup> Los valores de °Brix, pH, acidez total y ácido málico de uvas procedentes del tratamiento con Pro-Ca no mostraron diferencias enológicas significativas respecto a las uvas control. Estos resultados coinciden con los mostrados en otros estudios publicados en esta línea de trabajo, en los cuales, la aplicación de Pro-Ca tampoco modificó estos parámetros.<sup>41,42,57</sup>

### 5.3.4. Madurez Fenólica

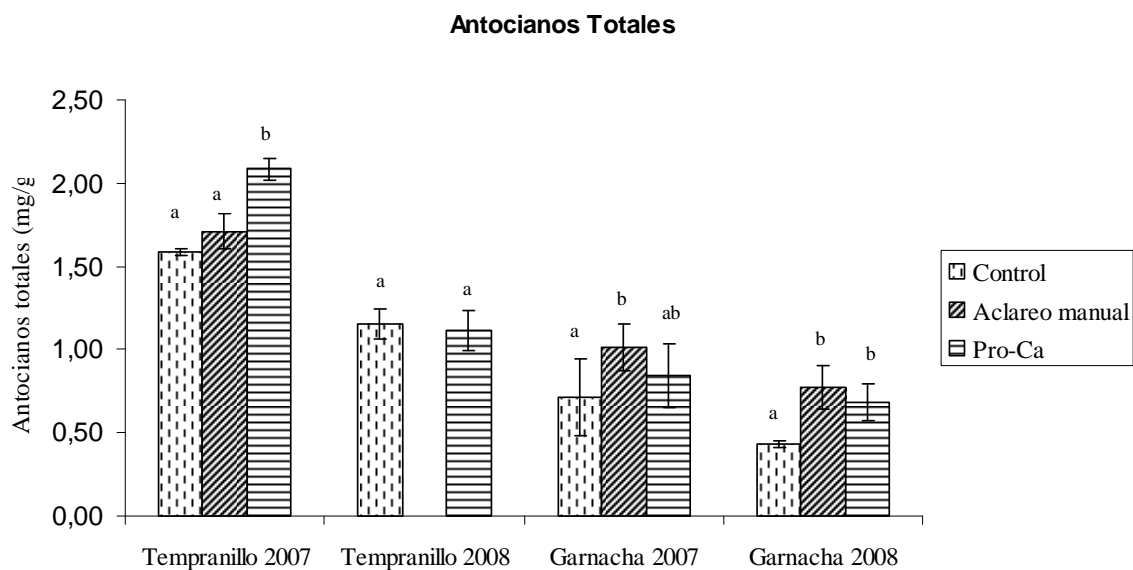
Como era esperado, el contenido polifenólico fue en ambos años superior en la variedad Tempranillo que en la variedad Garnacha (**Figuras 5.2, 5.3 y 5.4**). No obstante, casi todas las referencias coinciden en el hecho de que factores no genéticos, tales como, los factores edafoclimáticos o determinadas prácticas vitícolas tienen un efecto en el contenido polifenólico.<sup>58</sup> Esta influencia puede ser observada para cada variedad en los dos años de estudio, siendo el contenido polifenólico superior en las uvas del año 2007 con respecto a las del 2008.



**Figura 5.2.** Contenido en polifenoles totales en ambas variedades, años y tratamientos. Letras diferentes en la misma variedad y año, muestran diferencias significativas al 5 %.



**Figura 5.3.** Contenido en taninos totales en ambas variedades años y tratamientos. Letras diferentes en la misma variedad y año, muestran diferencias significativas al 5 %.



**Figura 5.4.** Contenido en antocianos totales en ambas variedades años y tratamientos. Letras diferentes en la misma variedad y año, muestran diferencias significativas al 5 %.

A pesar de estos resultados, sin embargo, no se han encontrado correlaciones entre las condiciones climáticas y el contenido en compuestos fenólicos en las uvas.

En relación al contenido de polifenoles totales (**Figura 5.2**), se puede observar que en ambas variedades los tratamientos llevados a cabo para reducir la producción, mostraron uvas con un mayor contenido polifenólico que las uvas control. Sin embargo, ambos tratamientos tuvieron un efecto diferente respecto al contenido en antocianos (**Figura 5.3**) y taninos (**Figura 5.4**). Las uvas Tempranillo procedentes del tratamiento de aclareo manual mostraron un contenido superior de taninos, mientras que las procedentes del tratamiento con Pro-Ca mostraron un mayor contenido de antocianos.

Los resultados respecto a la composición fenólica de la variedad Garnacha fueron muy similares a lo largo de las dos campañas (**Figuras 5.2, 5.3 y 5.4**). Las uvas procedentes de la aplicación del aclareo manual mostraron un mayor contenido en antocianos y taninos que las uvas control, mientras que las uvas procedentes del tratamiento con Pro-Ca no mostraron diferencias significativas ni con las uvas control ni con las uvas procedentes del aclareo manual, mostrando valores intermedios entre ambos.

Los resultados observados en ambas variedades y en ambos años revelaron que la aplicación de Pro-Ca no produce, en ningún caso, una disminución en la síntesis de compuestos polifenólicos. Resultados similares a los de la aplicación de Pro-Ca respecto al incremento del contenido polifenólico han sido observados mediante la realización del aclareo mecánico en la variedad Nebbiolo<sup>59</sup> y en la variedad Cabernet Franc.<sup>60</sup> Peña-Neira y col.<sup>61</sup> estudiaron los cambios en la composición fenólica de hollejos de uva de la variedad Syrah procedentes de cepas en las cuales se había realizado un aclareo manual en el envero. Estos autores encontraron un incremento de algunos derivados fenólicos relacionados con la estabilidad del color del vino, formados por medio de reacciones de copigmentación y polimerización.<sup>62</sup> La estabilidad del color del vino y una concentración elevada de polifenoles son dos de las características esenciales buscadas en un vino que va a experimentar un proceso de envejecimiento en barrica y botella, como es el caso de muchos vinos españoles elaborados con las variedades estudiadas en este trabajo.

### **5.3.5. Parámetros cromáticos**

Es sabido que la intensidad del color de los vinos disminuye a lo largo de su envejecimiento, con un incremento simultáneo de la luminosidad ( $L^*$ ) y una disminución de los tonos violetas ( $b^*$ ) y rojos ( $a^*$ ). Aunque las muestras evaluadas son mostos, estos resultados pueden dar una primera aproximación y resultar una herramienta útil en la predicción del color de los futuros vinos.

A partir del estudio de las coordenadas CIELab (**Tabla 5.6**) se observó como en el año 2007, la variedad Garnacha no mostró diferencias en el color entre los tratamientos realizados, pero es necesario decir que esta variedad tiene tendencia a la oxidación y en ese año, las muestras sufrieron una rápida oxidación lo cual se ve reflejado en los valores extremadamente altos que muestra la coordenada  $b^*$  en los tres casos. En el año 2007, en referencia a la variedad Tempranillo y en 2008, en ambas variedades, los mostos procedentes de cepas sometidas a ambos tratamientos de regulación de la producción (aclareo manual y químico) mostraron un menor valor de  $L^*$  y tonalidades más azules y rojas. Este incremento podría ser explicado debido a la

disminución significativa de la producción inducido por la aplicación de ambos tratamientos. En esta línea, otros estudios han mostrado que el color de los vinos tintos se ve reducido cuando el rendimiento es elevado<sup>63</sup>, mientras que rendimientos más bajos pueden incrementar el contenido de antocianos y polifenoles totales.<sup>59,60</sup> Diversos autores han demostrado también que la densidad del color del vino se ve incrementada como resultado de la realización del aclareo, bien sea manual o mecánico.<sup>1,54</sup>

**Tabla 5.6.** Parámetros cromáticos en los mostos de Tempranillo y Garnacha.

	<b>L*</b>	<b>a*</b>	<b>b*</b>	<b>IC</b>	<b>T</b>
<b>TEMPRANILLO</b>					
<b>2007</b>					
<i>Control</i>	58.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	33.8 ± 0.9 <sup>c</sup>	-5.9 ± 0.7 <sup>b</sup>	3.16 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.74 ± 0.02 <sup>a</sup>
Aclareo manual	54.1 ± 1.2 <sup>b</sup>	36.2 ± 1.1 <sup>b</sup>	-4.37 ± 1.1 <sup>a</sup>	3.61 ± 0.15 <sup>a</sup>	0.76 ± 0.00 <sup>a</sup>
Pro-Ca	48.4 ± 1.2 <sup>c</sup>	44.0 ± 0.7 <sup>a</sup>	-8.7 ± 1.8 <sup>c</sup>	3.83 ± 0.65 <sup>a</sup>	0.67 ± 0.04 <sup>b</sup>
<b>2008</b>					
<i>Control</i>	96.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	9.07 ± 0.7 <sup>a</sup>	-0.56 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.18 ± 0.45 <sup>b</sup>	0.79 ± 0.07 <sup>a</sup>
Pro-Ca	86.9 ± 2.0 <sup>b</sup>	10.55 ± 1.7 <sup>a</sup>	-2.89 ± 0.7 <sup>b</sup>	4.04 ± 0.64 <sup>a</sup>	0.77 ± 0.02 <sup>a</sup>
<b>GARNACHA</b>					
<b>2007</b>					
<i>Control</i>	76.3 ± 2.9 <sup>a</sup>	21.1 ± 1.2 <sup>a</sup>	3.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	1.83 ± 0.28 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.07 <sup>a</sup>
Aclareo manual	72.4 ± 4.2 <sup>a</sup>	21.6 ± 4.1 <sup>a</sup>	6.1 ± 2.9 <sup>a</sup>	2.15 ± 0.31 <sup>a</sup>	1.04 ± 0.09 <sup>a</sup>
Pro-Ca	75.3 ± 2.8 <sup>a</sup>	18.8 ± 2.5 <sup>a</sup>	5.2 ± 2.6 <sup>a</sup>	1.95 ± 0.20 <sup>a</sup>	1.11 ± 0.09 <sup>a</sup>
<b>2008</b>					
<i>Control</i>	94.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.56 ± 0.4 <sup>c</sup>	1.23 ± 0.2 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.08 ± 0.06 <sup>a</sup>
Aclareo manual	87.8 ± 0.8 <sup>c</sup>	6.14 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.98 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.86 ± 0.90 <sup>a</sup>	1.09 ± 0.04 <sup>a</sup>
Pro-Ca	92.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	4.98 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.22 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.81 ± 0.62 <sup>b</sup>	0.95 ± 0.01 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Letras diferentes en la misma columna y año muestran diferencias significativas al 5 %.

Respecto a la intensidad colorante (IC) y a la tonalidad, en el año 2007 no se observaron diferencias, pero en el año 2008, las uvas procedentes de ambos tratamientos mostraron mayor intensidad colorante y menor tonalidad que las uvas control.

### 5.3.6. Evolución de la fermentación alcohólica

En relación al proceso fermentativo, las **Figuras 5.5 y 5.6** muestran la evolución del contenido de azúcares para ambas variedades en 2007 y 2008, respectivamente. Las diferencias en la fermentación entre los mostos procedentes de cepas control y de los procedentes de ambos tratamientos (manual y químico) fueron solo observadas en el caso de la variedad Tempranillo en el año 2007. En las vinificaciones llevadas a cabo



con la variedad Tempranillo en el año 2007, los mostos control terminaron la fermentación tres días antes que los mostos procedentes de los tratamientos realizados con el fin de reducir la producción. No se observaron diferencias significativas en la evolución de la fermentación en ninguna de las variedades y tratamientos en el año 2008, salvo en los días intermedios de la fermentación en el que los mostos control fermentaron los azúcares más rápidamente que los mostos procedentes de los tratamientos realizados. La fermentación transcurrió de forma adecuada en ambos años en todas las vinificaciones realizadas, no observándose ni paradas ni ralentizaciones de la fermentación, siendo el contenido de azúcares reductores inferior a 5 g/L.

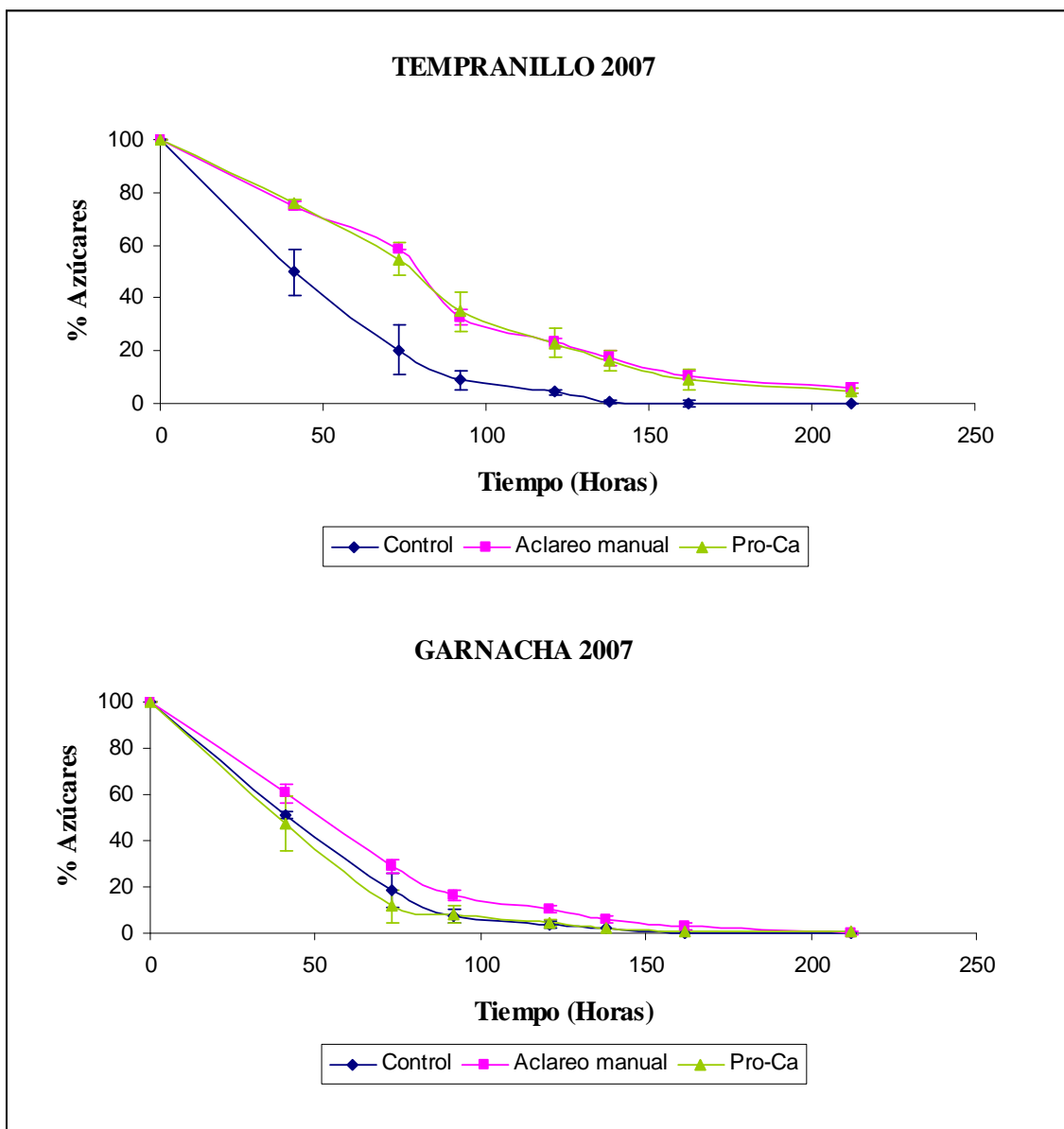


Figura 5.5. Evolución de la asimilación de azúcares durante la fermentación alcohólica de los mostos a estudio en el año 2007.

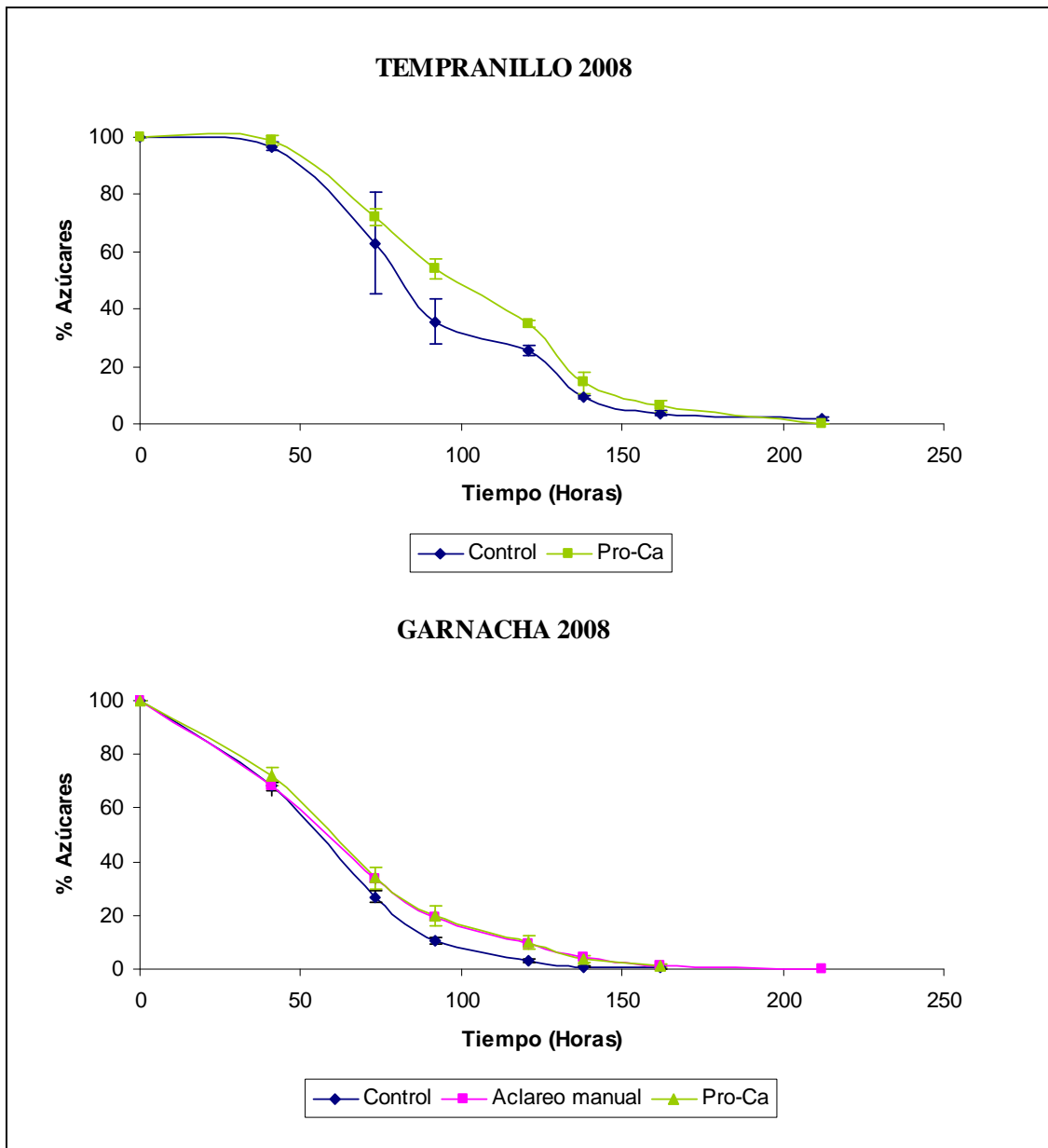


Figura 5.6. Evolución de la asimilación de azúcares durante la fermentación alcohólica de los mostos a estudio en el año 2008.

### 5.3.7. Parámetros enológicos de los vinos

Los resultados de los análisis enológicos convencionales de los vinos se muestran en la **Tabla 5.7**.

**Tabla 5.7.** Análisis enológicos convencionales de los vinos estudiados (media ± desviación estándar, n=3).

Muestras	Grado alcohólico (%)	Acidez total <sup>d</sup> (g/L)	pH	Acidez volátil <sup>e</sup> (g/L)	Ácido láctico (g/L)	Ácido málico (g/L)	IP <sup>T</sup>	Taninos totales (g/L)	Índice de etanol (%)	PPAs <sup>e</sup>
<b>Tempranillo</b>										
<b>2007</b>										
Control	13.7 ± 0.3 <sup>b</sup>	4.4 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	43.7 ± 1.2 <sup>b</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	91.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.4 <sup>b</sup>
Aclareo manual	14.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	4.8 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	49.1 ± 0.8 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	87.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.6 <sup>a</sup>
Pro-Ca	13.5 ± 0.4 <sup>b</sup>	5.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	3.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.0 <sup>ab</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	45.9 ± 1.6 <sup>ab</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>ab</sup>	86.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.3 <sup>a</sup>
<b>2008</b>										
Control	14.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	42.9 ± 2.6 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	88.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	5.8 ± 0.4 <sup>a</sup>
Pro-Ca	14.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	4.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>a</sup>	49.8 ± 2.0 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	84.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	6.1 ± 0.1 <sup>a</sup>
<b>Garnacha</b>										
<b>2007</b>										
Control	12.8 ± 0.9 <sup>b</sup>	5.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	19.6 ± 0.6 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	94.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>b</sup>
Aclareo manual	14.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	5.7 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	24.7 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>a</sup>	91.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.2 <sup>a</sup>
Pro-Ca	13.0 ± 0.9 <sup>b</sup>	6.8 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.1 <sup>b</sup>	22.5 ± 0.6 <sup>ab</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	90.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	2.6 ± 0.4 <sup>a</sup>
<b>2008</b>										
Control	14.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	26.9 ± 1.9 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	94.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.6 ± 0.7 <sup>a</sup>
Aclareo manual	14.9 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.0 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	39.8 ± 2.0 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	90.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.3 <sup>a</sup>
Pro-Ca	14.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	6.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	38.7 ± 1.4 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	90.8 ± 0.1 <sup>b</sup>	4.8 ± 0.4 <sup>a</sup>

<sup>ab,c</sup> Letras diferentes en la misma columna y año implican diferencias significativas al 5%. <sup>d</sup> expresado como g/L de ácido tartárico, <sup>e</sup> expresado como g/L de ácido acético, <sup>f</sup> índice de polifenoles totales, <sup>g</sup> proantocianidinas precipitables con proteínas, expresado como g/L de ácido tánico.

Se observó un aumento significativo en el contenido alcohólico de los vinos producidos a partir de cepas en las que se había realizado el aclareo manual en comparación con los vinos control para ambas variedades en el año 2007 y en Garnacha en 2008, mientras que el tratamiento con Pro-Ca produjo un contenido alcohólico similar al control. Cabe destacar que las diferencias en el contenido alcohólico de los vinos están relacionadas con las diferencias observadas en el contenido de °Brix medidos en las uvas (**Tabla 5.5**). En ambos años y variedades los valores de pH no mostraron diferencias significativas entre tratamientos y control, sin embargo el tratamiento con Pro-Ca produjo un aumento en la acidez total. En este caso, ni los valores de acidez total encontrados en las uvas (**Tabla 5.5**) ni el contenido en otros ácidos como el ácido málico y láctico en los vinos (**Tabla 5.7**) explican las diferencias encontradas. No obstante, los altos valores de acidez total de estos vinos pueden ser de particular interés en vinos tintos debido a una mejora en las características sensoriales en boca y en la estabilidad durante el envejecimiento.

Todos los vinos realizaron la fermentación maloláctica, como reflejan los valores de ácido láctico. La práctica del aclareo manual y la aplicación de Pro-Ca proporcionaron vinos con un mayor contenido en polifenoles totales (IPT) en ambas variedades, lo cual es consistente con un aumento en el contenido de taninos totales. En el tratamiento con Pro-Ca, una de las razones de este aumento es la reducción de la producción y del tamaño de baya. Estos resultados confirman lo observado en un estudio previo llevado a cabo en nuestro grupo de investigación<sup>42</sup>, en el cual, las cepas que habían sido tratadas con Pro-Ca presentaban un rendimiento inferior, con menor tamaño de bayas y los vinos mostraban una mayor concentración de polifenoles totales (IPT). Con respecto al índice de etanol, hubo diferencias significativas en ambos años y variedades, siendo inferior los valores observados en vinos procedentes de la aplicación de ambos tratamientos de aclareo, manual y químico. Respecto a las proantocianidinas precipitables con ovoalbúmina (PPAs), se apreciaron diferencias significativas en ambas variedades en el año 2007, con valores superiores en vinos procedentes del aclareo manual y de la aplicación con Pro-Ca. Sin embargo, en 2008 no se observaron diferencias significativas en este parámetro.

### **5.3.8. Color y composición antociánica de los vinos**

Los parámetros estudiados relacionados con el color y la composición antociánica de los vinos objeto de estudio se muestran en la **Tabla 5.8**. El tratamiento con Pro-Ca produjo un aumento en la intensidad colorante (IC) en comparación con los vinos control en ambas variedades, excepto en el caso del Tempranillo en el año 2008. El aclareo manual produjo en vinos de la variedad Garnacha un aumento en la intensidad colorante respecto al control, sin embargo, los vinos de Tempranillo procedentes de la realización del aclareo manual presentaron valores de intensidad colorante intermedios entre los encontrados para los vinos control y los encontrados respecto a la aplicación de Pro-Ca, con ausencia de diferencias significativas entre estos últimos vinos. Gil-Muñoz y col.<sup>64</sup> mostraron que el aclareo de racimos en el envero mejoraba la calidad de la uva y, en particular, los vinos de Syrah y de Tempranillo producidos a partir de la práctica en campo del aclareo de racimos, presentaban mejores características cromáticas que los vinos control. En esta misma línea, García-Escudero y col.<sup>7</sup> y Puertas y col.<sup>65</sup> observaron que el aclareo manual proporcionaba un aumento en el IPT y en la IC. El aumento en la IC en ambos años es consistente con un aumento en la concentración de antocianos totales, tanto en uvas (**Figura 5.4**) como en vinos (**Tabla 5.8**).

Los vinos procedentes de ambos tratamientos de aclareo presentaron una concentración de antocianos similar, siendo superior a los vinos control. Esta diferencia fue principalmente debida a la concentración de antocianos no-acilados, los cuales representaron, en ambas variedades, aproximadamente un 80 % de los antocianos totales. Sin embargo, es destacable que los tratamientos encaminados a reducir la producción proporcionaron un aumento en la concentración de piranoantocianos, observándose este hecho en ambos años en el caso de la variedad Tempranillo y en 2007 en Garnacha. Una mayor presencia de piranoantocianos implica una mayor estabilidad frente a reacciones de oxidación y decoloración en presencia de dióxido de azufre de los antocianos. Los piranoantocianos representaron entre el 0.5 y 2 % del total de antocianos en Tempranillo y entre el 6 y el 8.5 % en el caso de la variedad Garnacha.

Los vinos elaborados con la variedad Tempranillo no presentaron diferencias en antocianos cumarilados ni en antocianos condensados totales en ambos años, mientras que concentraciones superiores de antocianos acetilados, se encontraron en vinos procedentes de ambos tratamientos de aclareo en el año 2007.

En relación a los vinos elaborados con la variedad Garnacha, se determinaron valores superiores de antocianos cumarilados en vinos procedentes de ambos tratamientos, en los dos años de estudio, mostrando dichos vinos una concentración superior en antocianos condensados totales en el año 2008. Los vinos procedentes de la realización del aclareo manual presentaron contenidos superiores de antocianos acetilados en 2008. Algunos autores han anotado que las acciones encaminadas a la mejora de la relación área foliar/producción a través del aclareo manual de racimos proporcionan un mayor contenido en antocianos.<sup>5,66</sup>

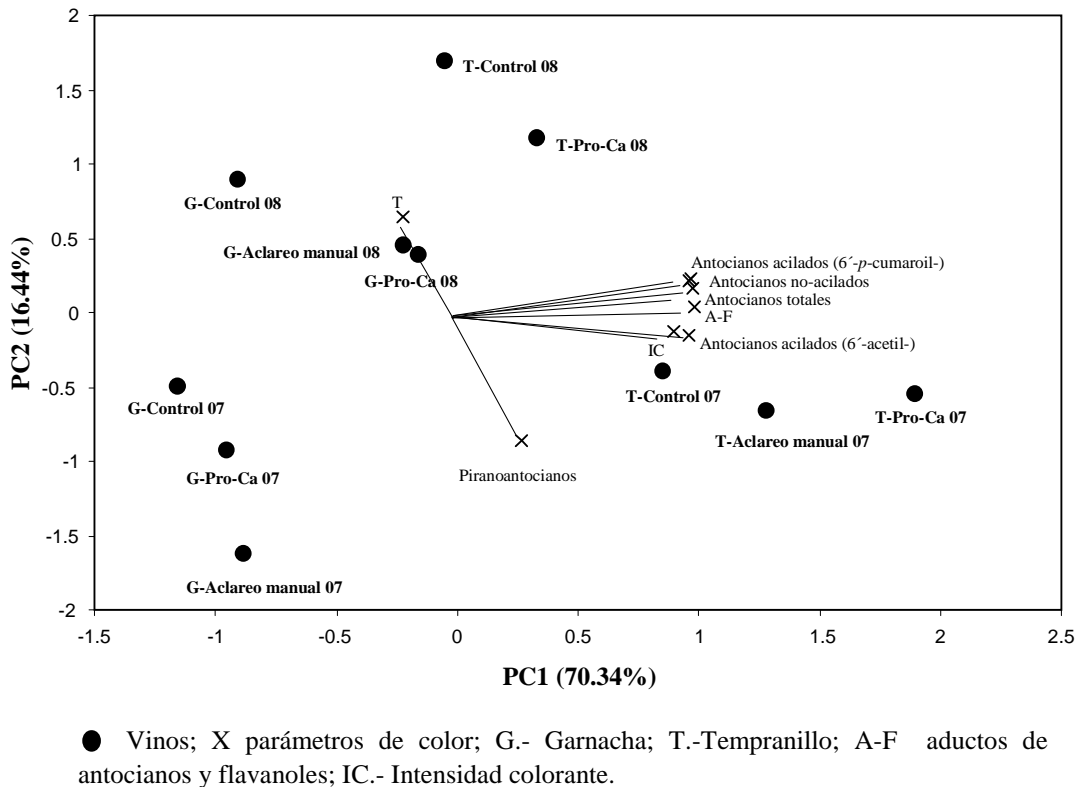
Por tanto, los resultados obtenidos muestran que no existió efecto de la variedad ni del año en los tratamientos en relación a la composición antociánica (**Tabla 5.8**), por lo que los tratamientos tuvieron un efecto similar en ambas variedades y años estudiados.

**Tabla 5.8.** Parámetros de color y concentración de antocianos (mg/L) de los vinos estudiados (media ± desviación estándar, n=3)

Muestras	IC	T	Antocianos totales	Antocianos no aciados	Antocianos aciados (6'-acetyl-)	Pirano-antocianos	Antocianos aciados (6'-p-cumaroyl-)	Antocianos condensados totales (A-F)
<b>Tempranillo</b>								
<b>2007</b>								
Control	10.4 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	92.8 ± 13.9 <sup>b</sup>	74.6 ± 12.3 <sup>b</sup>	7.3 ± 0.1 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.0 <sup>b</sup>	8.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>a</sup>
Aclareo manual	10.8 ± 1.0 <sup>ab</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	122.0 ± 9.9 <sup>a</sup>	99.3 ± 9.1 <sup>ab</sup>	10.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	8.4 ± 1.7 <sup>a</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>a</sup>
Pro-Ca	11.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	145.5 ± 17.4 <sup>a</sup>	118.8 ± 18.7 <sup>a</sup>	11.2 ± 1.4 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	11.3 ± 2.9 <sup>a</sup>	1.2 ± 0.6 <sup>a</sup>
<b>2008</b>								
Control	12.6 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	68.1 ± 12.4 <sup>b</sup>	57.5 ± 11.2 <sup>b</sup>	3.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	6.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>
Pro-Ca	13.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	88.7 ± 8.4 <sup>a</sup>	76.8 ± 7.3 <sup>a</sup>	3.7 ± 0.5 <sup>a</sup>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	7.3 ± 1.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.1 <sup>a</sup>
<b>Garnacha</b>								
<b>2007</b>								
Control	5.2 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	15.4 ± 0.0 <sup>b</sup>	12.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	nd
Aclareo manual	7.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	17.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	12.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	nd
Pro-Ca	7.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	17.4 ± 0.0 <sup>a</sup>	12.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup>	nd
<b>2008</b>								
Control	5.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	27.5 ± 3.7 <sup>b</sup>	23.4 ± 3.1 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	nd	2.6 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.1 <sup>c</sup>
Aclareo manual	7.4 ± 0.8 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	51.9 ± 4.5 <sup>a</sup>	44.5 ± 3.8 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	nd	4.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	0.3 ± 0.0 <sup>b</sup>
Pro-Ca	8.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	48.4 ± 7.7 <sup>a</sup>	42.0 ± 4.1 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>b</sup>	nd	4.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>
Interacción tratamiento × año	ns	ns	ns	ns	ns	0.013	ns	ns
Interacción tratamiento × variedad	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

<sup>ab,c</sup> Letras diferentes en la misma columna y año implican diferencias significativas al 5 %. ns. no significativo.

La **Figura 5.7** muestra la proyección de las muestras y las variables relacionadas con el color en las dos primeras componentes principales. La primera componente principal explica el 70.34 % de la varianza total y está positivamente caracterizada por la intensidad de color y todos los tipos de antocianos excepto los piranoantocianos.



**Figura 5.7.** Proyección de los 11 vinos y parámetros relacionados con el color en las dos primeras componentes principales.

La segunda componente explica el 16.44 % de la varianza total y está definida fundamentalmente por la tonalidad en el lado positivo y los piranoantocianos en el lado negativo. El PCA muestra como los vinos de Tempranillo se sitúan en la parte positiva de la primera componente principal, lo cual revela que estos vinos presentan mayor intensidad colorante y mayor contenido en antocianos que los vinos de Garnacha.

Respecto a la variedad Tempranillo, los vinos procedentes del tratamiento con Pro-Ca se sitúan siempre a la derecha de los vinos control, indicando que estos vinos presentan más color y mayor contenido antociánico que los vinos control. Los vinos obtenidos a partir del aclareo manual se localizan entre los vinos de Pro-Ca y los vinos control, por lo que estos vinos presentan características intermedias. En relación con la



segunda componente, los vinos procedentes de los tratamientos de aclareo son vinos con mayor concentración de piranoantocianos y una tonalidad inferior en comparación con los vinos control. De forma similar, en el caso de la variedad Garnacha, los vinos obtenidos a partir de la realización de ambos tratamientos de aclareo, se sitúan más a la derecha y más bajos que los vinos control, mostrando por tanto mayor intensidad colorante, una concentración mayor de todos los tipos de antocianos, piranoantocianos e inferior tonalidad. En 2007, los vinos de Garnacha procedentes del tratamiento con Pro-Ca estuvieron localizados entre los vinos control y los vinos procedentes de cepas en las cuales se había realizado el aclareo manual, sin embargo, en 2008, se da la situación opuesta aunque los vinos están situados muy próximos entre sí, lo que sugiere una alta similitud entre ellos. La mayor concentración en copigmentos encontrada en los vinos procedentes de ambos tratamientos de aclareo podría contribuir a un aumento en el color de los vinos mediante el efecto de la copigmentación.<sup>67</sup> Este resultado es consistente con Peña-Neira y col.<sup>61</sup> quienes estudiaron la composición fenólica de uvas Syrah en cepas que habían sido sometidas a un aclareo manual en el envero. Estos autores encontraron un aumento en algunos derivados fenólicos relacionados con la estabilidad del color del vino a través de reacciones de copigmentación y polimerización. También cabe destacar el aumento en la concentración de piranoantocianos (**Tabla 5.8**) observada en vinos producidos a partir de la realización del aclareo manual y químico, ya que estos compuestos juegan un papel relevante en la estabilización del color de vinos tintos debido a que la formación de estos compuestos reduce el aumento de tonos amarillos, como ya apuntaron Sáenz-Navajas y col.<sup>68</sup>

### **5.3.9. Composición fenólica de los vinos**

La **Tabla 5.9** muestra los resultados referentes a los análisis de distintos compuestos fenólicos no-coloreados en los vinos. Los vinos de Tempranillo presentaron una mayor concentración de estos compuestos fenólicos que los vinos de Garnacha. Este hecho fue observado en ambos años, excepto para la concentración de (Z)- ácido caftárico y para la quercetina-3-O-galactósido.

**Tabla 5.9.** Concentración de compuestos fenólicos (mg/L) en los vinos a estudio (media ± desviación estándar, n=3)

	Tempranillo 2007			Tempranillo 2008			Garnacha 2007			Garnacha 2008			Interacción "tratamiento × año"	Interacción "tratamiento × variedad"
	Control	A. manual	Pro-Ca	Control	Pro-Ca	Pro-Ca	Control	A. manual	Pro-Ca	Control	A. manual	Pro-Ca		
<b>Ácidos</b>														
Ácido gálico	47.9 ± 0.5 <sup>b</sup>	54.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	49.8 ± 0.4 <sup>b</sup>	41.7 ± 3.8 <sup>a</sup>	42.1 ± 5.1 <sup>a</sup>	11.3 ± 0.3 <sup>b</sup>	18.2 ± 0.2 <sup>a</sup>	7.61 ± 0.13 <sup>c</sup>	31.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	37.7 ± 7.4 <sup>a</sup>	37.8 ± 3.1 <sup>a</sup>	ns	ns	ns
<b>Ácidos hidroxicármicos</b>														
(Z)-ácido caftarico	nd	nd	nd	2.3 ± 0.2 <sup>a</sup>	2.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	nd	nd	nd	4.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	4.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.3 <sup>b</sup>	0.012	0.014	0.014
(E)-ácido caftarico	27.7 ± 0.6 <sup>b</sup>	32.1 ± 1.0 <sup>a</sup>	17.4 ± 0.3 <sup>c</sup>	15.9 ± 1.5 <sup>a</sup>	15.8 ± 4.5 <sup>a</sup>	30.3 ± 0.6 <sup>b</sup>	32.0 ± 0.9 <sup>a</sup>	30.5 ± 0.9 <sup>b</sup>	52.5 ± 1.4 <sup>a</sup>	53.6 ± 3.5 <sup>a</sup>	50.9 ± 5.0 <sup>b</sup>	ns	0.029	0.029
Ácido cafeico	2.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.4 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>c</sup>	1.11 ± 0.18 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.2 <sup>c</sup>	1.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.1 ± 0.3 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.0 ± 0.2 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	ns	ns	ns
Ácido cutárico	25.0 ± 1.3 <sup>b</sup>	28.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	14.1 ± 0.2 <sup>c</sup>	15.11 ± 3.6 <sup>b</sup>	14.7 ± 3.0 <sup>a</sup>	12.4 ± 0.3 <sup>b</sup>	14.2 ± 0.7 <sup>a</sup>	13.7 ± 0.7 <sup>b</sup>	16.0 ± 1.7 <sup>a</sup>	15.5 ± 1.1 <sup>a</sup>	15.8 ± 1.2 <sup>a</sup>	ns	0.029	0.029
Ácido cumárico	3.2 ± 0.6 <sup>b</sup>	4.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>c</sup>	1.45 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.64 ± 0.26 <sup>c</sup>	2.2 ± 0.4 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.7 <sup>b</sup>	2.1 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.1 ± 0.10 <sup>a</sup>	0.9 ± 0.2 <sup>b</sup>	ns	ns	ns
<b>Flavonoles</b>														
Catequina	33.0 ± 1.5 <sup>c</sup>	41.9 ± 0.4 <sup>b</sup>	44.6 ± 0.51 <sup>a</sup>	8.9 ± 1.2 <sup>a</sup>	8.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	10.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	19.0 ± 0.1 <sup>a</sup>	19.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	3.1 ± 1.6 <sup>b</sup>	12.6 ± 1.8 <sup>a</sup>	10.3 ± 2.2 <sup>a</sup>	ns	0.005	0.005
Epicatequina	27.9 ± 0.3 <sup>b</sup>	33.7 ± 1.3 <sup>a</sup>	31.8 ± 0.9 <sup>a</sup>	3.0 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	5.2 ± 0.6 <sup>b</sup>	5.3 ± 0.2 <sup>b</sup>	6.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	ns	ns	ns
Epigallocatequina	37.3 ± 0.9 <sup>b</sup>	40.3 ± 1.4 <sup>a</sup>	40.3 ± 0.5 <sup>a</sup>	8.3 ± 1.4 <sup>b</sup>	10.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	7.8 ± 0.0 <sup>b</sup>	11.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	8.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	9.9 ± 1.8 <sup>a</sup>	12.6 ± 2.5 <sup>a</sup>	12.3 ± 0.0 <sup>a</sup>	ns	ns	ns
Catequin-3-galato	22.3 ± 0.5 <sup>c</sup>	26.9 ± 1.6 <sup>b</sup>	28.5 ± 0.4 <sup>a</sup>	10.3 ± 1.8 <sup>a</sup>	12.6 ± 2.5 <sup>a</sup>	11.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	17.1 ± 0.3 <sup>a</sup>	17.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	12.1 ± 1.9 <sup>a</sup>	13.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	ns	ns	ns
Epicatequin-3-galato	48.5 ± 0.6 <sup>b</sup>	55.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	56.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	11.4 ± 1.1 <sup>b</sup>	14.8 ± 1.9 <sup>a</sup>	26.7 ± 1.2 <sup>c</sup>	57.9 ± 1.7 <sup>a</sup>	35.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	7.2 ± 1.8 <sup>b</sup>	10.2 ± 0.6 <sup>a</sup>	11.5 ± 1.6 <sup>a</sup>	ns	ns	ns
Epigallocatequin-3-galato	26.4 ± 0.10 <sup>b</sup>	31.8 ± 2.05 <sup>a</sup>	30.0 ± 0.5 <sup>a</sup>	5.8 ± 1.1 <sup>a</sup>	6.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	7.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	10.5 ± 0.6 <sup>a</sup>	7.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.5 ± 1.0 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	su	su	su
<b>Flavonoles</b>														
Miricetin-3-O-glucósido	4.2 ± 0.0 <sup>b</sup>	6.3 ± 0.3 <sup>a</sup>	6.0 ± 0.3 <sup>a</sup>	8.4 ± 1.8 <sup>a</sup>	9.5 ± 0.9 <sup>a</sup>	<LC <sup>a</sup>	<LC <sup>a</sup>	<LC <sup>a</sup>	1.1 ± 0.2 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.5 <sup>b</sup>	3.1 ± 0.2 <sup>a</sup>	ns	ns	ns
Quercetin-3-O-glucósido	1.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	2.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.4 ± 0.3 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.2 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	nd	2.7 ± 0.3 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.2 <sup>b</sup>	ns	ns	ns
Quercetin-3-O-galactósido	0.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>a</sup>	2.4 ± 0.4 <sup>a</sup>	2.6 ± 0.3 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	1.9 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.4 ± 0.6 <sup>a</sup>	3.3 ± 0.1 <sup>a</sup>	0.008	ns	ns
Quercetin-3-O-glucurónido	0.5 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.6 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.8 ± 0.1 <sup>a</sup>	3.5 ± 0.5 <sup>a</sup>	3.4 ± 0.9 <sup>a</sup>	<LC <sup>b</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	ns	ns	ns
Kaempferol-3-O-glucósido	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.8 ± 0.0 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	ns	0.011	0.011
Miricetina	0.7 ± 0.1 <sup>b</sup>	0.9 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.5 ± 0.1 <sup>a</sup>	1.6 ± 0.1 <sup>a</sup>	<LC <sup>a</sup>	<LC <sup>a</sup>	<LC <sup>a</sup>	2.0 ± 0.2 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.0 <sup>a</sup>	nd	0.000	0.000	0.000
Quercetina	0.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	0.5 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.0 ± 0.0 <sup>a</sup>	nd	nd	nd	<LC <sup>a</sup>	<LC <sup>a</sup>	nd	nd	nd	ns	ns	ns
Kaempferol	1.6 ± 0.0 <sup>a</sup>	1.3 ± 0.0 <sup>b</sup>	1.1 ± 0.0 <sup>b</sup>	nd	nd	<LC <sup>a</sup>	<LC <sup>a</sup>	<LC <sup>a</sup>	nd	nd	nd	ns	ns	ns

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes en la misma fila y año implican diferencias significativas al 5%; ns: no detectado; nd: no diferencias significativas; <LC, por debajo del límite de cuantificación (0.01 mg/L).

Tanto en Tempranillo como en Garnacha, la mayor concentración de ácidos fenólicos se obtuvo generalmente en vinos procedentes de cepas en las que se efectuó un aclareo manual. En general, los vinos procedentes del tratamiento con Pro-Ca presentaron concentraciones inferiores de los ácidos (*Z*)-caftárico, (*E*)-caftárico y ácido cúmarico, en relación con los vinos procedentes del aclareo manual. Puhl y col.<sup>17</sup> señalaron alteraciones en la composición flavonoidea y una reducción del contenido de ácidos hidroxicinámicos en uvas procedentes de cepas tratadas con el regulador de crecimiento Pro-Ca. Merece la pena destacar esta reducción en ácidos hidroxicinámicos, ya que la disminución de estos compuestos puede minimizar el riesgo de oxidación de los vinos<sup>69</sup> reduciéndose la síntesis de etilfenoles (defecto olfativo) por las levaduras *Brettanomyces*.<sup>70</sup> Con respecto a los flavanoles, los vinos de Tempranillo elaborados en el 2007 mostraron mayor concentración en estos compuestos que los vinos obtenidos en el 2008. Los tratamientos llevados a cabo para reducir la producción provocaron un aumento significativo en la concentración de todos los compuestos analizados en los vinos de la variedad Tempranillo en el año 2007. El tratamiento con Pro-Ca provocó un aumento en diversos compuestos como las catequinas (catequina y catequin-3-galato). En 2008 no se observaron diferencias significativas entre los vinos control y aquellos obtenidos a partir de la aplicación de Pro-Ca, excepto en la concentración de epigallocatequina y epicatequin-3-galato. Dichos compuestos presentaron una mayor concentración en vinos obtenidos a partir de cepas tratadas con Pro-Ca. De forma similar, en la variedad Garnacha, los vinos obtenidos a partir de cepas tratadas presentaron mayor contenido de diversos flavanoles que los vinos control en ambos años.

Respecto a los flavonoles, generalmente, los vinos de la variedad Tempranillo que presentaron una mayor concentración fueron los correspondientes al tratamiento con Pro-Ca. En 2008, los vinos de Tempranillo no se diferenciaron en concentración de los compuestos estudiados. Los vinos producidos en 2008 presentaron en general una mayor concentración en flavonoles que los vinos obtenidos en 2007. En los vinos de Garnacha, la mayor parte de los flavonoles determinados mostraron concentraciones inferiores a su límite de cuantificación (LC), excepto para los compuestos quercetina-3-O-glucósido y quercetina-3-O-glucurónido. El kaempferol no fue detectado en el año 2008 en ninguna de las variedades. Por el contrario, otros compuestos como la

miricetina-3-O-glucósido y la quercetina-3-O-glucósido mostraron concentraciones superiores en 2008.

Ambos tratamientos de aclareo proporcionaron vinos con concentraciones en flavonoles superiores a los vinos control. No se encontraron interacciones “tratamiento x año” ni “tratamiento x variedad” para los compuestos fenólicos estudiados, a excepción de los ácidos hidroxicinámicos, los cuales mostraron una interacción significativa “tratamiento x variedad” (**Tabla 5.9**).

En la bibliografía revisada se ha descrito que el aclareo manual produce un aumento tanto de los antocianos totales como de los compuestos fenólicos totales.<sup>71,72</sup> Fanzone y col.<sup>73</sup> observaron que las uvas de la variedad Malbec procedentes de cepas en las cuales se había realizado un aclareo manual, presentaban en general, una mayor concentración de compuestos fenólicos, mostrando por tanto un mayor potencial para la elaboración de vinos más complejos y de calidad. Estos autores demostraron que el aclareo manual favorecía la biosíntesis de antocianos individuales presentes en los hollejos (no acilados, acilados y antocianos totales), afectando también al contenido de flavanoles (catequina, epicatequin-3-galato) y flavonoles (quercetinas) de los hollejos y las semillas. Valdés y col.<sup>74</sup> también observaron un contenido de compuestos fenólicos notablemente superior en vinos de Tempranillo elaborados a partir de cepas aclareadas. Además del hecho de que una reducción del rendimiento de producción y del tamaño de baya produce un aumento de antocianos y flavonoides<sup>75</sup>, hay una segunda hipótesis y es que la utilización de Pro-Ca haya incrementado la síntesis de compuestos flavonoides en las uvas. Se ha demostrado que Pro-Ca afecta directamente a la ruta biosintética de antocianos y otros flavonoides. Esto es probablemente debido al rol de las enzimas dioxigenasas 2-oxo-glutarato-dependientes.<sup>15,76-78</sup> Debido a que la Pro-Ca es capaz de alterar el metabolismo de los flavonoides, se favorece la formación de unos compuestos identificados como 3-deoxicatequinas, los cuales están presentes en hojas jóvenes de manzanos<sup>13,15</sup>, perales<sup>14</sup> y en hojas y bayas de vid.<sup>16,17</sup>

### 5.3.10. Análisis sensorial

El test Dúo-Trío (**Tabla 5.10**) mostró que los vinos control fueron significativamente diferentes a un nivel del 5 % a los vinos procedentes de ambos tratamientos (aclareo manual y químico). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los vinos obtenidos a partir del tratamiento de aclareo manual y los obtenidos a partir de la aplicación de Pro-Ca. Estos resultados fueron corroborados en ambos años y variedades a excepción de la variedad Tempranillo en el año 2008, en el cual no se observaron diferencias.

**Tabla 5.10.** Resultados del Test Dúo-Trío

Test	Tempranillo				Garnacha			
	2007		2008		2007		2008	
	Correctas/ Respuestas totales	<i>P</i>	Correctas/ Respuestas totales	<i>P</i>	Correctas/ Respuestas totales	<i>P</i>	Correctas/ Respuestas totales	<i>P</i>
Control vs A. manual	26/30	<0.001	-	-	27/30	<0.001	28/32	<0.001
Control vs Pro-Ca	22/30	0.01	18/32	0.30	26/30	<0.001	37/32	<0.001
A.manual vs Pro-Ca	20/30	0.1	-	-	20/30	0.1	21/32	0.1

El ANOVA a dos factores aplicado a cada atributo con el fin de determinar la consistencia del panel mostró que el efecto juez fue significativo en todos los casos ( $P < 0.05$ ), de modo que los jueces parecen ser una fuente de variación para todos los atributos, lo que parece lógico ya que los panelistas poseen percepciones fisiológicas únicas. Se obtuvo una evaluación consistente de los atributos y la reproducibilidad del panel al no existir interacción vino-réplica. Además, de acuerdo con el ANOVA a un factor con medidas repetidas (jueces considerados como réplica) el efecto vino (tratamiento) fue significativo ( $P < 0.05$ ) para todos los atributos excepto para el dulzor ( $F = 6.324$ ;  $P = 0.092$ ) y el atributo balsámico ( $F = 3.248$ ,  $P = 0.142$ ). Este hecho indica que tanto el dulzor como el atributo balsámico no aportan diferencias sensoriales entre los vinos, por lo que estos términos no fueron considerados en el estudio. Las puntuaciones medias de los 14 atributos evaluados se muestran en la **Tabla 5.11**.

**Tabla 5.11.** Puntuaciones medias dadas por el panel sensorial en la evaluación de los aromas y de los atributos en boca de los vinos del estudio.

Vinos/ Tratamientos (n = 60)	AROMA										SABOR Y SENSACIONES EN BOCA					
	Fruitas blancas y amarillas	Fruitas rojas y negras	Floral	Especiado	Alcohólico	Herbáceo	Láctico	Intensidad aromática	Acidez	Amargor	Astringencia	Volumen en boca	Intensidad retrorenal	Persistencia		
<b>Tempranillo</b>																
Control	1.79 ± 0.06 <sup>c</sup>	2.52 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.30 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.89 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.87 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.12 ± 0.06 <sup>c</sup>	2.30 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.70 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.93 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.00 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.37 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.12 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.52 ± 0.06 <sup>b</sup>		
Aclareo manual	2.06 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.48 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.04 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.14 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.42 ± 0.05 <sup>b</sup>	2.86 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.44 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.46 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.67 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.23 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.85 ± 0.06 <sup>a</sup>		
2007																
Pro-Ca	2.46 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.67 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.68 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.89 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.69 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.81 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.59 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.32 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.64 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.70 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.35 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.85 ± 0.08 <sup>a</sup>		
Tratamiento	0.003	ns	0.010	0.030	ns	0.030	0.010	0.050	ns	0.001	0.002	ns	ns	0.020		
Control	2.03 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.43 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.97 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.26 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.63 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.54 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.46 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.77 ± 0.07 <sup>b</sup>	2.49 ± 0.07 <sup>b</sup>		
2008																
Pro-Ca	1.91 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.49 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.74 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.61 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.71 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.57 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.40 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.37 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.49 ± 0.05 <sup>a</sup>	3.00 ± 0.06 <sup>a</sup>		
Tratamiento	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	0.002	0.005		
<b>Garnacha</b>																
Control	1.85 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.85 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.31 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.92 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.00 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.88 ± 0.04 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.73 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.44 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.36 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.15 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.04 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.06 <sup>b</sup>		
Aclareo manual	2.19 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.19 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.23 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.08 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.37 ± 0.05 <sup>a</sup>	2.14 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.64 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.48 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.78 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.31 ± 0.04 <sup>b</sup>	2.48 ± 0.05 <sup>a</sup>		
2007																
Pro-Ca	2.31 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.31 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.96 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.52 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.28 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.46 ± 0.07 <sup>a</sup>	0.92 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.19 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.52 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.56 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.37 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.27 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.62 ± 0.05 <sup>b</sup>		
Tratamiento	0.020	0.001	ns	ns	0.004	ns	ns	ns	0.040	ns	ns	0.010	ns	0.005		
Control	3.26 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.86 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.57 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.43 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.83 ± 0.12 <sup>a</sup>	1.66 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.06 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.51 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.29 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.06 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.80 ± 0.08 <sup>a</sup>		
Aclareo manual	2.37 ± 0.09 <sup>b</sup>	2.95 ± 0.11 <sup>a</sup>	1.03 ± 0.05 <sup>b</sup>	1.20 ± 0.06 <sup>a</sup>	1.51 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.13 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.63 ± 0.06 <sup>a</sup>	2.54 ± 0.10 <sup>a</sup>	2.26 ± 0.09 <sup>a</sup>	2.11 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.82 ± 0.07 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.79 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.65 ± 0.07 <sup>a</sup>		
2008																
Pro-Ca	2.94 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.20 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.80 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.26 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.09 <sup>a</sup>	1.46 ± 0.06 <sup>a</sup>	3.00 ± 0.12 <sup>a</sup>	2.46 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.97 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.03 ± 0.10 <sup>a</sup>	1.90 ± 0.08 <sup>a</sup>	2.60 ± 0.07 <sup>a</sup>		
Tratamiento	0.030	0.002	0.005	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		

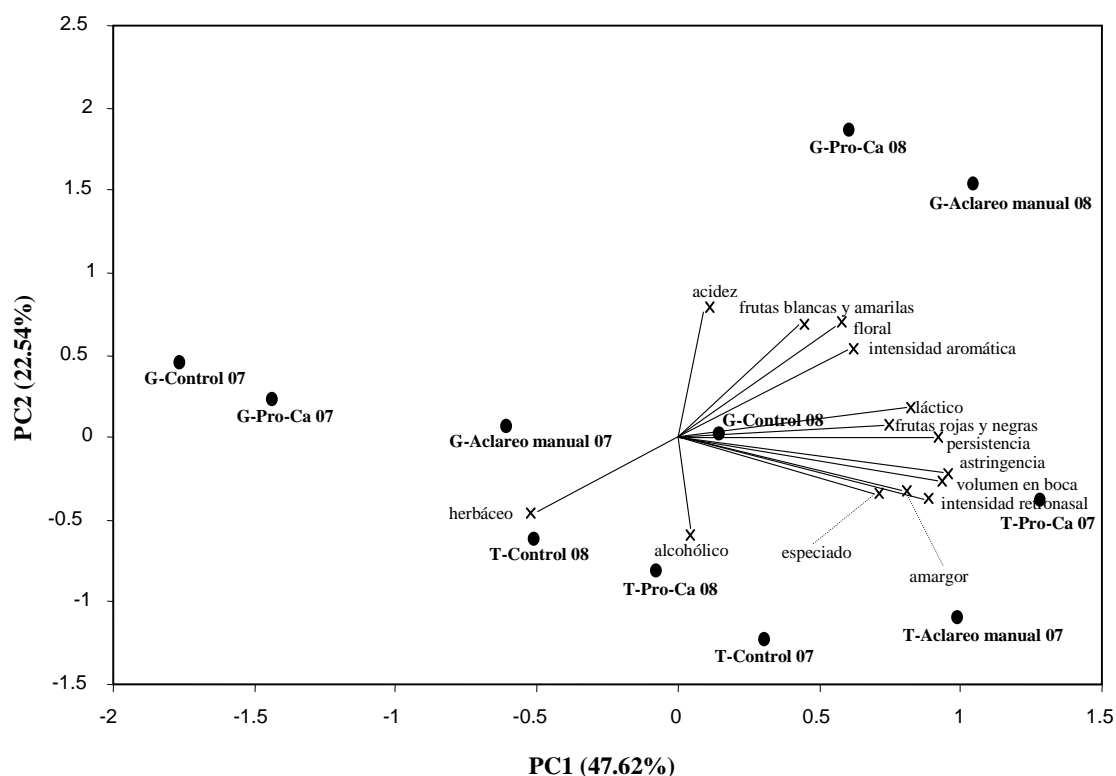
Análisis de la varianza. Valores *P* por tratamientos (n = 30 jueces × 1 vino/tratamiento × 2 reps/vino). Valores medios entre columnas fueron diferenciados significativamente mediante el Test de Fisher (*P* = 0.05); <sup>a, b, c</sup> indican diferencias significativas; ns: no diferencias significativas

El ANOVA a un factor aplicado a cada atributo mostró que los vinos de Tempranillo obtenidos a partir de los tratamientos de aclareo (manual y químico) mostraron puntuaciones significativamente superiores en el año 2007 a las del control en atributos aromáticos como: frutas blancas y amarillas, floral, láctico y especiado y puntuaciones inferiores en el atributo herbáceo. Además, los vinos procedentes de cepas sometidas a un aclareo manual fueron evaluados con aromas más frutales (frutas blancas y amarillas) y más lácteos que los vinos procedentes de la aplicación de Pro-Ca. En 2008 no se observaron diferencias entre los vinos control y los procedentes del tratamiento con Pro-Ca. En relación a los atributos en boca, en 2007, los vinos de Tempranillo procedentes de ambos tratamientos de aclareo recibieron mayores puntuaciones en amargor, astringencia y persistencia en comparación con el control. En 2008, estas diferencias desaparecieron y sólo se apreciaron diferencias en la intensidad retronasal y en la persistencia, siendo los vinos procedentes de cepas tratadas con Pro-Ca los que fueron percibidos más persistentes y más intensos por vía retronasal.

Los vinos de Garnacha de 2007 obtenidos a partir de ambos tratamientos, aclareo manual y químico, también mostraron diferencias respecto al control. Estas diferencias fueron percibidas en los términos frutas rojas y negras, frutas blancas y amarillas y alcohólico. En 2008, los vinos control y los procedentes del tratamiento con Pro-Ca fueron percibidos más frutales (frutas blancas y amarillas) y más florales que los vinos elaborados a partir de cepas en las que se efectuó un aclareo manual. Por el contrario, estos últimos fueron descritos con más notas de frutas rojas y negras que los otros dos vinos. Estos resultados son consistentes con Di Profio y col.<sup>79</sup> quienes mostraron que las prácticas vitícolas como el aclareo manual de racimos incrementan la intensidad de diversos descriptores aromáticos y retronasales (ej. fruta negra y pimienta negra). De forma similar, Naor y col.<sup>80</sup> y Roberts y col.<sup>81</sup> observaron un aumento en aromas frutales y florales en vinos elaborados con Sauvignon Blanc y Chardonnay Musqué, procedentes de cepas en las cuales se había llevado a cabo un aclareo manual de racimos. Respecto al sabor y a la astringencia, en el 2007, los vinos procedentes de cepas en las que se realizó un aclareo manual fueron evaluados más persistentes y presentaron mayor volumen en boca y acidez que los vinos control y los vinos obtenidos a partir de la aplicación de la Pro-Ca. Sin embargo, en 2008, los vinos fueron descritos en boca de forma similar, sin percibirse diferencias significativas entre ellos.

Diago y col.<sup>56</sup> han observado una mayor astringencia en vinos obtenidos a partir de cepas en las que ha sido realizado un aclareo manual de racimos. Recientemente, Sáenz-Navajas y col.<sup>82</sup> han indicado que la percepción sensorial en boca de los vinos tintos viene principalmente dada por la percepción de la astringencia y por los compuestos químicos que la producen. La mayor concentración de compuestos fenólicos encontrada en los vinos obtenidos a partir de ambos tratamientos de aclareo es por tanto consistente con la mayor puntuación dada a los atributos en boca en estos vinos. Este hecho podría reportar un aumento en la calidad de los vinos ya que Sáenz-Navajas y col.<sup>83</sup> han encontrado que tanto la astringencia como la persistencia son importantes atributos que están relacionados con la calidad percibida en los vinos.

En la **Figura 5.8** se muestran las proyecciones de los vinos y los descriptores sensoriales evaluados en el plano bi-dimensional correspondiente al PCA realizado.



**Figura 5.8.** Proyección de los 11 vinos y los atributos sensoriales en las dos primeras componentes principales del PCA. ● Vinos; X atributos sensoriales; G.- Garnacha; T.- Tempranillo.



Las dos primeras componentes principales explican más del 70.16 % de la varianza total. La primera componente explica el 47.62 % de la varianza total y está principalmente caracterizada por la persistencia, volumen en boca, astringencia e intensidad retronasal en el lado positivo y aromas herbáceos en el lado negativo. La segunda componente principal explica el 22.54 % de la varianza total y está caracterizada positivamente por la acidez y por aromas de frutas blancas y amarillas y negativamente con el atributo alcohólico.

La matriz de correlación mostró que el volumen en boca está positivamente correlacionado con la astringencia (93 %), persistencia (92 %), intensidad retronasal (89 %) y amargor (81 %), y también positivamente correlacionado con los atributos aromáticos frutas rojas y negras (79 %), lácticos (75 %) y especiados (67 %).

La persistencia está positivamente correlacionada con la astringencia (83 %), con la intensidad retronasal (74 %), con el amargor (67 %) y con la intensidad aromática así como con aromas a frutas rojas y negras (79 %) y aromas lácticos (72 %).

Cabe destacar que la intensidad aromática muestra correlación con notas florales (78 %), frutas blancas y amarillas (72 %), frutas rojas y negras (65 %) y atributos en boca como persistencia (60 %) y acidez (60 %). Por otra parte, la intensidad retronasal, además de las correlaciones observadas con atributos aromáticos como especiado (83 %) y lácticos (72 %), está también correlacionada con sabores y percepciones en boca, tales como la astringencia (93 %), el amargor (82 %) y el volumen en boca (89 %).

De forma similar en ambos años y variedades, los vinos procedentes del aclareo tanto manual como químico se sitúan a la derecha de los vinos control, con puntuaciones mayores en la primera componente. Estos resultados sugieren que los vinos obtenidos a partir de las dos técnicas de aclareo son mejor evaluados en boca y en aroma, atribuyéndoles menos notas herbáceas que a los vinos control. En varios trabajos enfocados al estudio del aclareo manual de racimos se ha observado que los vinos obtenidos son mejor evaluados organolépticamente.<sup>39,42,84-86</sup> Diago y col.<sup>56</sup> han observado que los vinos Tempranillo procedentes de tratamientos de aclareo son puntuados con

menores notas herbáceas que los vinos control. Esta es una cuestión importante de acuerdo con lo señalado por Sáenz-Navajas y col.<sup>82</sup> ya que la calidad percibida es inversamente proporcional a las notas herbáceas y vegetales percibidas en los vinos. En relación a los tratamientos estudiados, se observa la diferente influencia que ejerce la variedad. Los vinos de la variedad Tempranillo mejor evaluados sensorialmente en boca fueron aquellos procedentes del tratamiento con Pro-Ca, mientras que en la variedad Garnacha los vinos mejores evaluados en boca fueron los procedentes de cepas en las que se había realizado un aclareo manual de racimos.

Finalmente, es destacable que la disminución en el porcentaje de taninos unidos a polisacáridos (índice de etanol) en vinos procedentes de cepas a las que se aplicó tratamientos (aclareo manual y químico), en ambas variedades y años, estuvo correlacionado ( $F = 30.14, P = 0.005$ ;  $F = 28.47, P = 0.013$ ) con el aumento en la astringencia.

## **5.4. CONCLUSIONES**

La aplicación de Pro-Ca en prefloración produjo una reducción de la producción y del tamaño de bayas en ambas variedades. En todos los casos los mostos fermentaron correctamente, sin observarse paradas ni ralentizaciones.

El contenido total de polifenoles no se vio disminuido por la aplicación del regulador de crecimiento, por el contrario, el contenido de polifenoles en ambas variedades fue mayor en uvas procedentes de cepas en las que realizaron ambos tratamientos (aclareo manual y químico) que en cepas control. La aplicación de este regulador de crecimiento parece tener impacto en la composición antociánica de las uvas, la cuál fue similar a la concentración encontrada en las uvas de las cepas sometidas al aclareo manual.

Ambas técnicas de aclareo estudiadas dieron lugar a mostos con mayor capa, mayor tonalidad roja (aclareo manual) y mayor tonalidad azul (aclareo químico) que los mostos testigo.

Los vinos obtenidos a partir de cepas tratadas con Pro-Ca presentaron una mayor concentración de diversos flavanoles y flavonoles y una menor acumulación de diversos ácidos hidroxicinámicos que los vinos procedentes del aclareo manual de racimos en ambas variedades estudiadas.

La aplicación en prefloración de la Pro-Ca y el aclareo manual de racimos modificaron los atributos sensoriales de los vinos obtenidos. El tratamiento con Pro-Ca puede ser considerado como una alternativa al aclareo manual. La aplicación de la Pro-Ca puede ser usado como una nueva herramienta para controlar la producción y para aumentar la calidad de los vinos, en ambas variedades estudiadas.

## 5.5. REFERENCIAS

- (1) Petrie, P.R.; Clingeleffer, P.R. Crop thinning (hand versus mechanical), grape maturity and anthocyanin concentration: Outcomes from irrigated Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L.) in a warm climate. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2006**, *12*, 21-29.
- (2) Garcia-Escudero, E.; López, R.; Santamaría, P.; Zaballa, O. Control de rendimiento en viñedos conducidos en régimen de riego localizado. *Viticultura y Enología Profesional* **2000**, *69*, 12-23.
- (3) Tardaguila, J.; Bertamini, M. Canopy management o gestión del follaje: una potente técnica para mejorar la producción y la calidad de la uva. *Viticultura y Enología Profesional* **1993**, *28*, 31-46.
- (4) Bubola, M.; Peršuric, D.; Ganic, K.K. Impact of cluster thinning on productive characteristics and wine phenolic composition of cv. Merlot. *Journal of Food, Agriculture and Environment* **2011**, *9*, 36-39.
- (5) Jackson, D.I.; Lombard, P.B. Environmental and management-practices affecting grape composition and wine quality - A review. *American Journal of Enology and Viticulture* **1993**, *44*, 409-430.
- (6) Filippetti, I.; Ramazzotti, S.; Centinari, M.; Bucchetti, B.; Intrieri, C. Effects of cluster thinning on grape composition: Preliminary experiences on 'Sangiovese' grapevines. *Acta Horticulturae* **2007**, *754*, 227-234.
- (7) García-Escudero, E.; Villar, M.; Garcia-Oliveras, C.; Ibáñez, S.; Romero, L. Influencia del aclareo de racimos en el rendimiento y calidad del vino en las variedades tintas de la D.O.Ca. Rioja. IV World Wine Forum, Logroño, Spain. **2004**.
- (8) Martínez de Toda, F.; Tardáguila, J. Meccanizzazione e fabbisogni di manodopera dei diversi sistemi di allevamento. , In *Forme di allevamento della vite e modalità di distribuzione dei fitofarmaci*, Balsari, P. and Scienza, A., Eds.; Bayer CropScience: Milán, Italia, **2003**; pp. 143-158.
- (9) Kang, S.M.; Kim, J.T.; Hamayun, M.; Hwang, I.C.; Khan, A.L.; Kim, Y.H.; Lee, J.H.; Lee, I.J. Influence of prohexadione-calcium on growth and gibberellins content of Chinese cabbage grown in alpine region of South Korea. *Scientia Horticulturae* **2010**, *125*, 88-92.
- (10) Costa, G.; Andreotti, C.; Spinelli, F.; Rademacher, W. Prohexadione-Ca: More than a growth regulator for pome fruit trees. *Acta Horticulturae* **2006**, *727*, 107-116.
- (11) Rademacher, W. Growth retardants: Effects on gibberellin biosynthesis and other metabolic pathways. *Annual Review of Plant Biology* **2000**, *51*, 501-531.

- (12) Owens, C.L.; Stover, E. Vegetative growth and flowering of young apple trees in response to prohexadione-calcium. *HortScience* **1999**, *34*, 1194-1196.
- (13) Römmelt, S.; Treutter, D.; Speakman, J.B.; Rademacher, W. Effects of prohexadione-Ca on the flavonoid metabolism of apple with respect to plant resistance against fire blight. *Acta Horticulturae* **1999**, *489*, 359-364.
- (14) Römmelt, S.; Fischer, T.C.; Halbwirth, H.; Peterek, S.; Schlangen, K.; Speakman, J.B.; Treutter, D.; Forkmann, G.; Stich, K. Effect of dioxygenase inhibitors on the resistance-related flavonoid metabolism of apple and pears: Chemical, biochemical and molecular biological aspects. *European Journal of Horticultural Science* **2003**, *68*, 129-136.
- (15) Römmelt, S.; Zimmermann, N.; Rademacher, W.; Treutter, D. Formation of novel flavonoids in apple (*Malus × domestica*) treated with the 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 709-716.
- (16) Gosch, C.; Puhl, I.; Halbwirth, H.; Schlangen, K.; Roemmelt, S.; Andreotti, C.; Costa, G.; Fischer, T.C.; Treutter, D.; Stich, K.; Forkmann, G. Effect of prohexadione-Ca on various fruit crops: Flavonoid composition and substrate specificity of their dihydroflavonol 4-reductases. *European Journal of Horticultural Science* **2003**, *68*, 144-151.
- (17) Puhl, I.; Stadler, F.; Treutter, D. Alterations of flavonoid biosynthesis in young grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves, flowers, and berries induced by the dioxygenase inhibitor prohexadione-Ca. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2008**, *56*, 2498-2504.
- (18) Ruehmann, S.; Treutter, D. Effect of N-nutrition in apple on the response of its secondary metabolism to prohexadione-Ca treatment. *European Journal of Horticultural Science* **2003**, *68*, 152-159.
- (19) Fischer, T.C.; Halbwirth, H.; Roemmelt, S.; Sabatini, E.; Schlangen, K.; Andreotti, C.; Spinelli, F.; Costa, G.; Forkmann, G.; Treutter, D.; Stich, K. Induction of polyphenol gene expression in apple (*Malus x domestica*) after the application of a dioxygenase inhibitor. *Physiology Plantarum* **2006**, *128*, 604-617.
- (20) Yoder, K.S.; Miller, S.S.; Byers, R.E. Suppression of fireblight in apple shoots by prohexadione-calcium following experimental and natural inoculation. *HortScience* **1999**, *34*, 1202-1204.
- (21) McGrath, M.J.; Koczan, J.M.; Kennelly, M.M.; Sundin, G.W. Evidence that prohexadione-calcium induces structural resistance to fire blight infection. *Phytopathology* **2009**, *99*, 591-596.
- (22) Costa, G.; Andreotti, C.; Bucchi, F.; Sabatini, E.; Bazzi, C.; Malaguti, S.; Rademacher, W. Prohexadione-Ca (Apogee®): Growth regulation and reduced fire blight incidence in pear. *HortScience* **2001**, *36*, 931-933.

- (23) Scalbert, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 3875-3883.
- (24) Yamamoto, M.; Nakatsuka, S.; Otani, H.; Kohmoto, K.; Nishimura, S. (+)-Catechin acts as an infection-inhibiting factor in strawberry leaf. *Phytopathology* **2000**, *90*, 595-600.
- (25) Del Río, J.A.; Báidez, A.G.; Botía, J.M.; Ortuño, A. Enhancement of phenolic compounds in olive plants (*Olea europaea* L.) and their influence on resistance against *Phytophthora* sp. *Food Chemistry* **2003**, *83*, 75-78.
- (26) Parvez, M.M.; Tomita-Yokotani, K.; Fujii, Y.; Konishi, T.; Iwashina, T. Effects of quercetin and its seven derivatives on the growth of *Arabidopsis thaliana* and *Neurospora crassa*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2004**, *32*, 631-635.
- (27) Weber, B.; Hoesch, L.; Rast, D.M. Protocatechualdehyde and other phenols as cell wall components of grapevine leaves. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 433-437.
- (28) Feucht, W.; Treutter, D.; Schwalb, P. Principles of barrier formation of scab-infected apple fruits. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **1998**, *105*, 394-403.
- (29) Feucht, W.; Treutter, D. The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defence. In *Principles and Practices in Plant Ecology*, Inderjit, D., Foy C. L., Ed.; CRC Press: Boca Raton: FL, USA, **1999**; pp. 307-338.
- (30) Schwalb, P.; Feucht, W. Affinity of flavanols to cell walls: Changes after wounding, infection, lignification, and suberization. *Journal of Applied Botany* **1998**, *72*, 157-161.
- (31) Rademacher, W.; Kober, R. Efficient use of prohexadione-Ca in pome fruits. *European Journal of Horticultural Science* **2003**, *68*, 101-107.
- (32) Winkler, V.W. Reduced risk concept for prohexadione-calcium, a vegetative growth control plant growth regulator in apples. *Acta Horticulturae* **1997**, *451*, 667-671.
- (33) Ilias, I.F.; Rajapakse, N. Prohexadione-calcium affects growth and flowering of petunia and impatiens grown under photoselective films. *Scientia Horticulturae* **2005**, *106*, 190-202.
- (34) Evans, J.R.; Evans, R.R.; Regusci, C.L.; Rademacher, W. Mode of action, metabolism, and uptake of BAS 125W, prohexadione-calcium. *HortScience* **1999**, *34*, 1200-1201.
- (35) Miller, S.S.; Tworkowski, T. Regulating vegetative growth in deciduous fruit trees. *Quarterly Reports on Plant Growth Regulation Society of America* **2003**, *31*, 8-46.
- (36) Basak, A.; Rademacher, W. Growth regulation of pome and stone fruit trees by use of prohexanedione-CA. *Acta Horticulturae* **2000**, *514*, 41-50.

- (37) Bazzi, C.; Messina, C.; Tortoreto, L.; Stefani, E.; Bini, F.; Brunelli, A.; Andreotti, C.; Sabatini, E.; Spinelli, F.; Costa, G.; Hauptmann, S.; Stammeler, G.; Doerr, S.; Marr, J.; Rademacher, W. Control of pathogen incidence in pome fruits and other horticultural crop plants with prohexadione-Ca. *European Journal of Horticultural Science* **2003**, *68*, 108-114.
- (38) Smit, M.; Meintjes, J.J.; Jacobs, G.; Stassen, P.J.C.; Theron, K.I. Shoot growth control of pear trees (*Pyrus communis* L.) with prohexadione-calcium. *Scientia Horticulturae* **2005**, *106*, 515-529.
- (39) Disegna, E.; Disegna, E.; Boido, E.; Carrau, F.; Fariña, L.; Medina, K.; Méndez, M.; Rodríguez, P.; Dellacassa, E. Efectos de la aplicación del regulador de crecimiento 3,5-Dioxo-4-propionilciclohexancarboxilato de calcio (BAS 125) en la producción de uvas, composición del vino y aroma del cv. "Tannat". XIII Jornadas Groupe d'Étude des Systems de Conduite de la Vigne GESCO, **2003**, Montevideo, Uruguay.
- (40) Lo Giudice, D.; Wolf, T.K.; Marini, R.P. Vegetative Response of *Vitis vinifera* to Prohexadione-calcium. *HortScience* **2003**, *38*, 1435-1438.
- (41) Lo Giudice, D.; Wolf, T.K.; Zoecklein, B.W. Effects of prohexadione-calcium on grape yield components and fruit and wine composition. *American Journal of Enology and Viticulture* **2004**, *55*, 73-83.
- (42) Vaquero-Fernández, L.; Fernández-Zurbano, P.; Sanz-Asensio, J.; López-Alonso, M.; Martínez-Soria, M.T. Treatment of grapevines with prohexadione calcium as a growth regulator. the influence on production, winemaking and sensory characteristics of wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **2009**, *43*, 149-157.
- (43) Dubourdieu, D.; Grassi, C.; Deruche, C.; Ribéreau-Gayon, P. Mise au point d'une mesure rapide de l'activité laccase, dans les moûts et dans les vins par méthode à la syringaldazine. Application à l'appréciation de l'état sanitaire des vendanges. *Connaissance Vigne Vin* **1984**, *18*, 237-252.
- (44) Iland, P.G., Bruer, N., Edwards, G., Weeks, S. and Wilkes, E. *Chemical analysis of grapes and wine: techniques and concepts* Campbelltown (Australia), **2004**; pp. 115.
- (45) Ayala, F.; Echávarri, J.F.; Negueruela, A.I. A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *American Journal of Enology and Viticulture* **1997**, *48*, 357-363.
- (46) Llaudy, M.C.; Canals, R.; Canals, J.M.; Rozés, N.; Arola, L.; Zamora, F. New Method for Evaluating Astringency in Red Wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 742-746.
- (47) O.I.V. Recueil des methods internationaux d'analyse des vins et des mouts. Vienne, **2005**.
- (48) Horwitz, W.H.; Latimer, G.W. Fruits and fruits products. In: Official methods of analysis of AOAC International, 18th ed., **2005**, 15.

- (49) Ribereau-Gayon, P.; Stonestreet, E. Dosage des tanins du vin rouge et détermination de leur structure. *Chimie Analytique* **1966**, *48*, 188-196.
- (50) Glories, Y. La couleur des vins rouges. 1re Partie. Equilibres des anthocyanes et des tanins. 1984, *18*, 195-217. *Connaissance de la Vigne et du Vin* **1984**, *18*, 195-217.
- (51) Meilgard, C.E.; Civille, G.V.; Carr, B.T. Overall difference tests: does a sensory difference exist between samples. In: *Sensory Evaluation Techniques*. 4th Edition, CRC Press Eds.; Taylor & Francis Group: Boca Raton.; USA. **2007**, 72-80.
- (52) ISO NORM 3591; International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland, **1977**.
- (53) Vail, M.E.; Marois, J.J. Grape cluster architecture and the susceptibility of berries to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* **1991**, *81*, 188-191.
- (54) Clingeleffer, P.R.; Krstic, M.P.; Welsh, M.A. Effect of post-set, crop control on yield and wine quality of Syrah. Proceedings of the Eleventh Australian Wine Industry Technical Conference (The Australian Wine Industry Technical Conference Inc.: Urrbrae, South Australia) **2002**, 84-86.
- (55) Tardaguila, J.; Petrie, P.R.; Poni, S.; Diago, M.P.; De Toda, F.M. Effects of mechanical thinning on yield and fruit composition of Tempranillo and Grenache grapes trained to a vertical shoot-positioned canopy. *American Journal of Enology and Viticulture* **2008**, *59*, 412-417.
- (56) Diago, M.P.; Vilanova, M.; Blanco, J.A.; Tardaguila, J. Effects of mechanical thinning on fruit and wine composition and sensory attributes of Grenache and Tempranillo varieties (*Vitis vinifera* L.). *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2010**, *16*, 314-326.
- (57) Schildberger, B.; Faltis, C.; Arnold, M.; Eder, R. Effects of prohexadione-calcium on grape cluster structure and susceptibility to bunch rot (*Botrytis cinerea*) in cv. Grüner Veltliner. *Journal of Plant Pathology* **2011**, *93*, S1.33-S1.37.
- (58) Arozarena, I.; Ayestarán, B.; Cantalejo, M.J.; Navarro, M.; Vera, M.; Abril, I.; Casp, A. Anthocyanin composition of Tempranillo, Garnacha and Cabernet Sauvignon grapes from high- and low-quality vineyards over two years. *European Food Research and Technology* **2002**, *214*, 303-309.
- (59) Guidoni, S.; Allara, P.; Schubert, A. Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *American Journal of Enology and Viticulture* **2002**, *53*, 224-226.
- (60) Mazza, G.; Fukumoto, L.; Delaquis, P.; Girard, B.; Ewert, B. Anthocyanins, phenolics, and color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir wines from British Columbia. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1999**, *47*, 4009-4017.
- (61) Peña-Neira, A.; Caceres, A.; Pastenes, C. Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo



Valley (Chile): Effect of clusters thinning and vineyard yield. *Food Science and Technology International* **2007**, *13*, 153-158.

(62) Boulton, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*. **2001**, *52*, 67-87.

(63) Bravdo, B.; Hepner, Y.; Loinger, C.; Cohen, S.; Tabacman, H. Effect of crop level on grown, yield and wine quality of a high-yielding Carignane vineyard. *American Journal of Enology and Viticulture* **1984**, *35*, 247-252.

(64) Gil-Muñoz, R.R.; Vila-López, J.I.; Fernández-Fernández; Martínez-Cutillas, A. Effects of cluster thinning on anthocyanin extractability and chromatic parameters of syrah and tempranillo grapes and wines. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **2009**, *43*, 45-53.

(65) Puertas, B.; Serrano, M.J.; Valcárcel, M.C.; Pérez-Magariño, S.; Jiménez, M.,J.; García de Luján, A. Incidencia del aclareo de racimos en la composición de la uva durante la maduración de las variedades Cabernet Sauvignon y Tempranillo. XXV Jornadas de Viticultura y Enología Tierra de Barros, **2003**, Almendralejo, España.

(66) Kliewer, W.M.; Weaver, R.J. Effect of crop level and leaf area on growth, composition and coloration of Tokay grapes. *American Journal of Enology and Viticulture* **1971**, *22*, 172-177.

(67) Hermosín-Gutiérrez, I.; Sánchez-Palomo, L.; Vicario-Espinosa, A. Phenolic composition and magnitude of copigmentation in young and shortly aged red wines made from the cultivars, Cabernet Sauvignon, Cencibel, and Syrah. *Food Chemistry* **2005**, *92*, 269-283.

(68) Sáenz-Navajas, M.P.; Echavarri, F.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Pigment composition and color parameters of commercial Spanish red wine samples: Linkage to quality perception. *European Food Research and Technology* **2011**, *232*, 877-887.

(69) Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V.; Escudero, A.; Cacho, J. Role of Hydroxycinnamic Acids and Flavanols in the Oxidation and Browning of White Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 4937-4944.

(70) Ribereau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maujean, A.; Dubourdieu, D. Compuestos fenólicos. In: Tratado de Enología. Tomo II: Química del vino. Estabilización y tratamientos. Ed. Hemisferio Sur: Buenos Aires, Argentina. **2002**, 177-257.

(71) Prajitna, A.; Dami, I.E.; Steiner, T.E.; Ferree, D.C.; Scheerens, J.C.; Schwartz, S.J. Influence of cluster thinning on phenolic composition, resveratrol, and antioxidant capacity in chambourcin wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **2007**, *58*, 346-350.

(72) Alonso, J.; Gonçalves, G.; Ricardo-da-Silva, J.M.; Laureano, O. Effect of cluster thinning on the phenolic composition of cv. Syrah cultivated in Portugal. 33rd World Congress of Vine and Wine, **2010**, Tbilisi, Georgia.

(73) Fanzone, M.; Zamora, F.; Jofré, V.; Assof, M.; Peña-Neira, A. Phenolic composition of Malbec grape skins and seeds from valle de Uco (Mendoza, Argentina) during ripening. effect of cluster thinning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2011**, *59*, 6120-6136.

(74) Valdés, M.E.; Moreno, D.; Gamero, E.; Uriarte, D.; Prieto, M.D.H.; Manzano, R.; Picon, J.; Intrigliolo, D.S. Effects of cluster thinning and irrigation amount on water relations, growth, yield and fruit and wine composition of tempranillo grapes in extremadura (Spain). *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin* **2009**, *43*, 67-76.

(75) Pérez-Magariño, S.; González-San José, M.L. Evolution of Flavanols, Anthocyanins, and Their Derivatives during the Aging of Red Wines Elaborated from Grapes Harvested at Different Stages of Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2004**, *52*, 1181-1189.

(76) Awad, M.A.; De Jager, A. Formation of flavonoids, especially anthocyanin and chlorogenic acid in 'Jonagold' apple skin: Influences of growth regulators and fruit maturity. *Scientia Horticulturae* **2002**, *93*, 257-266.

(77) Heller, W.; Forkmann, G. Biosynthesis of flavonoids. In: *Flavonoids: Advances in Research since 1986*. Harbone J.B. Eds. Chapman and Hall: London, UK. **1994**, 499-535.

(78) Rademacher, W.; Temple-Smith, K.E.; Griggs, D.L.; Hedden, P. The mode of action of acylcyclohexanediones: a new type of plant retardant. In: *Progress in Plant Growth Regulation*. Karssen C.M. et al. Eds.; Kluwer Academic: Dordrecht, The Netherlands. **1992**, 571-577.

(79) Di Profio, F.; Reynolds, A.G.; Kasimos, A. Canopy management and enzyme impacts on Merlot, Cabernet franc, and Cabernet sauvignon. II. Wine composition and quality. *American Journal of Enology and Viticulture* **2011**, *62*, 152-168.

(80) Naor, A.; Gal, Y.; Bravdo, B. Shoot and cluster thinning influence vegetative growth, fruit yield, and wine quality of 'Sauvignon blanc' grapevines. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **2002**, *127*, 628-634.

(81) Roberts, R.W.; Reynolds, A.G.; De Savigny, C. Composition and wine sensory attributes of chardonnay musqué from different viticultural treatments: Implications for a winegrape quality model. *International Journal of Fruit Science* **2007**, *7*, 57-83.

(82) Sáenz-Navajas, M.P.; Campo, E.; Avizcuri, J.M.; Valentin, D.; Fernández-Zurbano, P.; Ferreira, V. Contribution of non-volatile and aroma fractions to in-mouth sensory properties of red wines: Wine reconstitution strategies and sensory sorting task. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *732*, 64-72.

(83) Sáenz-Navajas, M.P.; Martín-López, C.; Ferreira, V.; Fernández-Zurbano, P. Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **2011**, *17*, 9-19.

(84) García-Escudero, E.; López, R.; Santamaría, P.; Zaballa, O.; Arbizu, J. El control del rendimiento por aclareo de racimos. Experiencias sobre cv. Mazuelo. Zubia Monográfico. **1995**, 7, 53-65.

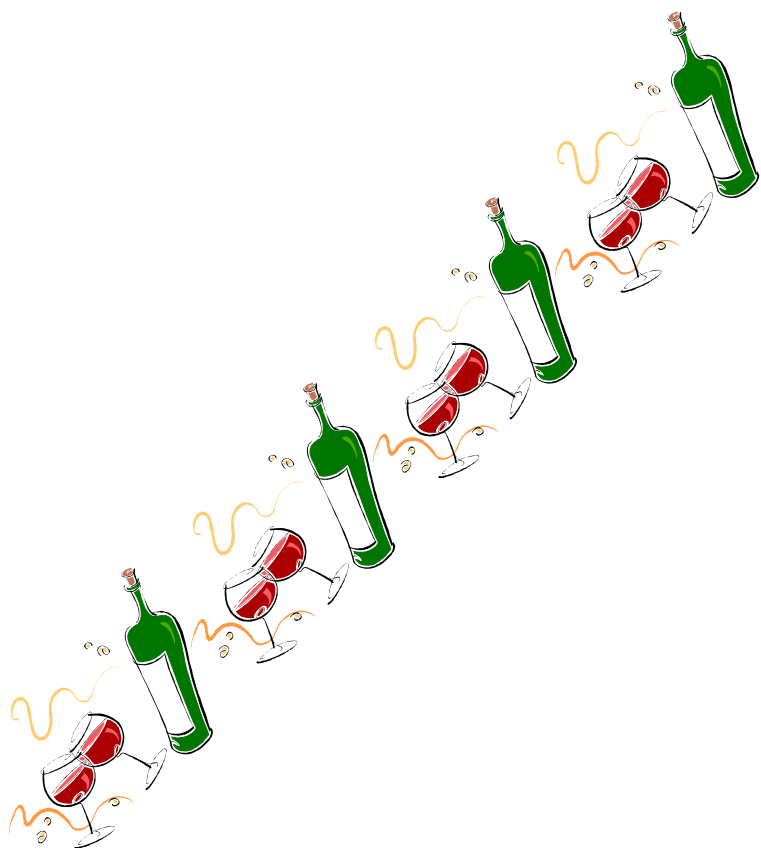
(85) Chapman, D.M.; Matthews, M.A.; Guinard, J.X. Sensory attributes of Cabernet Sauvignon wines made from vines with different crop yields. *American Journal of Enology and Viticulture* **2004**, 55, 325-334.

(86) Reynolds, A.G.; Schlosser, J.; Sorokowsky, D.; Roberts, R.; Willwerth, J.; De Savigny, C. Magnitude of viticultural and enological effects. II. Relative impacts of cluster thinning and yeast strain on composition and sensory attributes of Chardonnay Musqué. *American Journal of Enology and Viticulture* **2007**, 58, 25-41.





# GLOBAL CONCLUSIONS





# Global Conclusions

From the studies carried out in this Doctoral Thesis, the following conclusions can be drawn out:

## **CHAPTER 1. CHARACTERIZATION OF PROANTHOCYANIDINS IN WINE THROUGH MALDI-TOF MS.**

1. An alternative, easy and fast method using MALDI-TOF MS has been proposed in order to determine the mean degree of polymerization of wine proanthocyanidins without the need to perform thiolysis reaction.
2. It has been possible to formulate an equation that estimates the mean degree of polymerization of tannins from their vintage year and vice versa.
3. The astringency perceived did not show correlation with the mean degree of polymerization however this oral sensation was correlated with ethanol content, with the total content of proanthocyanidins, with the following units from the thiolysis reaction: Ce, ECGe, ECGt, with the percentage of galloylated units and with persistence.

## **CHAPTER 2. TASTE AND MOUTHFEEL PROPERTIES OF RED WINES PROANTHOCYANIDINS AND THEIR RELATION TO THE CHEMICAL COMPOSITION.**

1. Proanthocyanidins elicit astringency and persistence exclusively.
2. The quantity in which proanthocyanidins are present in the samples and the proportion/type of the extension flavanols attached to the PAs seem to play an important role in the perception of both of the astringent subqualities, velvety and drying, being the impact of the concentration of PAs more important in the astringency perception than the structural composition. Both subqualities appear to contribute to persistence.
3. A significant correlation has been observed between the sensory astringency and persistence data from both the wines and the polymeric fractions.

4. Significant multiple linear regressions have been found between the evaluated sensory astringencies and the analyzed compounds in the subject fraction of the study.

### **CHAPTER 3. CONTRIBUTION OF LOW MOLECULAR WEIGHT PHENOLS TO BITTER TASTE AND MOUTHFEEL PROPERTIES IN RED WINES.**

1. The fraction containing the low molecular weight phenolic compounds has been evaluated as bitter although it has not been found a correlation between the bitter taste evaluated at tasting the wines and the bitter taste evaluated at tasting the fractions containing these low molecular weight phenols.
2. Acidity and astringency seem to play an important role in wines bitterness perception. The elimination of astringent and acid compounds allowed to build a statistically significant model to explain bitter taste evaluated in samples containing low molecular weight phenolic compounds by panelists selected for their ability to detect bitter taste.

### **CHAPTER 4. INFLUENCE OF LOW AND HIGH MOLECULAR WEIGHT PHENOLIC COMPOUNDS ON WINES SENSORY PERCEPTION.**

1. An experimental procedure for obtaining reconstituted wines with similar non volatile composition to reference wines has been developed. Sample preparation procedure involved a combination of lyophilisation and liquid-liquid extraction for sample dearomatisation followed by gel permeation chromatography. The in-mouth sensory properties of the reference wines were retained by their corresponding reconstituted samples.
2. It has been evidenced the role of low molecular weight compounds in wines bitterness, astringency and persistence being most relevant its implication to astringency and persistence in the case of rose wines. In addition, the bitterness and astringency elicited by the low molecular weight phenolic compounds may be wine-dependent because sensory changes are not reproducible among the different series of reconstituted samples.



3. In red wines, the astringency perception is due to the proanthocyanidic material rather than the mean degree of polymerization or the structural differences of these compounds. The omission and the decrease in concentration of high molecular weight compounds caused a decrease on the astringency sensation
4. The concentration of proanthocyanidins present in wines seem to modulate the perception of other tastes as bitter and acid taste, playing an important role in wines balance.

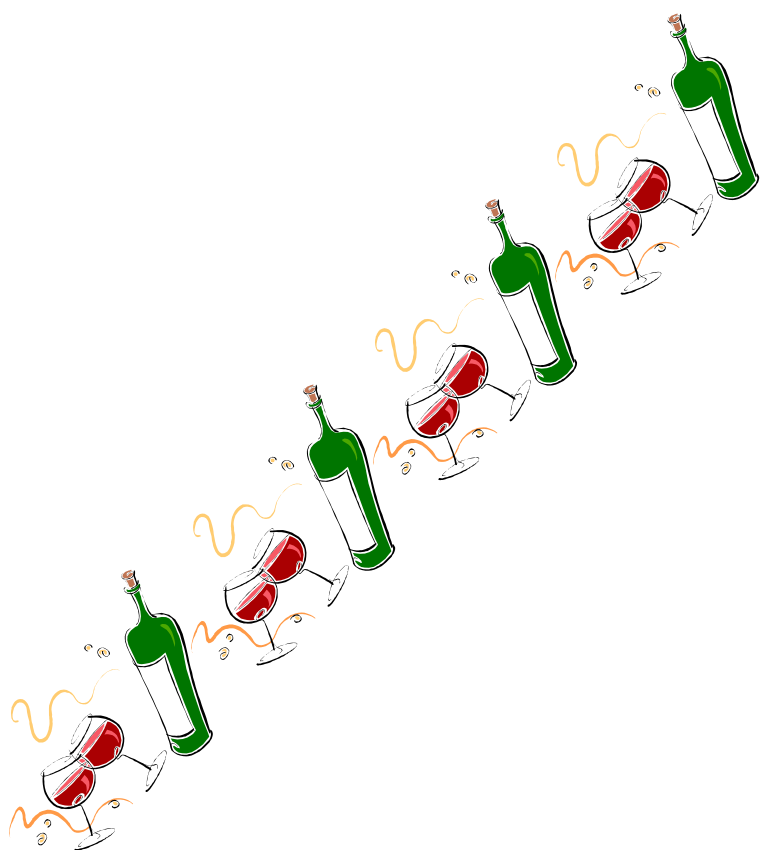
**CHAPTER 5. EFFECT OF CLUSTER THINNING AND THE APPLICATION OF PRO-CA IN THE PHENOLIC COMPOSITION OF GRAPES AND WINES. INFLUENCE ON THE SENSORY PROPERTIES OF WINES.**

1. The application of Pro-Ca in prebloom brought about a reduction in the production and in the size of grapes in cv. Tempranillo and Grenache. The musts fermented adequately, without the risk of sluggish or stuck fermentations.
2. The total content of polyphenols did not turn out to be diminished by the application of the growth regulator. On the contrary, the content of total polyphenols in both varieties was higher in musts from vines thinned, manually or chemically, than in musts from control vines. The application of the growth regulator seems to have influence on the anthocyanic composition of the grapes, which was similar to the concentration of musts from manual cluster thinned vines.
3. Both, cluster thinning and the application of Pro-Ca brought about the musts more intense and darker (lower  $L^*$ ) and with higher red and violet tonality.
4. The wines from Pro-Ca application in vines, showed a higher concentration in flavanols and flavonols and a lower concentration of hydroxycinnamic acids than wines from manual cluster thinning practice, in both varieties studied.
5. The prebloom application of ProCa and cluster thinning modified the sensory attributes of wines obtained. ProCa treatment can be considered as an alternative to cluster thinning. Thus, the application of ProCa can be used as a new tool for controlling production and improving wine quality in both studied varieties.





# ANEXOS





**Anexo I.** Protocolo utilizado en el análisis sensorial de las muestras, entrenamiento específico.

**CÓDIGO VINO :**

**CÓDIGO SUJETO :**

**Parte A**

Se os presentan cinco disoluciones acuosas. Os pedimos que situéis cada disolución sobre las escalas de intensidad siguientes.

*Serie 1*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ausencia	Muy débil		Débil		Medio		Fuerte		Muy fuerte

*Serie 2*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ausencia	Muy débil		Débil		Medio		Fuerte		Muy fuerte

*Serie 3*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ausencia	Muy débil		Débil		Medio		Fuerte		Muy fuerte

**Parte B**

Anota la intensidad de dulzor, acidez, amargor, astringencia y persistencia de las muestras presentadas.

*DULCE*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ausencia	Muy débil		Débil		Medio		Fuerte		Muy fuerte

*ÁCIDO*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ausencia	Muy débil		Débil		Medio		Fuerte		Muy fuerte

*AMARGO*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ausencia	Muy débil		Débil		Medio		Fuerte		Muy fuerte

*ASTRINGENTE*

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Ausencia	Muy débil		Débil		Medio		Fuerte		Muy fuerte

*PERSISTENCIA*

1	2	3	4	5	6	7	8	9
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Muy corta		Corta		Media		Larga		Muy larga

**Anexo II.** Protocolo de enjuague seguido por los panelistas en las evaluaciones sensoriales.

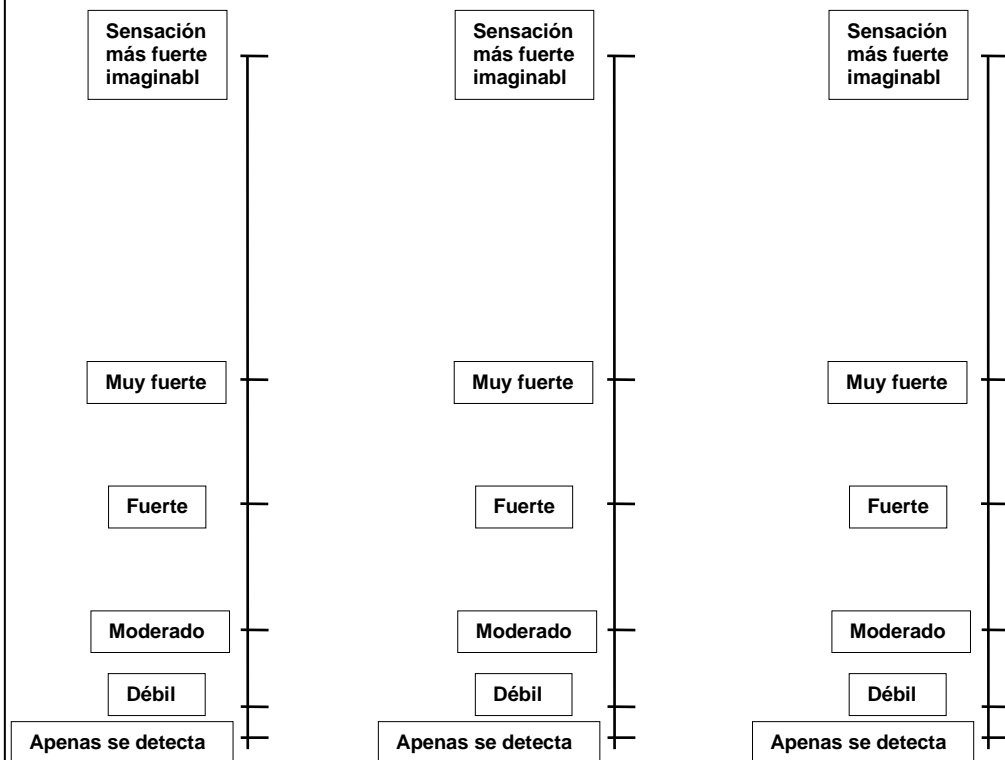
**PROCOLO DE ENJUAGUE ENTRE MUESTRAS**

1. Introducirse la muestra en la boca
2. Escupir después de 10 segundos
3. Enjuagarse la boca con agua desionizada (mantener en la boca durante 20 seg)
4. Enjuagarse la boca con pectina (mantener en la boca durante 10 seg)
5. Enjuagarse la boca con agua desionizada (mantener en la boca durante 20 seg)
6. Enjuagarse una segunda vez la boca con agua desionizada (20 seg)

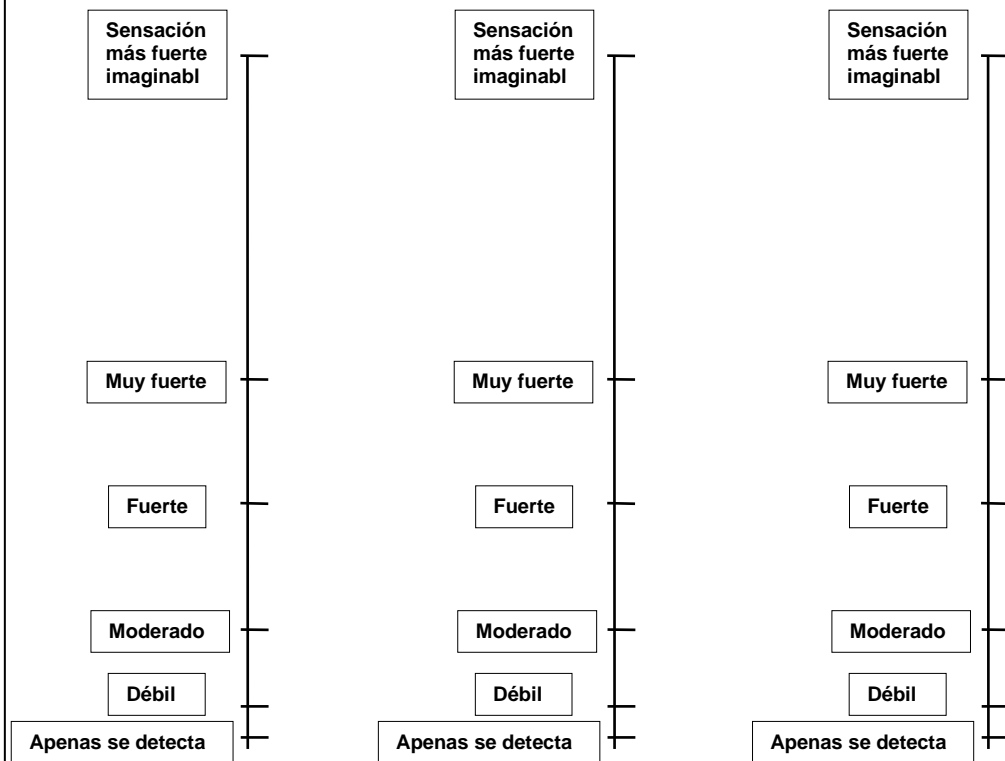
CONTINUAR CON LA SIGUIENTE MUESTRA

**Anexo III.** Escala de magnitud con etiquetas (LMS) utilizada para el Test de Tepper.

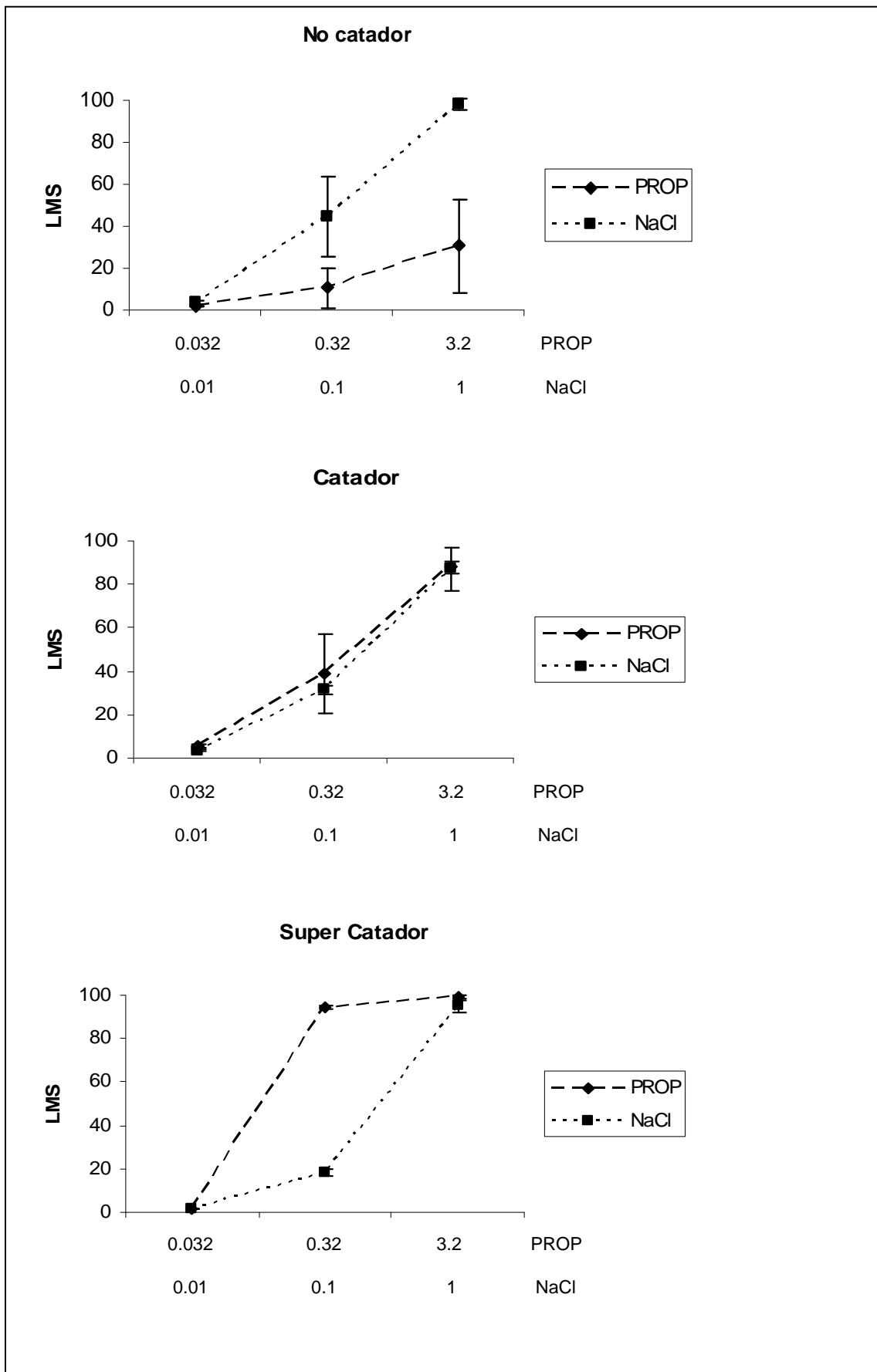
- Evaluación de las tres disoluciones de PROP



- Evaluación de las tres disoluciones de NaCl



**Anexo IV.** Gráficas representativas de cada uno de los grupos o status, no catadores, catadores y super-catadores asignados a partir del Test de Tepper.

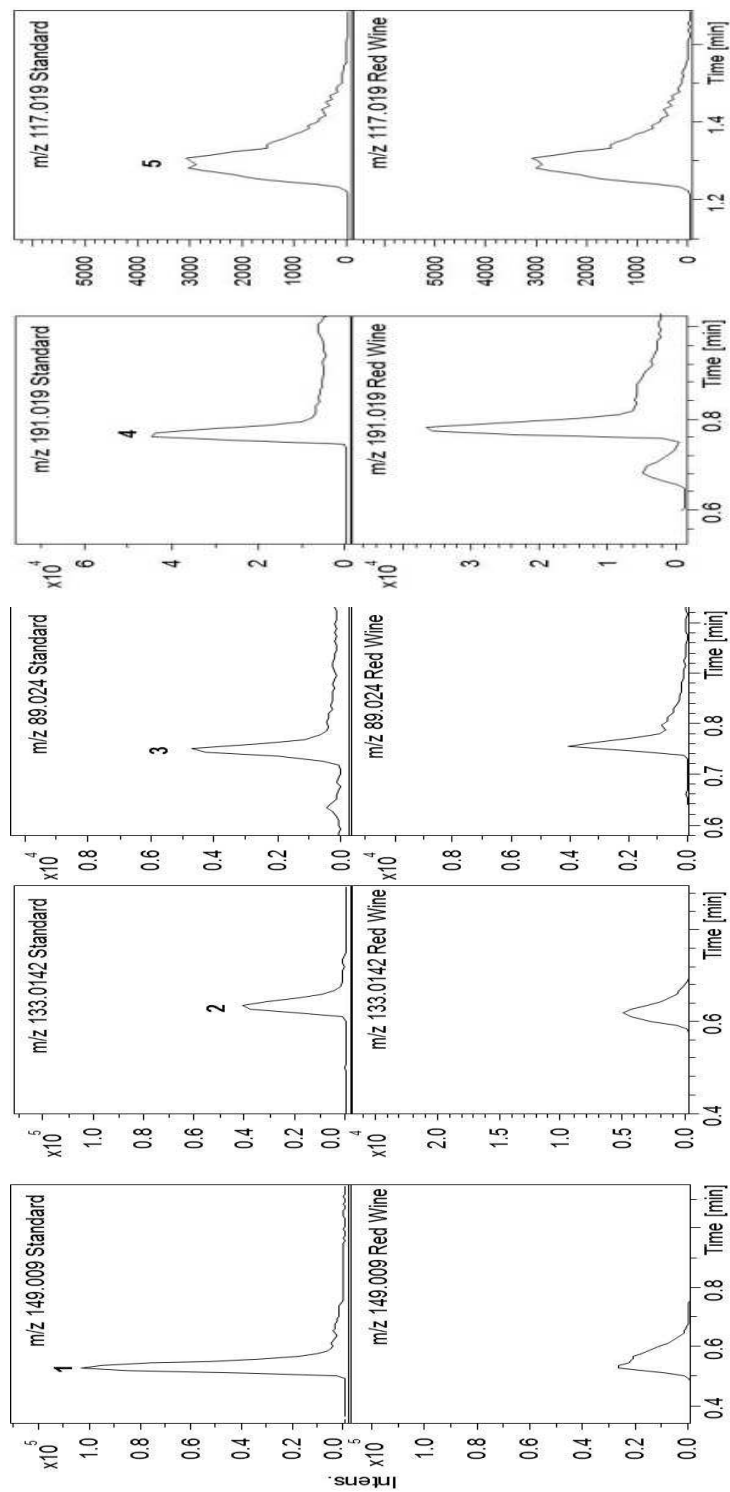




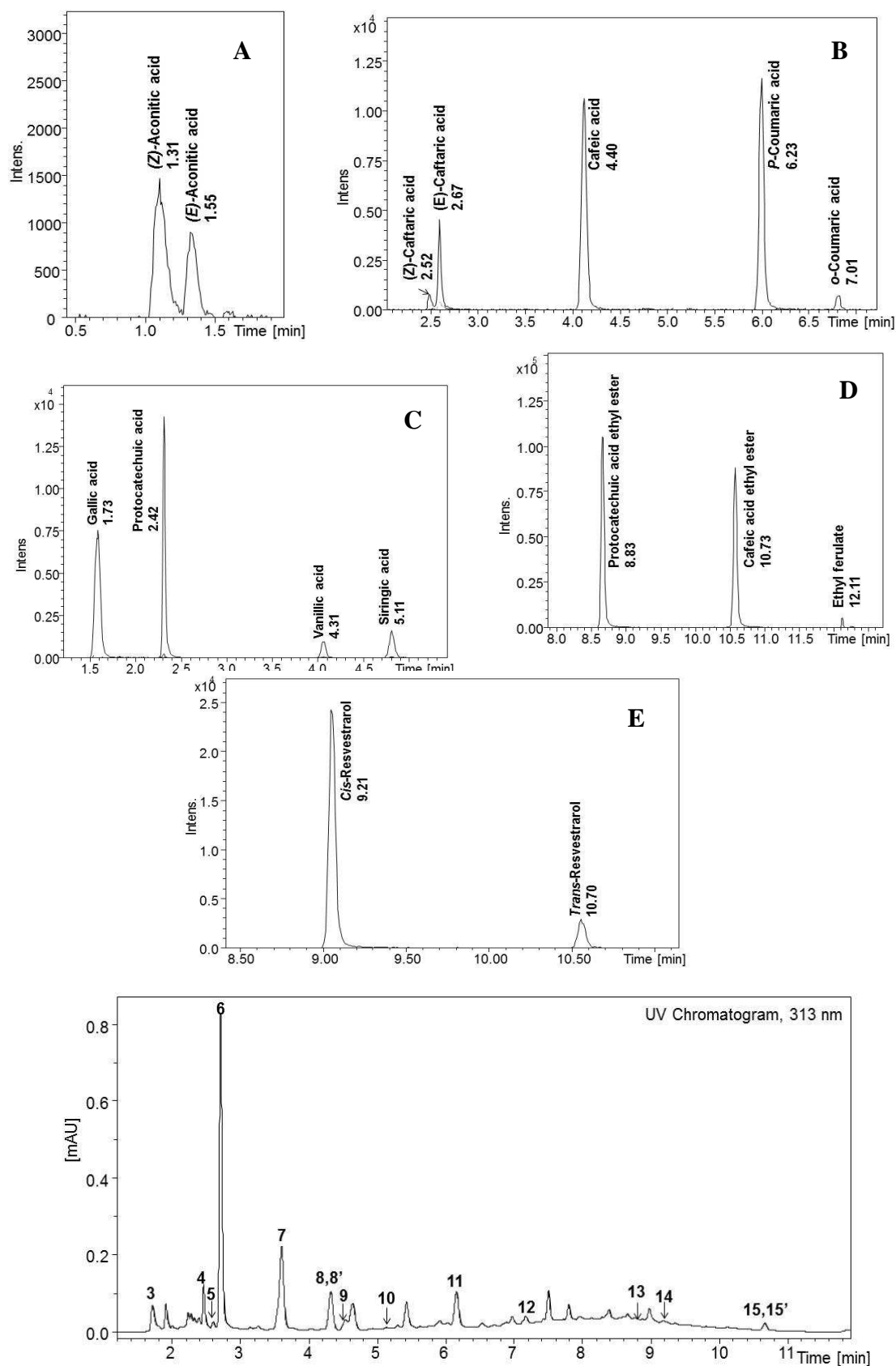
**Anexo V.** Ácidos orgánicos analizados mediante UPLC-MS. Parámetros de la regresión, tiempos de retención (TR), ion molecular (M-H<sup>-</sup>), LOD y LOQ.

Ácidos orgánicos	TR (min)	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Rango lineal (g/L)	Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>	LOD	LOQ
Ácido tartárico (1)	0.53	149	0.30 - 1 1 - 4	y = 108298x + 6721 y = 41184x + 80605	0.9904 0.9900	0.1	0.3
Ácido málico (2)	0.64	133	0.19 - 1 1 - 4	y = 41627x + 4325.9 y = 15687x + 26628	0.9913 0.9906	0.06	0.19
Ácido láctico (3)	0.76	89	0.08 - 1 1 - 4	y = 3163.3x + 1439.7 y = 3762.3x + 470.91	0.9982 0.9982	0.03	0.08
Ácido cítrico (4)	0.78	191	0.05 - 0.20 0.20 - 1.62	y = 89394x + 1160.8 y = 50703x + 15428	0.9966 0.9987	0.02	0.05
Ácido succínico (5)	1.27	117	0.04 - 0.38 0.38 - 1.5	y = 20922x + 3270.3 y = 28099x + 351.81	0.9985 0.9976	0.01	0.04
Ácido <i>cis</i> -aconítico	1.31	173	0.1 - 1 1 - 39	y = 1058.8x + 9.14 y = 1196.7x + 103.87	0.9998 0.9985	0.164	0.498
Ácido <i>trans</i> -aconítico	1.55	173	0.15 - 1 1 - 43	y = 729.29x - 7.1197 y = 492.22x - 267.99	0.9989 0.9934	0.318	0.963

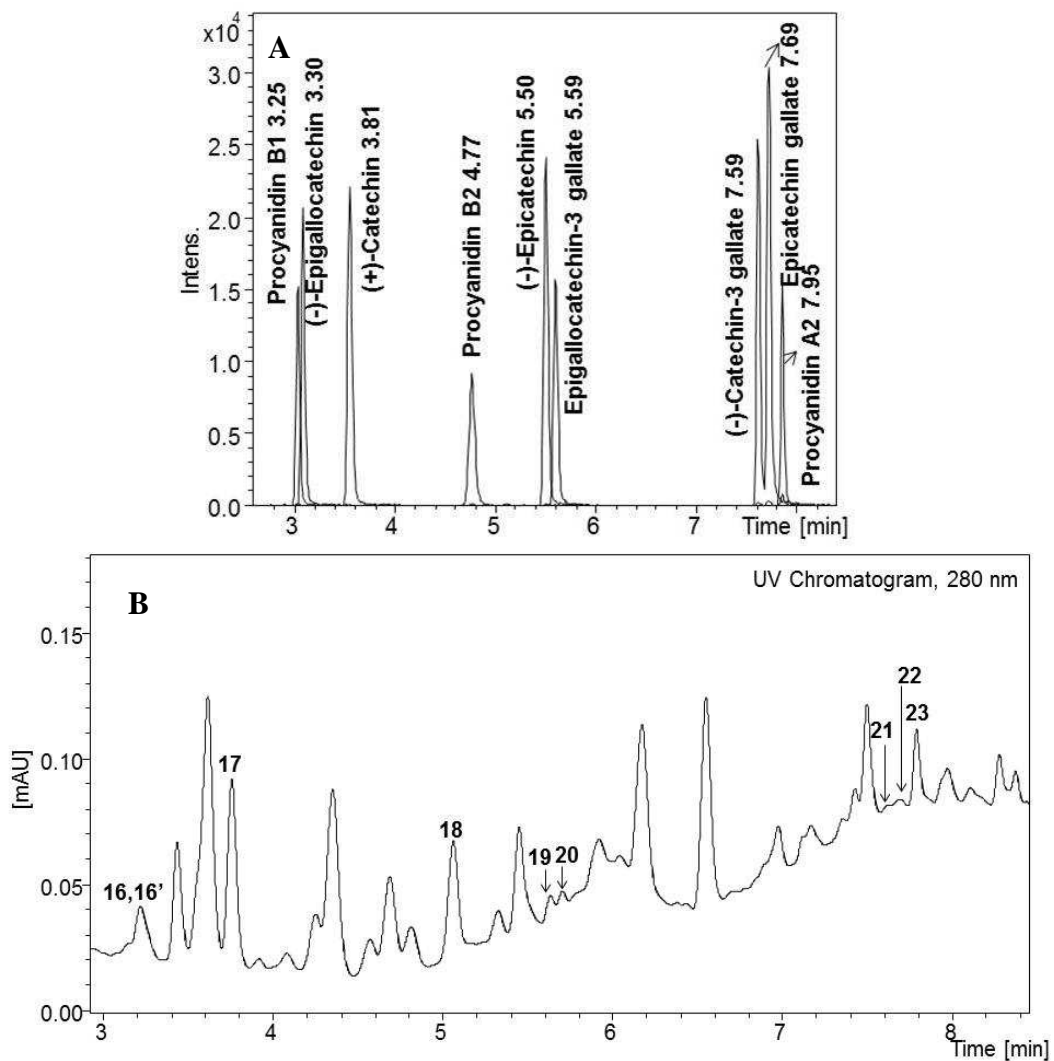
**Anexo VI.** Separación cromatográfica de los ácidos orgánicos mediante UPLC-ESI-MS/MS llevada a cabo en soluciones estándar y en las muestras del estudio en modo negativo  $[M-H]^-$  a  $m/z$  149.009, 133.014, 89.024, 191.019 y 117.019, respectivamente.



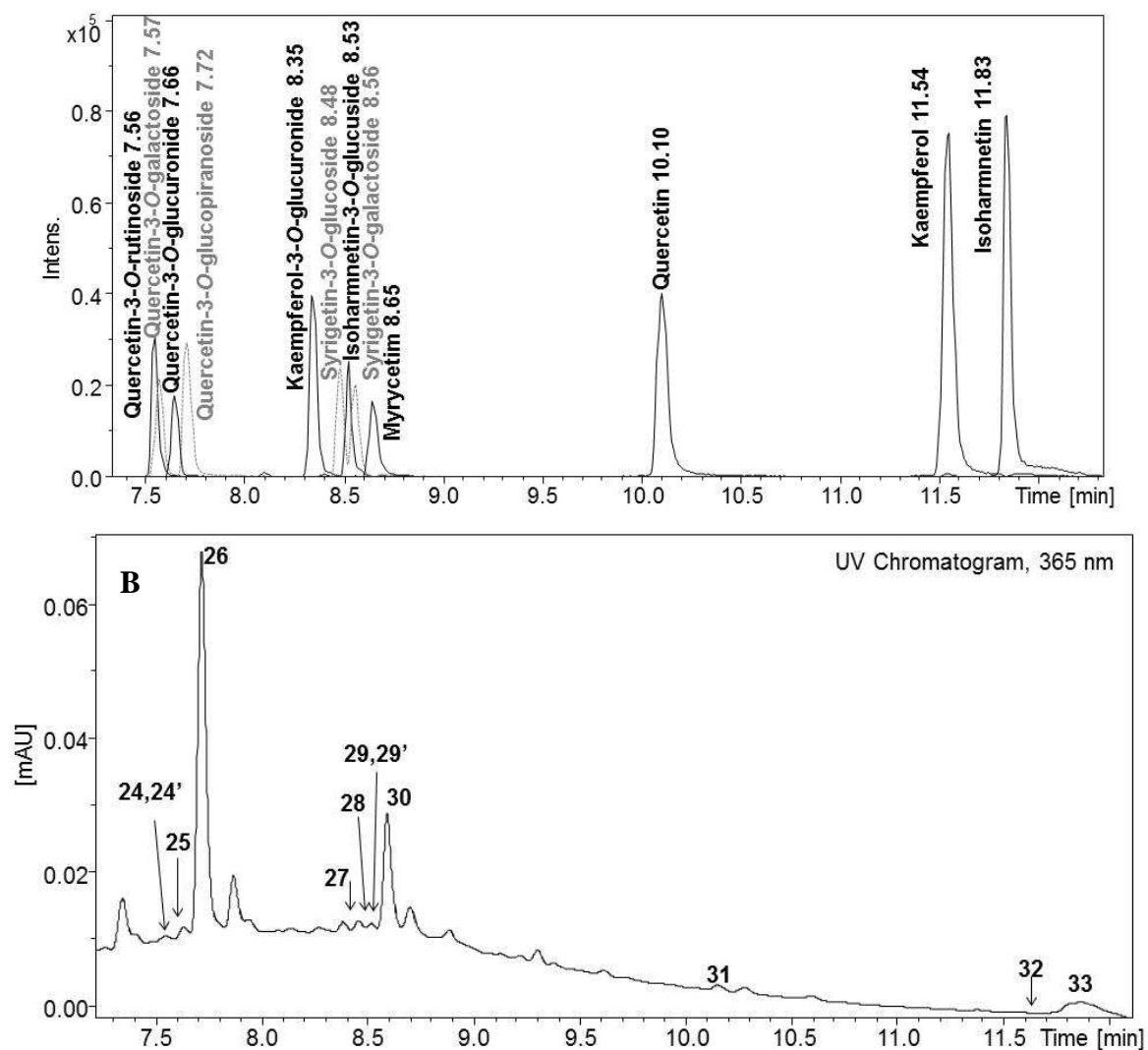
**Anexo VII.** Separación cromatográfica mediante UPLC-MS/MS de (A) ácidos orgánicos, (B) ácidos hidroxicinámicos, (C) ácidos hidroxibenzoicos, (D) derivados de ácidos fenólicos y (E) estilbenos en disoluciones estándar. Separación cromatográfica mediante UPLC-UV de (F) ácidos fenólicos y derivados a 313 nm en una de las muestras a estudio.



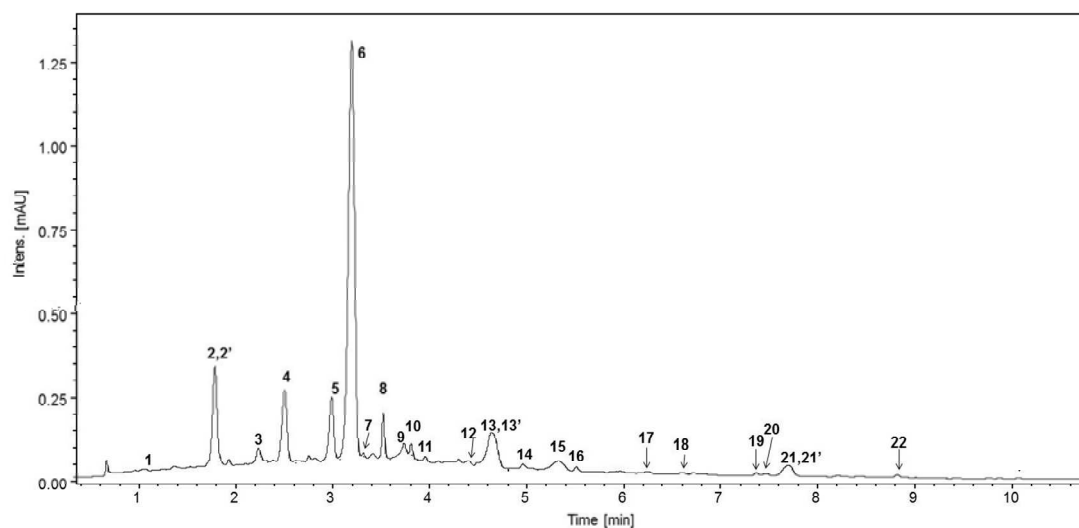
**Anexo VIII.** (A) Separación cromatográfica mediante UPLC-MS/MS de flavanoles en disolución estándar. (B) Separación cromatográfica mediante UPLC-UV de flavanoles a 280 nm en una de las muestras a estudio.



**Anexo IX. (A)** Separación cromatográfica mediante UPLC-MS/MS de flavonoles en disolución estándar. **(B)** Separación cromatográfica mediante UPLC-UV de flavanoles a 365 nm en una de las muestras a estudio.



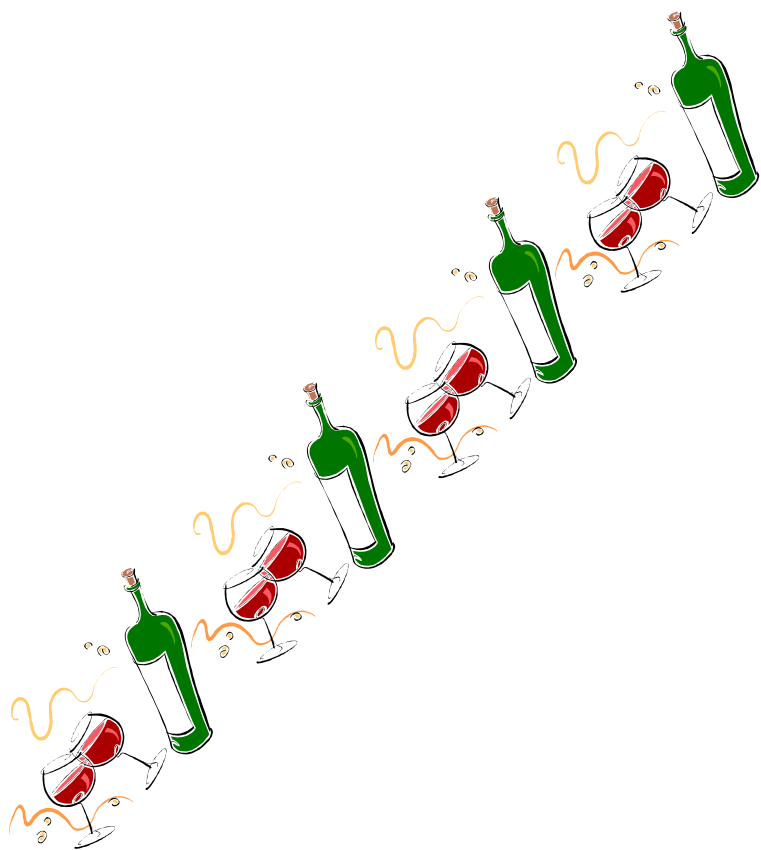
**Anexo X.** Separación cromatográfica de pigmentos antociánicos mediante UPLC UV-Vis, detección a 520 nm en una de las muestras a estudio.



Pico	Compuesto	TR (min)	[M+H] <sup>+</sup> (m/z)	Fragmentos iones (m/z)	FM
1	Visitina B de delphinidina-3- <i>O</i> -glucósido	1.10	489	392	
2	Delfinidina-3- <i>O</i> -glucósido	1.86	465	303	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>
2'	Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-(epi)catequina	1.88	781	467	
3	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	2.30	449	287	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub>
4	Petunidina-3- <i>O</i> -glucósido	2.57	479	317	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>
5	Peonidina-3- <i>O</i> -glucósido	3.07	463	301	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub>
6	Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	3.29	493	331	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>
7	Vitisina A de peonidina-3- <i>O</i> -glucósido	3.39	531	369	C <sub>25</sub> H <sub>23</sub> O <sub>13</sub>
8	Vitisina A de malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	3.59	561	399	C <sub>26</sub> H <sub>25</sub> O <sub>14</sub>
9	Delfinidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	3.79	507	303	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>
10	Vitisina B de malvidina-3- <i>O</i> -glucósido	3.89	517	355	C <sub>25</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub>
11	Acetil vitisina B	4.01	603	399	
12	Cianidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	4.48	491	287	
13	Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-8-etil-(epi)catequina	4.70	521	317	
13'	Petunidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	4.70	809	357	
14	Delfinidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	5.03	611	303	C <sub>30</sub> H <sub>27</sub> O <sub>14</sub>
15	Malvidina-3- <i>O</i> -(6'-acetil)-glucósido	5.43	535	331	C <sub>25</sub> H <sub>26</sub> O <sub>13</sub>
16	Vitisina A de malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	5.56	707	399	
17	Petunidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	6.34	625	317	C <sub>31</sub> H <sub>29</sub> O <sub>14</sub>
18	<i>Cis</i> -malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	6.92	639	331	C <sub>32</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>
19	Malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido-etil-(epi)catequina	7.41	955		
20	Peonidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	7.57	609	301	C <sub>31</sub> H <sub>29</sub> O <sub>13</sub>
21	Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-4-vinilcatecol	7.72	625	463	
21'	<i>Trans</i> -malvidina-3- <i>O</i> -(6'- <i>p</i> -cumaroil)-glucósido	7.78	639	331	C <sub>32</sub> H <sub>31</sub> O <sub>14</sub>
22	Malvidina-3- <i>O</i> -glucósido-4-vinilfenol	8.91	609	447	



# **DIVULGACIÓN CIENTÍFICA**







## Divulgación Científica

El trabajo expuesto en la siguiente memoria ha dado lugar hasta la fecha a las siguientes **publicaciones científicas**:

- Gonzalo-Diago, A.; Avizcuri-Inac, J.M.; Ortigosa, N.; Dizy, M.; Martínez-Soria, M.T.; Sanz-Asensio, J.; Echávarri-Granado, J.F.; Fernández-Zurbano, P. Prohexadione-calcium as a regulator of vine growth: effect on the physical-chemical characteristics of wine grapes. In: *Grapes: Cultivation, Varieties and Nutritional Uses* Editors: R. P. Murphy et al., **2012**, chapter 5, pp. 133-153.
- Avizcuri-Inac, J.M.; Gonzalo-Diago, A.; Sanz-Asensio, J.; Martínez-Soria, M.T.; López-Alonso, M.; Dizy, M.; Echávarri-Granado, J.F.; Vaquero-Fernández, L.; Fernández-Zurbano, P. Effect of cluster thinning and prohexadione calcium applications on phenolic composition and sensory properties of red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61, 1124–11371.
- Gonzalo-Diago, A.; Dizy M.; Fernández-Zurbano, P. Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2013**, 61, 8861–8870.
- Fernández-Zurbano, P.; Sáenz-Navajas, M.P.; Gonzalo-Diago, A.; Avizcuri-Inac, J.M.; González-Hernández, M.; Ferreira-González, V.; Dizy-Soto, M. Propiedades gustativas de los vinos tintos y su relación con la composición química no-volátil. *Zubia* 2013, 25, 61-83.
- Gonzalo-Diago, A.; Dizy M.; Fernández-Zurbano, P. Contribution of low molecular weight phenols to bitter taste and mouthfeel properties in red wines. *Food Chemistry* **2014**, 154, 187–198.
- Gonzalo-Diago, A.; Dizy M.; Fernández-Zurbano, P. Study of the effect of low molecular weight phenols in the in-mouth sensory perception of high molecular weight phenols in wines. An approach to taste-taste and taste-astringency interactions. *Pendiente de publicación*.

Y a las siguientes **comunicaciones en congresos de ámbito nacional e internacional:**

- Aplicación de prohexadiona de calcio en vid y su implicación directa en el color y calidad del fruto. VI Foro Mundial del Vino. Logroño, España. 23/04/2008 - 25/04/2008. Comunicación en póster.
- Tratamiento con prohexadiona de calcio. Influencia en el color de las uvas. 31º Congreso Mundial de la Viña y del Vino. Verona, Italia. 15/06/2008 - 20/06/2008. Comunicación en póster.
- A new tool to control production yield in vines and its influence on phenolic maturity. 31º Congreso Mundial de la Viña y del Vino. Verona, Italia. 15/06/2008 - 20/06/2008. Comunicación en póster.
- Control de la producción de uvas. Influencia sobre la composición polifenólica de los vinos. X Congreso Nacional de Investigación Enológica. Publicado en: Nuevos Horizontes en la Viticultura y Enología. Orense, España. 03/06/2009 - 05/06/2009. Comunicación en póster.
- Aplicación de prohexadiona de calcio en vid y su implicación directa en el color del vino. X Congreso Nacional de Investigación Enológica. Publicado en: Nuevos Horizontes en la Viticultura y Enología. Orense, España. 03/06/2009 - 05/06/2009. Comunicación en póster.
- Role of the growth regulator Prohexadione Calcium in the sensory properties of wine. VI Symposium In Vino Analytica Scientia. Angers, Francia. 02/07/2009 - 04/07/2009. Comunicación en póster.
- Role of the growth regulator Prohexadione Calcium in the phenolic composition of wine. VI Symposium In Vino Analytica Scientia. Angers, Francia. 02/07/2009 - 04/07/2009. Comunicación en póster.
- Study of the effect of malolactic fermentation on the phenolic composition and color of young red wines. VII Foro Mundial del Vino. Logroño, España. 12/05/2010 - 14/05/2010. Comunicación en póster.
- Proantocianidinas en vino mediante MALDI-TOF-MS. VII Foro Mundial del Vino. Logroño, España. 12/05/2010 - 14/05/2010. Comunicación en póster.

- Caracterización sensorial de la fracción tánica del vino. XI Congreso Nacional de Investigación Enológica, Gienol. Cadiz, España. 01/06/2011-03/06/2011. Comunicación en póster.
- Caracterización sensorial de vinos tintos jóvenes españoles y su relación con la calidad percibida. XI Congreso Nacional de Investigación Enológica, Gienol. Cadiz, España. 01/06/2011-03/06/2011. Comunicación en póster.
- Sensory and chemical characterization of monomeric phenol fraction of wines. In *Vino Analytica Scientia*. Graz, Austria. 21/07/2011-23/07/2011. Comunicación en póster.
- Sensory and chemical characterization of oligomeric and polymeric phenol fraction of wines. In *Vino Analytica Scientia*. Graz, Austria. 21/07/2011-23/07/2011. Comunicación en póster.
- Composición, sabor y calidad del vino. El vino y la alimentación en los albores del siglo XXI. Logroño, España. 19/10/2011 – 22/10/2011. Comunicación oral.
- Efecto del aclareo químico y manual en uvas y vinos. IX Curso de Otoño de Enología. Cenicero, La Rioja, España. 23/11/2011. Comunicación oral.
- Wines reconstitution strategy: A thorough study of the effect of low molecular weight phenols in the in-mouth sensory perception of high molecular weight phenols and viceversa. EUROFOODCHEM XVII. Estambul, Turquía. 07/05/2013 – 10/05/2013. Comunicación oral.
- Estudio del efecto de los fenoles de bajo peso molecular en la percepción sensorial en boca de los fenoles de alto peso molecular y vice-versa. XII Congreso Nacional de Investigación Enológica, Gienol. Madrid, España. 18/06/2013 - 21/06/2013. Comunicación en póster.
- Study of perceptions implicated in masking wines bitterness and selection of phenolic compounds with ability to predict bitterness. In *Vino Analytica Scientia*. Rheims, Francia. 02/07/2013 - 05/07/2013. Comunicación en póster.
- Study of the effect of low molecular weight phenols in the in-mouth sensory perception of high molecular weight phenols in wines. An approach to taste-taste and taste-astringency interactions. In *Vino Analytica Scientia*. Rheims, Francia. 02/07/2013 - 05/07/2013. Comunicación en póster.



