



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

| |
|--|
| Título |
| Avances en el conocimiento de la percepción sensorial de vinos tintos y su relación con la composición química no volátil. Evolución químico-sensorial en la etapa de embotellado |
| Autor/es |
| José Miguel Avizcuri Inac |
| Director/es |
| Purificación Fernández Zurbano, María Pilar Sáenz Navajas y Vicente Ferreira González |
| Facultad |
| Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática |
| Titulación |
| |
| Departamento |
| Agricultura y Alimentación |
| Curso Académico |
| 2013-2014 |



Avances en el conocimiento de la percepción sensorial de vinos tintos y su relación con la composición química no volátil. Evolución químico-sensorial en la etapa de embotellado, tesis doctoral

de José Miguel Avizcuri Inac, dirigida por Purificación Fernández Zurbano, María Pilar Sáenz Navajas y Vicente Ferreira González (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

**Avances en el conocimiento de la percepción sensorial
de vinos tintos y su relación con la composición química no volátil.
Evolución químico-sensorial en la etapa de embotellado.**



Tesis Doctoral
Jose Miguel Avizcuri Inac

Diseño de portada: Rubén Ocho Angulo

Fotografía: Nieves Diestro Sánchez



Instituto de
Ciencias de la
Vid y del Vino



Gobierno
de La Rioja



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA
DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

**Avances en el conocimiento de la percepción
sensorial de vinos tintos y su relación con la
composición química no volátil.
Evolución químico-sensorial en la etapa de
embotellado**

Memoria presentada por
José Miguel AVIZCURI INAC
para optar al grado de Doctor

Julio 2014

Dirigida por los doctores
Dra. Purificación FERNÁNDEZ ZURBANO
Dra. María Pilar SÁENZ NAVAJAS
Dr. Vicente FERREIRA GONZÁLEZ



Instituto de
Ciencias de la
Vid y del Vino



Gobierno
de La Rioja



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA

INFORME DIRECTORES

Dña. Purificación FERNÁNDEZ ZURBANO Profesora Titular del Departamento de Química, Área Química Analítica de la Universidad de La Rioja, **Dña. María Pilar SÁENZ NAVAJAS**, investigadora en el Departamento de Química Analítica del grupo de investigación “Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología” de la Universidad de Zaragoza y **D. Vicente FERREIRA GONZÁLEZ**, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza.

CERTIFICAN

Que la presente memoria, titulada **“Avances en el conocimiento de la percepción sensorial de vinos tintos y su relación con la composición química no volátil. Evolución químico-sensorial en la etapa de embotellado”**, presentada por **D. José Miguel AVIZCURI INAC** para optar al grado de Doctor 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, Julio 2014

Fdo. Purificación Fernández Zurbano

Fdo: María Pilar Sáenz Navajas

Fdo. Vicente Ferreira González

Presentación

La presente memoria de tesis doctoral se ha desarrollado dentro de los grupos de investigación: “Ciencia Química y Sensorial Enológica” de la Universidad de la Rioja y el “Laboratorio de Análisis del Aroma y Enología” de la Universidad de Zaragoza, orientados ambos a la obtención de un conocimiento preciso acerca de los componentes químicos que son sensorialmente activos en el vino, con el objetivo final de proporcionar, con criterios racionales, herramientas útiles para un control, mejora y mejor adecuación del producto a un mercado tan exigente como es del vino.

Entre los muchos aspectos que aún deben ser estudiados, este trabajo se ha centrado especialmente en el estudio de las propiedades sensoriales en boca, fundamentalmente la astringencia y su correlación con la composición química, así como la evolución tanto de las propiedades sensoriales como químicas de vinos tintos durante el envejecimiento en botella.

Al comenzar este trabajo de doctorado se sabía que los compuesto fenólicos representan una de las familias de compuestos más importantes implicados en la percepción de la calidad de los vinos tintos, ya que contribuyen de forma activa a la formación de su perfil organoléptico, especialmente en el color, amargor y astringencia. Actualmente, aunque se han logrado algunos avances al respecto, resulta un tema crítico en la investigación enológica la vinculación directa de la respuesta sensorial y la composición química de los vinos. Así, aunque existe cierta información sobre los compuestos responsables del amargor y astringencia de los vinos, aún existe un gran desconocimiento sobre el comportamiento de los mismos y de las posibles interacciones que pueden producirse entre ellos en una matriz tan compleja como es el vino.

El vino es un alimento muy complejo el cual evoluciona con el tiempo tanto desde el punto de vista sensorial como químico. Tiene especial interés la etapa de permanencia en botella durante la cual se hace imposible realizar un control eficaz sobre el producto. Por ello, la mayor parte de las decisiones a tomar durante esta etapa están basadas en la tradición y experiencia, ya que no existe una base científica suficiente que relacione los cambios químicos producidos en el vino durante el envejecimiento en botella con la evolución de los atributos sensoriales y que permitan prever la evolución sensorial en base a una composición química inicial.



Por todo ello el presente trabajo se articula en dos secciones principales, abordando en la primera de ellas el estudio de la implicación de la matriz no volátil de forma global, así como la de determinados compuestos polifenólicos en particular, sobre las características sensoriales en boca de los vinos tintos. Para llevar a cabo dicho objetivo, se utilizaron estrategias de fraccionamiento y reconstrucción de vinos, obtención de perfiles sensoriales objetivos, análisis químicos completos de la composición no volátil que posteriormente mediante herramientas estadísticas se correlacionan obteniendo una serie de compuestos implicados en la astringencia y calidad en boca de los vinos. La implicación real de estos compuestos en la astringencia de los vinos fue confirmada finalmente con ensayos de adición.

En la segunda sección de la memoria se aborda el estudio de la evolución sensorial producida durante el envejecimiento en botella de un conjunto relativamente amplio de vinos tintos con diferente composición polifenólica y marcadas diferencias sensoriales. Además, se estudian los cambios químicos de la matriz no volátil de los vinos con el fin de establecer patrones de evolución sensorial en base a una composición química inicial y poder determinar los principales compuestos responsables de la evolución de los distintos atributos sensoriales. Para llevar a cabo dicho estudio se generaron los perfiles sensoriales y químicos de los vinos antes y después del envejecimiento y mediante herramientas estadísticas se obtuvieron agrupaciones de vinos con comportamientos semejantes en el envejecimiento tanto desde el punto de vista sensorial como químico.



Este trabajo ha sido realizado gracias a una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador concedida a **D. José Miguel AVIZCURI INAC** por el **Gobierno de Navarra**

El trabajo expuesto en la presente memoria ha dado lugar hasta la fecha a las siguientes publicaciones científicas:

- Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Avizcuri, J. M., Valentin, D., Fernández-Zurbano, P., & Ferreira, V. (2011). Contribution of non-volatile and aroma fractions to inmouth sensory properties of red wines: Wine reconstitution strategies and sensory sorting task. *Analytica Chimica Acta*. 732, 64-72.
- Sáenz-Navajas, M. P., Avizcuri, J. M., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, M. P. (2012). Insights on the chemicals basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chemistry*, 134, 1484-1493.
- Sáenz-Navajas, M. P., Avizcuri, J. M., Fernández-Zurbano, M. P., Ferreira, V. & Valentin, D. (2014). Quality mapping: an exploratory approach for evaluating the chemicals driving in-mouth quality in red wines. In *Wine: phenolic composition, classification and health benefits*. Nova Publishers. In press.

La siguiente publicación está en trámite:

- Sáenz-Navajas, M. P., Avizcuri, J. M., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, M. P. Effect of post-bottling storage and initial oxygen dose on the sensory properties of Spanish red wines. (enviado para su publicación).



*a mis padres
y mi hermana María*

Esta tesis doctoral ha podido ser realizada gracias al apoyo del Gobierno de Navarra por haberme concedido una beca de formación del personal investigador desde el año 2009 hasta el año 2013.

Este trabajo ha sido financiado por:

- El Instituto de Estudios Riojano, Consejería de Educación Cultura y Deportes del Gobierno de La Rioja mediante el proyecto "Parámetros que son responsables de la calidad gustativa de los vinos españoles. Desarrollo de estrategias para determinación de los factores gustativos negativos" FOMENTA 2008/07.
- El Ministerio de Educación y ciencia y fondos FEDER mediante el proyecto "Definición molecular de la potenciabilidad del envejecimiento del vino mediante el control de precursores aromáticos, moléculas astringentes, estados redox y proceso de evolución" AGL2010-22355-C02-02.
- La agencia de Desarrollo Económico de La Rioja mediante el proyecto "Aplicación de tecnología de desinfección en bodega" 2010-I-ID-00281.

El vino, poder que admira, que desconcierta... transmuta la nieve, el fuego vuelve piedra... levanta tu copa al sol de la noche y bebe el vino sagrado que hermana los corazones
Alfonso González González

Agradecimientos

Una vez llegado el momento de finalizar este trabajo no podía terminar sin expresar mi agradecimiento por la colaboración y ayuda prestada, ya que indudablemente son muchas las personas que lo han hecho posible.

En primer lugar quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis directoras y director, **Puri, María** (Pilar para nosotros) y **Tito**, que me brindaron la oportunidad de introducirme en la investigación y ofrecerse a ser mis directores. Me habéis concedido vuestro tiempo, conocimiento, ayuda, apoyo y sobre todo mucho ánimo. Espero que en todos estos años haya habido algo más que una relación de trabajo. Siempre os considerare como mis “padres” en mi devenir en la investigación.

A **Fede**, por tu ayuda en las medidas de color, consejos y reflexiones..., porque aunque un poco “gruñón” (y no te lo tomes a mal, que yo también entiendo de eso) te haces querer.

A **Dominique**, porque siempre que nos hemos topado con un problema has estado ahí en la búsqueda de soluciones, transmitiéndome tu conocimiento y consejos.

Sin duda este trabajo tampoco hubiera sido posible sin la participación y compromiso desinteresado de todos los **panelistas** que formaron parte de las sesiones de análisis sensorial.

A las personas que forman parte de la secretaría del Departamento, del servicio de laboratorios, de limpieza, conserjes, por su cariño y recibirme siempre con una sonrisa.

Al personal docente e investigador de los Departamentos de Química y Agricultura y Alimentación.

A **Marta**, porque siempre me has transmitido tranquilidad y serenidad, además de prestarme tú ayuda desinteresada siempre que la he necesitado.

A **Maite, Jesús y Miguel** por vuestro apoyo, consejos y ayuda desinteresada en todo momento.

A todo el grupo del **LAEE** de Zaragoza por brindarme su ayuda y colaboración siempre que lo he necesitado.

A **Eva Campo**, porque los favores que me has hecho y los consejos que me has dado no los olvidare nunca, SIEMPRE me tendrás ahí para lo que necesites.

A **Ernesto y Nines**, por hacerme pasar tan buenos ratos entre tanto análisis.

A **Txino**, eres una de las personas más buenas y nobles que conozco, nunca tienes una mala cara ni una palabra fuera de lugar para mí, sabes que has sido uno de los grandes apoyos durante esta etapa de mi vida y son tantas las cosas que te tengo que agradecer que diga lo que diga me quedo corto... tienes el mejor regalo posible, toda la gente que te quiere y te aprecia, que sabes que es mucha. Eso compensa todo lo demás... así que no cambies nunca y no dejes nunca que nadie te haga pensar lo contrario.

A **Ana G., Pilar M, Nieves, Marivel y Leticia**, comenzamos a la vez y hemos evolucionado y hemos vivido muchas cosas juntos, me habéis regalado muy buenos momentos durante estos años y habéis hecho que todo esto sea más fácil.

A mis **compañeros de laboratorio** desde los primeros a los más recientes (no os enumero pero sabéis quienes sois), por compartir conmigo vuestro tiempo, buenos momentos y brindarme vuestro apoyo durante todos estos años.

A esa pareja peculiar de química-física, **Rodrigo y Judith**, os habéis convertido en unos verdaderos amigos, sois geniales. Me habéis regalado inolvidables momentos, conversaciones y sobre todo valiosos consejos.

A **David**, dicen que quien tiene un amigo tiene un tesoro, no te imaginas cuánto significado ha tomado esa frase contigo, porque aunque muchas veces te he dicho que no sé aún cómo puedo tener un amigo como tú... te has convertido en uno de los grandes apoyos de mi vida, te considero una de las mejores personas que conozco, mi hermano (sabes que lo digo con todas las consecuencias) y pase lo que pase me tendrás ahí para lo que quieras, siempre.

A **Isabel y Manuel** (aunque no te pienses, lo tuyo me lo he pensado...), porque siempre has, y luego habéis formado parte de mi vida...vosotros no necesitáis que os diga nada más, me conocéis demasiado y no hacen falta palabras...

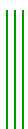
A la "**Txutxi**" y **Karlos**, simplemente por ser como sois, no cambiéis nunca...

A mis demás amigos, de aquí y de allí..., por llevar tanto tiempo formando parte de mi vida y apoyarme siempre.

A toda mi familia, especialmente a mis abuelas **Lucía y Reyes**, gracias por estar siempre ahí..

Y muy especialmente a mi hermana **María** y mis padres **José Miguel y Romero**, gracias a vosotros soy lo que soy y no tengo palabras para agradeceros tanto....

¡GRACIAS!



Objetivos

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

- Evaluar la implicación de las fracciones volátil y no volátil de los vinos en las propiedades sensoriales percibidas en boca.
- Estudiar la implicación de distintos compuestos o grupos de compuestos no volátiles en las propiedades senso-gustativas de vinos tintos, especialmente sobre la astringencia.
- Generar perfiles sensoriales y químicos de vinos tintos para construir modelos matemáticos que correlacionen los descriptores senso-gustativo encontrados en los vinos y su composición química no volátil.
- Estudiar la evolución de las propiedades sensoriales y de la composición no volátil de vinos tintos durante el envejecimiento en botella bajo diferentes regímenes de oxígeno.

Estructura

La presente memoria se articula en torno a 4 secciones que constan de los siguientes capítulos:

SECCIÓN I Introducción general. Revisión bibliográfica acerca de la contribución sensorial de las moléculas no volátiles a las propiedades de los vinos y evolución de las propiedades senso-químicas durante el envejecimiento en botella.

SECCIÓN II Estudio de la contribución de la matriz no volátil a las características gustativas de los vinos tintos.

Presentación de la sección. Breve introducción bibliográfica y objetivos generales de la sección.

Capítulo I Contribución de las fracciones no volátil y volátil en las propiedades sensoriales en boca de los vinos tintos: Estrategias de reconstrucción química y clasificación sensorial.

Capítulo II Reflexiones sobre la base química de la astringencia de los vinos tintos españoles.

Capítulo III Asignación de calidad: Una aproximación experimental para la evaluación de la base química responsable de la calidad en boca de los vinos tintos

SECCIÓN III Estudio de la evolución sensorial y de la composición no volátil del vino tinto durante el envejecimiento en botella. Efecto de la concentración inicial de oxígeno.

Presentación de la sección. Breve introducción bibliográfica, objetivos generales de la sección y descripción del ensayo.

Capítulo I Evolución de las propiedades sensoriales de vinos tintos después del embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno.

Capítulo II Evolución de la composición no volátil de los vinos tintos durante la etapa de embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno.

Capítulo III Evolución del color y la composición antociánica de vinos tintos durante el periodo de envejecimiento en botella. Efecto de distintas concentraciones de oxígeno.

SECCIÓN IV Conclusiones globales.



Índice

| | |
|---|-----------|
| INTRODUCCIÓN GENERAL. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA | 1 |
| 1. Introducción | 3 |
| 2. Sabor y sensaciones táctiles generadas por compuestos no volátiles | 5 |
| 2.1. El sabor y los compuestos no volátiles | 5 |
| 2.1.1. Dulzor | 5 |
| 2.1.2. Acidez | 8 |
| 2.1.3. Salado | 10 |
| 2.1.4. Umami | 11 |
| 2.1.5. Amargor | 11 |
| 2.2. Compuestos químicos que provocan sensaciones de astringencia | 16 |
| 3. Interacciones sabor-sabor y sabor-astringencia | 22 |
| 4. Evolución de las propiedades sensoriales y químicas durante el envejecimiento en botella | 24 |
| 5. Bibliografía | 27 |
| SECCIÓN II. Estudio de la contribución de la matriz no volátil a las características gustativas de los vinos tintos. | 39 |
| Presentación | 41 |
| 1. Introducción | 41 |
| 2. Objetivos generales | 44 |
| 3. Bibliografía | 45 |
| Capítulo I. Contribución de las fracciones no volátil y volátil en las propiedades sensoriales en boca de los vinos tintos: Estrategias de reconstrucción química y clasificación sensorial. | 47 |
| 1. Introducción | 47 |
| 2. Material y métodos | 50 |
| 2.1. Estudio piloto | 50 |
| 2.1.1. Muestras | 50 |
| 2.1.2. Análisis químicos | 52 |
| 2.1.3. Prueba de clasificación. (Sorting task) | 52 |
| 2.1.4. Análisis de datos | 54 |
| 2.2. Estudio a gran escala | 55 |
| 2.2.1. Análisis de datos | 57 |

| | |
|--|------------|
| 3. Resultados y discusión | 58 |
| 3.1. Estudio piloto | 58 |
| 3.2. Estudio a gran escala | 60 |
| 3.2.1. Análisis químicos | 60 |
| 3.2.2. Análisis de la prueba de clasificación | 62 |
| 4. Conclusiones | 70 |
| 5. Bibliografía | 71 |
| Capítulo II. Reflexiones sobre la base química de la astringencia de los vinos tintos españoles. | 73 |
| 1. Introducción | 73 |
| 2. Material y métodos | 75 |
| 2.1. Vinos | 75 |
| 2.2. Análisis sensorial descriptivo | 75 |
| 2.3. Análisis químicos | 76 |
| 2.3.1. Reactivos | 76 |
| 2.3.2. Análisis de la composición no volátil por GPC-HPLC-DAD-MS | 80 |
| 2.3.3. Determinación del contenido total de proantocianidinas (TPAs) | 81 |
| 2.3.4. Análisis de parámetros convencionales en vinos | 82 |
| 2.3.5. Análisis de proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs) | 82 |
| 2.4. Pruebas triangulares con muestras fortificadas | 82 |
| 2.5. Análisis estadísticos | 83 |
| 3. Resultados y discusión | 85 |
| 3.1. Análisis sensorial descriptivo por el panel entrenado | 85 |
| 3.2. Relación entre propiedades sensoriales en boca y composición química | 86 |
| 3.2.1. Dulzor | 86 |
| 3.2.2. Acidez | 86 |
| 3.2.3. Astringencia | 87 |
| 3.3. Pruebas triangulares para evaluar el impacto sensorial de los compuestos no volátiles | 91 |
| 4. Conclusiones | 95 |
| 5. Bibliografía | 96 |
| Capítulo III. Asignación de calidad: Una aproximación experimental para la evaluación de la base química responsable de la calidad en boca de los vinos tintos. | 101 |
| 1. Introducción | 101 |
| 2. Material y métodos | 104 |



| | |
|--|------------|
| 2.1. Vinos | 104 |
| 2.2. Análisis de la composición de la matriz no volátil | 104 |
| 2.2.1. Reactivos y estándares | 104 |
| 2.2.2. Parámetros enológicos convencionales | 104 |
| 2.2.3. Análisis de la composición no volátil por GPC-UPLC-MS | 105 |
| 2.2.4. Determinación del contenido total en proantocianidinas (TPAs) | 105 |
| 2.2.5. Análisis de proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs) | 107 |
| 2.3. Análisis sensorial | 107 |
| 2.3.1. Análisis descriptivo por un panel entrenado | 107 |
| 2.3.2. Evaluación de la calidad por expertos | 108 |
| 2.4. Análisis de datos | 109 |
| 2.4.1. Análisis sensorial descriptivo | 109 |
| 2.4.2. Relación entre la composición química y sensorial | 109 |
| 2.4.3. Análisis clúster basando en las puntuaciones de calidad | 109 |
| 2.4.4. Relación entre la composición química y evaluación de la calidad: mapa de calidad | 109 |
| 3. Resultados y discusión | 111 |
| 3.1. Análisis del comportamiento del panel | 111 |
| 3.2. Intensidad global y persistencia evaluados en boca | 111 |
| 3.3. Actividad sensorial | 113 |
| 3.3.1. Acidez | 113 |
| 3.3.2. Amargor | 114 |
| 3.3.3. Astringencia | 115 |
| 3.4. Evaluación de la calidad por el panel de expertos | 118 |
| 3.4.1. Correlación entre las variables químicas y la calidad evaluada | 118 |
| 4. Conclusiones | 124 |
| 5. Bibliografía | 125 |
| SECCIÓN III. Estudio de la evolución sensorial y de la composición no volátil del vino tinto durante el envejecimiento en botella. Efecto de la concentración inicial de oxígeno. | 129 |
| Presentación | 131 |
| 1. Introducción | 131 |
| 2. Objetivos generales | 134 |
| 3. Descripción del ensayo | 135 |
| 3.1. Selección de los vinos | 135 |

| | |
|--|------------|
| 3.2. Elección de las dosis de O ₂ | 135 |
| 3.3. Llenado de los vinos y dosificación de O ₂ | 136 |
| 3.4. Test triangular. Selección de muestras con diferencias sensoriales | 138 |
| 3.4.1. Objetivo y procedimiento de la prueba triangular | 138 |
| 3.4.2. Resultados de la prueba triangular | 139 |
| 4. Bibliografía | 141 |
| Capítulo I. Evolución de las propiedades sensoriales de vinos tintos después del embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno. | 145 |
| 1. Introducción | 145 |
| 2. Material y métodos | 148 |
| 2.1. Vinos | 148 |
| 2.2. Análisis sensorial descriptivo | 148 |
| 2.2.1. Entrenamiento del panel | 148 |
| 2.2.2. Evaluación de los vinos | 150 |
| 2.3. Análisis de datos | 151 |
| 2.3.1. Análisis del comportamiento del panel | 151 |
| 2.3.2. Cálculo de la frecuencia de citación (FC) de los descriptores aromáticos y creación de términos combinados | 152 |
| 2.3.3. Análisis multivariante con los datos descriptivos | 152 |
| 3. Resultados y discusión | 154 |
| 3.1. Comportamiento del panel entrenado | 154 |
| 3.2. Caracterización de los vinos iniciales (antes del envejecimiento) | 155 |
| 3.2.1. Atributos aromáticos evaluados orthonasalmente | 155 |
| 3.2.2. Atributos evaluados en boca | 159 |
| 3.3. Evolución de las propiedades sensoriales tras el envejecimiento en botella | 160 |
| 3.3.1. Evolución del aroma orthonasal | 160 |
| 3.3.2. Evolución de los atributos en boca | 172 |
| 4. Conclusiones | 175 |
| 5. Bibliografía | 176 |
| Capítulo II. Evolución de la composición no volátil de los vinos tintos durante la etapa de embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno. | 181 |
| 1. Introducción | 181 |
| 2. Material y métodos | 184 |
| 2.1. Vinos | 184 |



| | |
|--|------------|
| 2.2. Análisis químicos | 184 |
| 2.2.1. Reactivos | 184 |
| 2.2.2. Análisis de parámetros convencionales | 184 |
| 2.2.3 Análisis de proantocianidinas precipitables con proteínas (TPAs) en vinos | 185 |
| 2.2.4 Determinación del índice de etanol en vinos | 185 |
| 2.2.5 Fraccionamiento de los polifenoles del vino mediante cromatografía en permeación en gel (GPC)-SPE | 185 |
| 2.2.6. Análisis de compuestos de bajo peso molecular por UPLC-MS en la F1 | 186 |
| 2.2.7 Análisis de ácidos orgánicos mediante UPLC-MS en la F1 | 186 |
| 2.2.8 Determinación del contenido en proantocianidinas (TPAs) poliméricas mediante el índice de la vainillina en la F2 | 186 |
| 2.2.9 Determinación del grado medio de polimerización de la F2 | 186 |
| 2.3. Análisis estadísticos | 188 |
| 3. Resultados y discusión | 189 |
| 3.1. Caracterización química de los vinos antes del envejecimiento | 189 |
| 3.2 Efecto del envejecimiento en la composición química | 198 |
| 3.2.1. Efecto del envejecimiento en la composición química global | 198 |
| 3.2.2. Efecto del envejecimiento en la composición química del clúster 1 | 200 |
| 3.2.3. Efecto del envejecimiento en la composición química del clúster 2 | 203 |
| 3.2.4. Efecto del envejecimiento en la composición química del clúster 3 | 206 |
| 3.2.5. Efecto del envejecimiento en la composición química del clúster 4 | 209 |
| 3.3. Relación entre los cambios sensoriales en boca y los cambios químicos en la matriz no volátil | 212 |
| 3.3.1. Correlación entre la variación del amargor y los cambios químicos en la matriz no volátil | 212 |
| 3.3.2. Correlación entre la variación de la astringencia y los cambios químicos en la matriz no volátil | 216 |
| 3.3.3. Correlación entre la variación de la intensidad global y la persistencia durante el envejecimiento | 218 |
| 4. Conclusiones | 220 |
| 5. Bibliografía | 221 |
| Capítulo III. Evolución del color y la composición antocianica de vinos tintos durante el periodo de envejecimiento en botella. Efecto de distintas concentraciones de oxígeno. | 227 |
| 1. Introducción | 227 |
| 2. Material y métodos | 231 |
| 2.1. Vinos | 231 |

| | |
|---|------------|
| 2.2. Análisis químicos | 231 |
| 2.2.1. Reactivos | 231 |
| 2.2.2. Análisis de los parámetros de color clásicos. | 231 |
| 2.2.3. Análisis de antocianos por UPLC-UV-Vis-MS. | 231 |
| 2.2.4. Medidas colorimétricas | 232 |
| 2.2.5. Determinación del contenido en pigmentos poliméricos | 232 |
| 2.2.6. Determinación del contenido de antocianos copigmentados | 233 |
| 2.3. Análisis estadísticos | 233 |
| 3. Resultados y discusión | 234 |
| 3.1. Coordenadas de color y composición antocianica de los vinos antes del envejecimiento | 234 |
| 3.2. Definición del espacio de color de los vinos antes del envejecimiento. Análisis de componentes principales (PCA) | 239 |
| 3.3. Evolución de los parámetros de color y composición antocianica tras el envejecimiento en botella | 246 |
| 3.3.1. Evolución global | 246 |
| 3.3.2. Evolución del clúster 1 | 248 |
| 3.3.3. Evolución del clúster 2 | 252 |
| 3.3.4. Evolución del clúster 3 | 256 |
| 4. Conclusiones | 263 |
| 5. Bibliografía | 264 |
| CONCLUSIONES GENERALES. | 269 |
| ANEXOS | 273 |
| PUBLICACIONES | 301 |



Introducción general, revisión bibliográfica



SECCIÓN I.

Introducción general, revisión bibliográfica.

1. INTRODUCCIÓN

La calidad del vino se considera una variable compleja y multidimensional que está formada tanto por dimensiones intrínsecas como por dimensiones extrínsecas [1]. Las dimensiones extrínsecas son propiedades que no son físicamente parte del vino, como región, añada, diseño de la etiqueta, enólogo, peso de la botella, presencia / ausencia de premios etc. mientras que las dimensiones intrínsecas son las relacionados con el vino en sí y no pueden modificarse una vez que se embotella el producto. Estas propiedades están vinculadas a las propiedades organolépticas tales como el aroma, sabor, color o sensación en la boca [2, 3]. En general, los juicios de calidad desarrollados por los enólogos y expertos del vino están basados exclusivamente en las propiedades intrínsecas. Sin embargo, para los consumidores la percepción de la calidad del vino depende en gran medida no sólo sobre las propiedades intrínsecas, sino también en sus propiedades extrínsecas. [1, 4, 5].

Puesto que el vino desempeña principalmente un papel hedónico, la calidad está muy relacionada con sus propiedades organolépticas y por tanto con las propiedades intrínsecas ligadas a la experiencia global del flavor percibido durante su consumo [6]. La percepción del flavor es el resultado de la combinación de todas las sensaciones percibidas en las cavidades bucal y nasal, incluyendo aroma, sabor y sensaciones táctiles. Por esta razón, el conocimiento del comportamiento del flavor del vino y su control son esenciales para proporcionar a la industria vitivinícola criterios objetivos para el desarrollo de programas que hagan que la percepción de calidad de sus productos aumente. Mediante el conocimiento de los factores que afectan a las propiedades sensoriales responsables de defectos y virtudes, la industria del vino sería capaz de controlar las características del producto final desde las primeras etapas de elaboración.

En los últimos años, la bibliografía elaborada en torno al mundo del vino revela la importancia que los investigadores dan al conocimiento del flavor. La mayoría de los trabajos se refieren a la implicación de los compuestos volátiles en el aroma percibido. De hecho, el uso de análisis olfatométricos (la técnica GC-O, que usa la cromatografía de gases [GC] como método de separación y la nariz humana como detector) ha sido aplicado con éxito en la investigación enológica y ha dado lugar a la clasificación del impacto de las moléculas responsables de las propiedades aromáticas del vino [7-9]. Estas técnicas olfatométricas combinadas con el desarrollo de estrategias para el

aislamiento, identificación y cuantificación de estos compuestos, y junto con el análisis sensorial, han hecho posible acercarse a la predicción del aroma del vino a partir de su composición química.

En lo referente a las moléculas no volátiles y el gusto la bibliografía es más limitada y es en los últimos años cuando algunos autores comienzan a hablar de "gustatometrias" y "gustatogramas" (técnica HPLC-G, que usa la cromatografía líquida [HPLC] como método de separación y el gusto humano como detector) [10-13]. Esta técnica ha resultado ser una estrategia eficaz capaz de evaluar la implicación de la matriz no volátil en el flavor del vino.

A pesar de la importancia de conocer la implicación real de la composición no volátil en el flavor del vino, en la actualidad se está muy lejos de resolver este puzle. Dicha importancia se ha puesto de manifiesto en repetidas ocasiones en la bibliografía. Así, Breslin [14] señaló que los compuestos no volátiles, principalmente responsables del sabor y de las sensaciones táctiles, crean la base psicológica-sensorial del flavor sobre la que se construye el aroma y de ahí la importancia que tiene el conocimiento no sólo de la composición volátil, sino también del sabor y las sensaciones táctiles para llegar a comprender el flavor. En línea con esto, existen resultados experimentales que muestran que la matriz no volátil de un vino ejerce una poderosa influencia sobre la liberación de sustancias odorantes, lo suficientemente fuerte como para hacer que incluso el aroma de un vino blanco se perciba como el aroma de un vino tinto y viceversa, e incluso como para crear ciertas diferencias en el aroma percibido entre los vinos tintos [15]. De hecho, ha quedado igualmente demostrado que una misma matriz volátil sobre distintas matrices no volátiles no es capaz de homogeneizar el flavor percibido [16]. Por lo tanto, es evidente que para llegar a comprender el flavor del vino a partir de la composición química, el estudio de la composición no volátil resulta fundamental.

Aunque existen muchos estudios que han caracterizado la composición no volátil en vinos, en especial en vinos tintos [12, 13, 17-19] el conocimiento de su implicación en el perfil oro-sensorial (sabor y sensaciones táctiles) y el flavor del vino aún está lejos de ser evidente y se encuentra todavía en una fase de estudio inicial. Por esta razón, a continuación se pretende ofrecer una visión general del estado actual del conocimiento sobre las moléculas no volátiles del vino con actividad sensorial, analizando su capacidad para afectar o alterar el sabor y la astringencia. Además se abordará la importancia de las interacciones sensoriales en la percepción de dichas sensaciones.

2. SABOR Y SENSACIONES TÁCTILES GENERADAS POR COMPUESTOS NO VOLÁTILES

2.1. El sabor y los compuestos no volátiles

2.1.1. Dulzor.

Los umbrales sensoriales de percepción disponibles en la actualidad de los compuestos con contribución dulce, así como la prueba con la que se estableció, medio en que se realizó y referencia bibliográfica de donde se ha obtenido se muestra en la Tabla I-1.

Durante los últimos años, los azúcares reductores, especialmente la glucosa y la fructosa han sido descritos como los principales contribuyentes al sabor dulce del vino [20]. Igualmente, se ha señalado que la sensación de dulzor se ve potenciada por la presencia de glicerol [21] y etanol [22-24].

En relación al primero, se ha demostrado que este compuesto, dependiendo de su concentración y del tipo de vino, genera un efecto perceptible en el dulzor [12, 25]. De hecho, análisis sensoriales dirigidos a conocer la implicación del glicerol en la percepción de dulzor, fijaron en $5,2 \text{ g L}^{-1}$ el umbral sensorial en un vino blanco seco [25] y de 7.5 g L^{-1} en un vino tinto seco para este compuesto [12]. Sin embargo, no es probable que el glicerol contribuya al dulzor en los vinos dulces, ya que su contenido en azúcares reductores, por lo general, se encuentra en un intervalo de concentración entre 30 y 60 g L^{-1} y por lo tanto estos azúcares actuarán como el principal motor de la percepción de dulzor. Respecto al etanol, se ha demostrado que proporciona un ligero dulzor en disoluciones sintéticas con un contenido de etanol que oscila desde el 2% al 4% [26-28], sin embargo, en las concentraciones típicas de vino ($> 10\% \text{ v/v}$), el etanol genera comúnmente sensaciones amargas o irritantes [29, 30].

Por otra parte, recientemente el grupo de investigación del profesor Hofmann realizó una reconstitución cuantitativa de la fracción no volátil de un vino tinto seco [12] combinando el aislamiento de compuestos activos del sabor y su posterior análisis sensorial. Este estudio mostró diferentes compuestos con propiedades dulces, entre ellos 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). Con el objetivo de evaluar cuál era el impacto sensorial de estos compuestos en el vino, se calculó la concentración por encima del umbral de percepción o factor DOT (*dose-over-threshold*, relación entre la concentración del compuesto y su umbral sensorial). Los

resultados mostraron que solo la L- fructosa y el glicerol obtuvieron DoTs superiores a 1, lo que significa que podrían contribuir significativamente al dulzor del vino de estudio. Además, la glucosa, el 1,2-propanodiol, el mioinositol y la L-prolina también podrían modificar el sabor dulce percibido en el vino, puesto que se encontraron en concentraciones cercanas a su umbral sensorial. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Blackman y col. [31], los cuales han confirmado la implicación de fructosa y glicerol en el dulzor de una serie de vinos blancos [28]. Resulta interesante anotar que en este mismo trabajo no se encontró correlación significativa entre la concentración de glucosa y el dulzor, al igual que en otros trabajos realizados con vinos tintos secos [32, 33, 34].

Tabla I-1. Compuestos con sabor dulce detectados en vino. Umbrales de percepción, tipo de prueba sensorial, medio y referencia.

| Compuesto | Umbral sensorial (g L ⁻¹) | Prueba sensorial | Medio | Referencia |
|-----------------------------|---------------------------------------|------------------|-------|------------|
| Aldosas y cetosas | | | | |
| Fructosa | 1.84 | TDA | agua | [13] |
| Glucosa | 3.24 | TDA | agua | [13] |
| Arabinosa | 2.66 | TDA | agua | [13] |
| Galactosa | 9.00 | TDA | agua | [13] |
| Xilosa | 1.88 | TDA | agua | [13] |
| Ramnosa | 1.144 | TDA | agua | [13] |
| alditoles | | | | |
| Glicerol | 7.48 | TDA | agua | [13] |
| 1,2-propanodiol | 3.36 | TDA | agua | [13] |
| Inositol | 3.18 | TDA | agua | [13] |
| Manitol | 7.28 | TDA | agua | [13] |
| Arabitol | 6.57 | TDA | agua | [13] |
| Eritriol | 4.43 | TDA | agua | [13] |
| Sorbitol | 6.16 | TDA | agua | [13] |
| Ribitol | 6.89 | TDA | agua | [13] |
| Aminoácidos | | | | |
| L-prolina | 2.88 | TDA | agua | [13] |
| L-alanina | 1.07 | TDA | agua | [13] |
| Glicina | 1.88 | TDA | agua | [13] |
| L-metionina | 0.75 | TDA | agua | [13] |
| L-serina | 2.63 | TDA | agua | [13] |
| L-treonina | 4.17 | TDA | agua | [13] |
| Proteínas | | | | |
| Hsp12p | na | | | [38] |
| Compuestos fenólicos | | | | |
| Ácido vainillíco | na | | | [35] |
| Ácido siringico | na | | | [35] |
| Ácido ferúlico | na | | | [35] |
| Triterpenoides | | | | |
| Quercotriterpenoide I | na | | | [10] |
| Quercotriterpenoide II | na | | | [10] |

na: no disponible

TDA: prueba de comparación por pares con diluciones sucesivas del compuesto, utilizado como referencia una disolución más diluida que la disolución objeto de estudio

Compuestos fenólicos como los ácidos siríngico, vainílico y ferúlico han sido descritos como ligeramente dulces [35], sin embargo, a los niveles de concentración que se encuentran en el vino, su impacto en el dulzor parece ser limitado. Dicho dulzor puede ser el resultado de interacciones sensoriales del tipo aroma-sabor, ya que estos compuestos suelen ir acompañados por notas aromáticas dulces [36], que pueden potenciar el dulzor percibido en boca.

Del mismo modo, numerosos aminoácidos han sido descritos como dulces, a pesar de que, a excepción de la prolina, no es probable que puedan ser responsables de una contribución perceptible al sabor dulce del vino [37]. Se ha anotado que la prolina presenta un umbral sensorial para el dulzor de 3.2 g L^{-1} en agua, concentración a la que se ha encontrado en un blanco elaborado con la variedad Scheurebe. Este hecho sugiere la posible implicación sensorial de la prolina en ciertos vinos.

Igualmente, la proteína Hsp12p ha resultado implicada en la percepción del sabor dulce en vinos secos [38]. Esta proteína es liberada por la autólisis de una levadura (cepa salvaje llamada Δ _HSP12) durante el contacto con lías y podría ser un inductor importante de la percepción del dulzor del vino.

Por otro lado, la presencia de manitol (polialcohol de seis átomos de carbono y producto final de la reducción de la fructosa) en concentraciones superiores a 40 mg L^{-1} está relacionado con el picado láctico o fermentación manítica y con un aumento en la percepción de dulzor en algunos vinos [41]. Esta enfermedad causada por algunas bacterias heterolácticas y bajo ciertas condiciones (temperatura mayor que $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante la fermentación), provoca viscosidad y un sabor dulce ligeramente avinagrado [41].

Recientemente se ha puesto de manifiesto que durante el envejecimiento en barricas de roble existe una cesión de compuestos potencialmente dulces que hacen modificar la percepción del vino tras el envejecimiento [42]. A la vista del efecto que ejerce el aroma sobre la percepción de los distintos sabores [32] en este estudio se comprobó que la modificación en la percepción del sabor dulce no estaba influenciada por el enriquecimiento del vino en volátiles procedentes de la madera como la vainillina o la β -metil- γ -octo lactona (nota a coco). Estos resultados, corroboraron que existe una migración de moléculas no volátiles al vino que hacen aumentar la percepción de dulzor [42]. En un intento de comprobar qué moléculas aumentan la percepción de dicho dulzor, Marchal y col. [10] aislaron y fraccionaron extractos de roble para comprobar la contribución de éstos en las propiedades sensoriales de los vinos. Los resultados mostraron que existía una fracción muy intensa y con sabor dulce que contenía 2

terpenoides isómeros capaces de modificar el dulzor en un vino blanco seco. A estos compuestos los denominaron Quercotirterpenide I y Quercotriterpenoide II.

2.1.2. Acidez.

Los umbrales sensoriales de percepción disponibles en la actualidad de los compuestos con contribución ácida, así como la prueba con la que se estableció, medio en el que se realizó la prueba y referencia bibliográfica de donde se ha obtenido se muestra en la Tabla I-2.

La acidez, tanto en mosto como en vino, tiene un impacto directo en las propiedades sensoriales de los vinos [43], de hecho la acidez sensorial se ha demostrado que presenta una correlación positiva con la acidez total, y negativa con los valores de pH [31]. En la literatura se afirma que los ácidos orgánicos no volátiles son los principales responsables de la acidez y de la modificación de la sensación de acidez en los vinos. Estos ácidos pueden contribuir generando una sensación agradable y refrescante [44] y sin embargo, en exceso son capaces de inducir una acidez desagradable. Este hecho es especialmente cierto en el caso de los ácidos tartárico y málico, que a concentraciones altas ($> 5 \text{ g L}^{-1}$) imparten un sabor fuerte y desagradable al vino [45, 46]. Los ácidos cítrico y láctico contribuyen a la acidez de los mostos y los vinos respectivamente, siendo descrita su acidez como "refrescante" en el caso del ácido cítrico y como "agradable" o "suave" en el caso del ácido láctico. Los ácidos oxálico y succínico están presentes en muy baja concentración en las uvas aumentando sus niveles en el vino [43, 47, 48], de hecho el ácido succínico parece ser un buen indicador de la acidez en ciertas muestras de vino tinto [49]. Además, se ha señalado que el ácido succínico presenta un "inusual sabor salado y amargo" en el vino [47]. En línea con estos datos, Hufnagel y Hofmann [13] observaron que los ácidos D-galacturónico y L-tartárico en un vino tinto seco son estímulos importantes del sabor ácido encontrándolos en concentraciones 10 veces por encima de su umbral sensorial. Además, los ácidos acético, succínico, L-málico y L-láctico parecen ser compuestos sensorialmente activos en el vino, ya que se encontraron en concentraciones ligeramente más altas que su umbral sensorial para la acidez. Otros ácidos carboxílicos, tales como maléico, fórmico, glutámico, isocítrico y aconítico, están presentes en concentraciones inferiores a su umbral sensorial y, por tanto, no es probable que tengan un impacto significativo en la acidez del vino.

Por otro lado, el intento de reducir el uso de anhídrido sulfuroso en la enología ha hecho común el uso de otro tipo de antioxidantes como puede ser el ácido ascórbico o vitamina C [50]. Éste se recomienda adicionarlo a niveles semejantes a su umbral

sensorial (0.13 g L^{-1}), pero el hecho de que se oxide rápidamente hace pensar que su contribución a la acidez en un medio tan fuertemente tamponado como es el vino parece improbable.

Tabla I-2. Compuestos con sabor ácido detectados en vino. Umbrales de percepción, tipo de prueba sensorial, medio y referencia.

| Compuesto | Umbral sensorial (mg L^{-1}) | Prueba sensorial | Medio | Referencia |
|-------------------------------|---|--------------------------------|---------|------------|
| Ácidos orgánicos | | | | |
| Ácido tartárico | 44 | Prueba triangular ^a | Agua | [13] |
| | 200 | n.e. ^b | Agua | [37] |
| Ácido galacturónico | 125 ^c | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Ácido acético | 119 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| | 122 | n.e. | Agua | [37] |
| Ácido succínico | 106 | Prueba triangular | Agua | [53] |
| | 47 | n.e. | Agua | [37] |
| Ácido málico | 494 | Prueba triangular | Agua | [53] |
| | 76 | n.e. | Agua | [37] |
| Ácido láctico | 1393 | Prueba triangular | Agua | [37] |
| | 1400 | n.e. | Agua | [37] |
| Ácido cítrico | 499 | Prueba triangular | Agua | [53] |
| | 350 | n.e. | Agua | [37] |
| Ácido glutárico | 413 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Ácido fórmico | 187 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Ácido isocítrico | 1018 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Ácido maleico | 348 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Ácido <i>cis</i> -aconítico | 87 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Ácido <i>trans</i> -aconítico | 87 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Ácido oxálico | 506 | Prueba triangular | Agua | [53] |
| | 50 | n.e. | Agua | [37] |
| Ácido ascórbico | 134 | Prueba triangular | Agua | [53] |
| Aminoácidos | | | | |
| Ácido γ -aminobutírico | 0.4 | n.e. | Agua | [37] |
| Ácidos fenólicos | | | | |
| Ácido sináptico | 20 ^d | n.e. | Cerveza | [54] |
| Ácido clorogénico | 20 ^d | n.e. | Cerveza | [54] |

^a Umbrales de detección determinados para la acidez en una prueba triangular usando agua corriente (pH 6.5) como disolvente [57].

^b n.e. = no especificado. Metodología para la evaluación del reconocimiento de umbrales sensoriales no especificada en la referencia.

^c Umbral sensorial para acidez y astringencia.

^d Umbral sensorial para acidez y amargor.

Igualmente, también se ha encontrado que el aminoácido ácido aminobutírico presenta sabor ácido siendo su umbral sensorial de 0.4 mg L^{-1} en agua [37]. Sin embargo, a pH similares a los del vino la sensación de acidez que induce este compuesto se hace mucho más patente [51]. A pesar de ello, su participación en el sabor ácido de los vinos parece no ser significativa, ya que aunque su concentración oscila entre 3.14 y

47 mg L⁻¹ en vinos tintos franceses [52] (10 y 100 veces mayor que su umbral sensorial), estas concentraciones en un medio tan tamponado como el vino y en comparación con la concentración de los ácidos orgánicos resultan ser insignificantes.

Comúnmente, los ácidos fenólicos con un grupo carboxílico se describen como ácidos. Sin embargo, los umbrales sensoriales determinados en agua oscilan entre 20 y 50 mg L⁻¹ para los ácidos hidroxicinámicos [55, 56]. Por lo tanto, la contribución de estas moléculas a la acidez de un vino parece poco probable debido al medio tamponado. En esta línea Verette y col. [56], concluyeron que la adición de 150 mg L⁻¹ de ácido cafeico y sus ésteres no inducía ningún cambio en la percepción de acidez en el vino. Una excepción puede ser el ácido clorogénico, el cual presenta un umbral sensorial para la acidez y el amargor de 20 mg L⁻¹ y se ha encontrado en concentraciones de alrededor de 30 mg L⁻¹ en vinos de hielo (icewines), tanto procedentes de uvas naturalmente congeladas como de uvas congeladas en congelador [57]. Por lo tanto, este ácido fenólico podría tener un impacto en el sabor ácido de este tipo de vinos. De manera similar, los ácidos benzoicos tales como los ácidos gentísicos son igualmente ácidos, aunque se han descrito también como amargos, astringentes, dulces o agrios en diferentes concentraciones dependiendo de su estructura [36]. Sin embargo, su impacto sensorial en la acidez del vino no puede ser estimado ya que sus umbrales sensoriales no han sido determinados hasta el momento.

Además, disoluciones de péptidos de bajo peso molecular encontrados en los vinos se han descrito como ácidas (por ejemplo, el dipéptido fenil-lisina). Sin embargo, estos péptidos se han encontrado en concentraciones muy por debajo de su umbral sensorial en el vino, por lo que, su impacto sensorial parece ser limitado [57].

2.1.3. Salado.

El sabor salado se ha asociado principalmente con cationes inorgánicos [13], tales como potasio, magnesio y sodio. Se sabe que el potasio, además de salado presenta un sabor amargo a concentraciones más altas (> 1 g L⁻¹) [13].

Aunque la salinidad no se ha detectado, o no ha sido evaluada en la mayoría de los estudios que tratan de vinos tintos y sus propiedades sensoriales [11, 13, 29, 58], este sabor ha sido descrito en vinos elaborados con variedades de uva blanca como Listan Blanco [59, 60], Gual y Verdello [60]. Por otra parte, Scacco y col. [61] encontraron recientemente que el atributo salado aumentó con el incremento de la salinidad del suelo en el vino tinto Nero d'Avola. Estos hechos apuntan que son necesarios más

estudios que combinen el análisis sensorial (evaluando el sabor salado) y la composición química para llegar a conocer los compuestos implicados en dicho sabor.

2.1.4. Umami.

El umami está ampliamente reconocido como el quinto sabor primario. Tiene su origen etimológico en una palabra japonesa que significa “sabroso”. El glutamato monosódico ha sido muy utilizado como un estándar de referencia para el entrenamiento de paneles sensoriales en el sabor umami en concentraciones de 3 mmol L⁻¹ [58].

Recientemente, las investigaciones acerca de los principios activos del sabor en extractos de levadura ricos en nucleótidos han conducido al descubrimiento de (R)- y (S)-N²-(1-carboxietil)-guanosina 50-monofosfato como posibles potenciadores del sabor umami en disoluciones acuosas. Estas moléculas se forman en la reacción de Maillard de guanosina 50-monofosfato (50-GMP) con dihidroxiacetona y gliceraldehído, respectivamente.

También es conocido que ciertos aminoácidos pueden conferir sabor umami como son el ácido glutámico, el ácido aspártico, D y L-Alanina [62]. Igualmente, se observó que el tripéptido Lys-Met-Asn aislado a partir de un vino blanco presentaba sabor umami [57]. Sin embargo, tanto en el caso de los aminoácidos como en el caso del tripéptido el impacto sensorial real en el vino no se ha establecido, ya que ni han sido cuantificados ni se han determinado sus umbrales sensoriales.

Es destacable, que al igual que lo que ocurre con otros compuestos en otros atributos [16, 30], parece que la estereoquímica de los aminoácidos también influye en el sabor que producen, teniendo por ejemplo una mayor contribución al sabor umami la D-alanina que la L-Alanina [63].

En general, los resultados del análisis sensorial en vinos sugieren que aunque algunas moléculas aisladas del vino presentan sabor umami, este sabor parece estar presente en los vinos [11, 58].

2.1.5. Amargor.

Los umbrales sensoriales de percepción disponibles en la actualidad de los compuestos con contribución amarga, así como la prueba con la que se estableció, medio en el que se realizó la prueba y referencia bibliográfica de donde se ha obtenido se muestra en la Tabla I-3.

Hasta la actualidad se han realizado multitud de ensayos encaminados a correlacionar los datos analíticos de los distintos componentes del vino con los datos

sensoriales obtenidos a partir de paneles entrenados. Sin embargo, hasta hace poco tiempo había sido imposible crear un modelo predictivo para el amargor [17, 64, 65], existiendo hasta la fecha solo un trabajo donde se propone un modelo predictivo para este atributo en la fracción del vino descrita como amarga [66]. En este modelo aparecen como contribuyentes positivos del amargor un ácido hidroxicinámico, un flavanol monomérico y dos dímeros, un flavanol, cuatro antocianos y como contribuyente negativo a dicho sabor un ester etílico de ácido hidroxibenzoico. Sin embargo, en dicho trabajo no se ha encontrado correlación entre el sabor amargo de dicha fracción y el vino.

La percepción del sabor amargo en vinos ha estado relacionada en la mayoría de los trabajos con los compuestos fenólicos de bajo peso molecular tales como agliconas de flavonoles, especialmente miricetina o quercetina [17, 33, 66], así como a flavanoles monoméricos o de bajo peso molecular [12, 68, 69-71].

Respecto a los flavanoles monoméricos, hace mucho tiempo que han sido descritos como los principales contribuyentes al amargor [29] y se ha demostrado que su impacto sensorial es menor con un grado de polimerización inferior [28, 72-74]. Sorprendentemente, y en contraposición a esto Hufnagel y col. [13] concluyeron que los dímeros y trímeros de procianidinas fueron más amargos que la catequina y la epicatequina.

También se ha encontrado que pequeñas diferencias estructurales son capaces de inducir diferencias sensoriales significativas entre ellos. Por ejemplo, la diferencia quiral entre los dos principales flavanoles monoméricos presentes en el vino, produce una diferencia significativa en la percepción del amargor, siendo la (-)-epicatequina significativamente más amarga y con una persistencia mucho más larga en comparación con la (+)-catequina [30]. Este efecto ha sido también puesto de manifiesto para el flavanol dímero B6, que parece ser más amargo que los isómeros B3 o B4 [71]. Derivados de flavanoles con puentes etilo han sido descritos como considerablemente más amargos que flavanoles oligoméricos formados por unión directa [18]. No obstante, en contradicción con lo sugerido en la mayoría de la bibliografía, recientemente se ha descrito que los flavanoles no son de gran importancia para el sabor amargo [12, 66] y, sorprendentemente, se identificaron una serie de ésteres etílicos de ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos como compuestos amargos en el vino, siendo este sabor inducido en concentraciones por debajo de su umbral sensorial. Sin embargo, este tipo de compuestos parece contribuir de forma negativa en el único modelo predictivo existente hasta el momento en la bibliografía

Tabla I-3. Compuestos con sabor amargo detectados en vino. Umbrales de percepción, tipo de prueba sensorial, medio y referencia.

| Compuesto | Umbral sensorial (mg L ⁻¹) | Prueba sensorial | Medio | Referencia |
|---|--|-------------------|-----------|------------|
| Compuestos polifenólicos | | | | |
| Flavanoles | | | | |
| (+)-Catequina | 290 | Prueba triangular | Agua | [75] |
| (-)-Epicatequina | 270 | Prueba triangular | Agua | [75] |
| Galato de epicatequina | 87 | Prueba triangular | Agua | [75] |
| Procianidina C1 | 347 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Procianidina B1 | 231 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Procianidina B2 | 280 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Procianidina B3 | 289 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Trímeros y tetrámeros | 4.1 ^a | Prueba triangular | Agua | [77] |
| Taninos condensados | 0.12 | Diferencia | Agua | [78] |
| Ácidos | | | | |
| Ácido sináptico | 5-20 ^b | n.e. ^c | 5% Etanol | [69] |
| Ácido clorogénico | 10 ^b | n.e. ^c | 5% Etanol | [69] |
| Ácido cútarico | - | n.e. ^c | vino | [66] |
| Ésteres etílicos de ácidos fenólicos | | | | |
| Éster etílico de ácido gálico | 438 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido <i>p</i> -cumárico | 137 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido sirínico | 130 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido vainillínico | 294 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido cafeico | 229 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido ferúlico | 158 | Prueba triangular | Agua | [76] |
| Éster etílico de ácido protocatéquico | 182 | Prueba triangular | Agua | [81] |
| Flavonoles | | | | |
| Quercitina | 10 ^a | Por pares | 5% Etanol | [80] |
| Kaempferol | 20 ^a | Por pares | 5% Etanol | [80] |
| Miricetina | 10 ^a | Por pares | 5% Etanol | [80] |
| Quercetina-3-O-ramnósido | 8.9 ^a | Prueba triangular | Agua | [80] |
| Quercetina-3-rutinosido | - | n.e. ^c | vino | [66] |
| Elagitaninos | | | | |
| Grandinina | 656 | Prueba triangular | Agua | [79] |
| Roburina E | 437 | Prueba triangular | Agua | [79] |
| Vescalagina | 1579 | Prueba triangular | Agua | [79] |
| Castalagina | 1579 | Prueba triangular | Agua | [79] |
| 33-desoxi-33-carboxivescalagina | 640 | Prueba triangular | Agua | [79] |
| Roburina A | 1536 | Prueba triangular | Agua | [79] |
| Roburina D | 1373 | Prueba triangular | Agua | [79] |
| Roburina B | 1160 | Prueba triangular | Agua | [79] |
| Roburina C | 1199 | Prueba triangular | Agua | [79] |

| Compuesto | Umbral sensorial (mg L ⁻¹) | Prueba sensorial | Medio | Referencia |
|---|--|-------------------|-------|------------|
| antocianos | | | | |
| Malvidina-3-O-glucósido-8-etil-(epi)catequina | - | n.e. ^c | vino | [66] |
| Petunidina-3-O-(6'-p-cumaroil)-glucósido | - | n.e. ^c | vino | [66] |
| Vitisina A de malvidina-3-O-(6'-p-cumaroil)-glucósido | - | n.e. ^c | vino | [66] |
| cis-malvidina-3-O-(6'-p-cumaroil)-glucósido | - | n.e. ^c | vino | [66] |
| <u>Compuestos no polifenólicos</u> | | | | |
| Aminoácidos | | | | |
| L-Histidina | 6984 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| L-Valina | 2344 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| L-Isoleucina | 1312 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| L-Fenilalanina | 7434 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| L-Leucina | 1443 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| L-Tirosina | 737 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| L-Arginina | 13065 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| L-Lisina | 11696 | Prueba triangular | Agua | [13] |
| Otros | | | | |
| Acroleína | 10 | n.e. ^c | Vino | [83] |
| Tirosol | 23-30 | n.e. ^c | Vino | [82] |
| Naringina ^d | 6 | n.e. ^c | Agua | [82] |

^a Umbral sensorial para amargor y astringencia

^b Umbral sensorial para amargor y acidez

^c n.e. = no especificado. Metodología para la evaluación del reconocimiento de umbrales sensoriales no especificada en la referencia.

^d Compuesto polifenólico, aunque se sitúa en el grupo de otros.

para el amargor de una fracción vínica [66]. Igualmente, los últimos trabajos al respecto han puesto de manifiesto que algunos ácidos hidroxicinámicos y determinados flavonoles glicosidados pueden contribuir al amargor de los vinos [66].

En esta línea, se ha afirmado que la flavonona glicosilada naringina presenta sabor amargo, sin embargo, su concentración no alcanza su umbral sensorial en vinos, como ha sido observado en muestras elaboradas con la variedad alemana Riesling [84].

Finalmente, en los últimos años y respecto al material polifenólico también se les han atribuido propiedades amargas a determinados antocianos, sugiriendo que pueden resultar ser fuertes contribuyentes al sabor amargo de los vinos tintos además de determinadas frutas [66, 85].

Por otro lado, el amargor procedente de compuestos de tipo no flavonoide en el vino ha sido atribuido tradicionalmente a la producción de tirosol (*p*-hidroxifeniletanol) por

parte de las levaduras. Su contenido promedio en vinos ha sido estimado en un rango entre 2 y 100 mg L⁻¹ [82, 86, 87], con un umbral de detección en el vino entre 20 y 30 mg L⁻¹. Esto sugiere que el tirosol potencialmente puede contribuir al amargor del vino, de acuerdo con la bibliografía [46]. En cuanto a los terpenos glicosilados, se ha encontrado que inducen un sabor amargo de baja intensidad en agua en concentraciones 10 veces más altas que las encontradas en vinos Muscat, sin embargo, su papel en el vino parece ser insignificante [88]. Los péptidos, importante fuente de aminoácidos, han sido descritos como capaces de impartir un cierto amargor [57] con umbrales sensoriales generalmente entre 1 y 2 mM [89]. Las concentraciones de estos péptidos en el vino son probablemente muy bajas e indudablemente por debajo de sus respectivos valores umbrales medidos en agua, por lo que no podrían explicar individualmente el sabor amargo en el vino.

Además, la acroleína (3-hidroxiacetaldehído), el cual no es un compuesto amargo, se ha revelado como contribuyente al amargor cuando aparece combinado con ciertos compuestos fenólicos del vino, hasta ahora indeterminados [32, 41, 90]. Esta hipótesis se desprende del hecho de que los vinos tintos con alto contenido fenólico están asociados con este problema y no los vinos blancos, caracterizados por una baja carga polifenólica, por lo que dicha asociación podría ser una causa indirecta relacionada con el material polifenólico. Así, un antiguo trabajo demuestra que concentraciones de acroleína tan bajas como 10 mg L⁻¹ causan una contaminación amarga [83].

Por otro lado, está demostrado que el etanol acentúa el amargor percibido a niveles típicos del vino tanto en disoluciones sintéticas [91-93] como en muestras reales de vino [74, 85, 94], contradiciendo los resultados obtenidos por medio de una lengua electrónica [64]. Por otra parte, se ha observado que un incremento en el valor de pH de un vino de 2.14 a 3.2 realza de manera significativa el amargor en vinos tintos [94], a diferencia de lo que se observó en disoluciones sintéticas [91], donde un aumento en el pH de 2.5 hasta 3.0 no indujo ningún cambio en la percepción del sabor. Este efecto también se observó a valores de pH más altos, ya que no se observó ningún impacto significativo en la percepción amarga por el aumento del pH de 3.0 a 4.0 [61, 74, 94].

A pesar de la extensa bibliografía descrita en el campo del amargor en el vino, aún existen pocos modelos predictivos para este sabor en vinos que tengan en cuenta todos los posibles compuestos que contribuyen al amargor [17, 65].

2.2. Compuestos químicos que provocan sensaciones de astringencia.

Los umbrales sensoriales de percepción disponibles en la actualidad de los compuestos con contribución astringente, así como su sub-cualidad, prueba con la que se estableció, medio en el que se realizó la prueba y referencia bibliográfica de donde se ha obtenido se muestra en la Tabla I-4.

La astringencia es definida como una sensación táctil percibida en la cavidad bucal que ha sido descrita con distintas subpropiedades [95, 96]. Gawel y col. [95] presentaron un vocabulario estructurado elaborado por un panel de catadores experimentados para describir las sub-cualidades de la astringencia incluyendo términos como aterciopelada, secante o rugosa. Este vocabulario ha sido empleado después para describir vinos tintos canadienses [70] y fracciones de vino [66, 97] así como en otro tipo de alimentos [57].

Las proantocianidinas oligoméricas han sido descritas como promotoras de menor rugosidad que las moléculas más polimerizadas, viéndose aumentada esta percepción con el aumento del grado medio de polimerización [18, 97, 98]. Por otro lado, mientras algunos estudios muestran que en algunos casos un aumento en el porcentaje de galoilación se ha asociado con una mayor percepción de astringencia secante y rugosa [17, 18, 96, 99], estudios recientes [18, 97] parecen indicar que la variación en el porcentaje de galoilación no se ve reflejada en la variación de estas sub-propiedades. Por el contrario, se ha descrito [100] que la presencia de unidades de epigallocatequina (EGC) en flavanoles polimerizados provoca una menor percepción secante. En contraposición, Gonzalo Diago y col. [97] revelaron que un mayor porcentaje en las unidades de extensión de catequina (C) y EGC conducen a un aumento de la percepción de astringencia secante, mientras que un aumento en epicatequina (EC) en las unidades de extensión se traduce en una disminución de la astringencia secante y un aumento de la astringencia sedosa. Estos resultados sugieren que la proporción o tipo de unidades de extensión de las TPAs tiene una gran importancia en la percepción de astringencia, aunque se hace necesario realizar más estudios a este respecto debido a la controversia observada en los resultados.

Si bien es cierto que estos trabajos sí están de acuerdo en que existe una relación importante entre la composición fenólica y la astringencia percibida, que viene apoyada también por gran cantidad de bibliografía relacionada con este tema [17, 69, 71, 81, 93, 106, 107].

Tabla I-4. Compuestos astringentes detectados en vino. Umbrales de percepción, atributo asociado, tipo de prueba sensorial, medio y referencia.

| Compuesto | Umbral sensorial (mg L ⁻¹) | Sub-cualidad | Prueba sensorial | Medio | Referencia |
|------------------------------|--|-----------------------|-----------------------------|-----------|------------|
| Flavanoles | | | | | |
| Catequina | 119 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [101] |
| Galato de catequina | 110 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [101] |
| Epicatequina | 270 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [101] |
| Epicatequina galato | 110 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [101] |
| Epigalocatequina | 169 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [101] |
| Epigalocatequina galato | 87 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [101] |
| Galocatequina | 165 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [101] |
| Galato de galocatequina | 179 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [101] |
| Procianidina C1 | 260 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Procianidina B1 | 139 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Procianidina B2 | 110 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Procianidina B3 | 116 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Trímeros y tetrameros | 4.1 ^a | Astringencia | Prueba triangular | Agua | [102] |
| Oligómeros | 0.2 | Astringencia | Prueba de media lengua | Agua | [103] |
| Taninos condensados | 0.035 | Astringencia | Prueba por pares | Agua | [103] |
| Taninos condensados | 3.5 | Astringencia | Prueba por pares | Agua | [82] |
| Taninos condensados (> 5kDa) | 22 | Astringencia punzante | Prueba de media lengua | Agua | [12] |
| Ácidos fenólicos | | | | | |
| Ácido gálico | 45 | Astringencia punzante | Prueba de media lengua | Agua | [104] |
| Ácido sirínico | 52 | Astringencia punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Ácido protocatéquico | 32 | Astringencia punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Ácido vainillílico | 53 | Astringencia punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Ácido (Z)/(E) - aconítico | 0.1 | Astringencia punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Ácido cafeico | 13 | Astringencia punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Ácido <i>p</i> -cumárico | 23 | Astringencia punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Ácido ferúlico | 13 | Astringencia punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Ácido caftárico | 5 | Astringencia punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Ácido cutárico | 25 | Astringencia | Sólo detección | Agua | [105] |
| Ácido gentísico | 140 | Astringencia | Prueba por pares | Agua | [54] |
| Ácido gentísico | 20/2 | Astringencia | Prueba por pares/triangular | Etanol 5% | [35] |

| Compuesto | Umbral sensorial (mg L ⁻¹) | Sub-cualidad | Prueba sensorial | Medio | Referencia |
|---|--|------------------------|---------------------------------|-----------|------------|
| Ácido <i>o</i> -salicílico | 90 | Astringencia | Prueba por pares | Agua | [54] |
| Ácido <i>m</i> -salicílico | 20 | Astringencia | Prueba por pares | Agua | [54] |
| Ácido <i>p</i> -salicílico | 40 | Astringencia | Prueba por pares | Agua | [54] |
| Ácido <i>p</i> -salicílico | 20/2 | Astringencia | Prueba por pares/ triangular | Etanol 5% | [35] |
| Ésteres etílicos de ácidos fenólicos | | | | | |
| Éster etílico de ácido gálico | 37 | Astringencia, punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido <i>p</i> -cumárico | 27 | Astringencia, punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido siríngico | 4 | Astringencia, punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido vainillílico | 25 | Astringencia, punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido cafeico | 69 | Astringencia, punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido ferúlico | 15 | Astringencia, punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Éster etílico de ácido protocatéquico | 9 | Astringencia, punzante | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Flavonoles | | | | | |
| Siringetina-3- <i>O</i> -glucopiranosido | 0.1 | Astringencia sedosa | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucopiranosido | 1.1 | Astringencia sedosa | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Dihidroquercetina-2-ramnopiranosido | 1.7 | Astringencia sedosa | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Quercetina-3- <i>O</i> -galactopiranosido | 0.2 | Astringencia sedosa | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Dihidrokaempferol-3- <i>O</i> -ramnósido | 2.1 | Astringencia sedosa | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Quercetina-3- <i>O</i> -glucopiranosido | 1.0 | Astringencia sedosa | Prueba de media lengua | Agua | [13] |
| Quercetina-3- <i>O</i> -ramnósido | 8.9 ^a | Astringencia, amargo | Prueba por pares | Agua | [102] |
| Quercetina | 10 ^a | Astringencia, amargo | Prueba por pares | Etanol 5% | [35] |
| Kaempferol | 20 ^a | Astringencia, amargo | Prueba por pares | Etanol 5% | [35] |
| Miricetina | 10 ^a | Astringencia, amargo | Prueba por pares | Etanol 5% | [35] |
| Elagitaninos | | | | | |
| Grandinina | 0.21 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [35] |
| Roburina E | 0.21 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [104] |
| Vescalagina | 1.03 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [104] |
| Castalagina | 1.03 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [104] |
| 33-Desoxi-33-carboxivescalagina | 2.50 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [104] |
| Roburina A | 5.37 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [104] |
| Roburina D | 5.55 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [104] |
| Roburina B | 12.09 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [104] |

| Compuesto | Umbral sensorial (mg L ⁻¹) | Sub-cualidad | Prueba sensorial | Medio | Referencia |
|-----------------------------------|--|----------------------|------------------------|-------|------------|
| Roburina C | 12.49 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [104] |
| 1,2,3,4,6-pentagaloil-β-D-glucosa | 1.69 | Astringencia secante | Prueba de media lengua | Agua | [104] |
| Ácido elágico | 1.69 | Astringencia | Prueba de media lengua | agua | [104] |

^a Umbral sensorial para amargor y astringencia

Sin embargo, no hay que olvidar que hay investigaciones [33, 108, 109] que muestran que ni los contenidos analizados de proantocianidinas (flavanoles polimerizados), ni los métodos químicos desarrollados para medir la astringencia mediante precipitación de proteínas [110-112] son suficientes para explicar las diferentes astringencias percibidas en vino. Este hecho se ha atribuido a la capacidad de los compuestos más pequeños para formar complejos con las proteínas salivales pero no para precipitar [113, 114] generando así una menor lubricación y un aumento por lo tanto de la astringencia percibida.

A continuación se discute la posible implicación de distintos compuestos y familias de compuestos en la percepción de la astringencia de los vinos. Determinados flavanoles monoméricos como la catequina o epicatequina, así como los dímeros y trímeros han sido descritos como astringentes [12, 66, 101, 102] aunque su implicación en la astringencia de los vinos parece ser limitada debido a que su umbral sensorial (Tabla II-4) está muy por encima de la concentración normal en la que se ha encontrado en vinos.

Experimentos sensoriales llevados a cabo con derivados de elagitaninos (taninos derivados de roble) han revelado que estos compuestos también pueden tener un impacto sensorial en la astringencia de los vinos envejecidos en barricas de roble [115-117] y se han descrito como promotores de una astringencia suave y aterciopelada [117]. Los umbrales sensoriales para estos compuestos se han encontrado en un alto intervalo que parece depender de su estructura química por ejemplo entre 0.21 mol L⁻¹ para grandinina y roburina E, y 12.41 mol L⁻¹ para roburina C. Sin embargo, entre los elagitaninos investigados, sólo se ha encontrado castalagina en cantidades superiores a su umbral sensorial en vinos envejecidos en barricas de roble [17].

Por otro lado, se ha demostrado que otros compuestos diferentes de los flavanoles contribuyen a la astringencia del vino. De hecho, la astringencia de fracciones de vinos de bajo peso molecular [66] se encuentra correlacionada positivamente con varios tipos

de antocianos. Además, se ha demostrado que la adición de las fracciones antociánicas tanto en vino blanco [118] como en soluciones sintéticas [72] provoca un aumento en la percepción de astringencia, sin embargo, este hecho podría ser atribuido a la presencia de otros compuestos astringentes en las fracciones, ya que otros estudios con antocianos libres puros no encontraron que dichos compuestos contribuyeran a la astringencia del vino [18]. Otros pigmentos derivados de antocianos y formados por polimerización de antocianos con flavanoles oligómeros (también llamados pigmentos poliméricos de alto peso molecular) también se ha correlacionado positivamente con la percepción astringente en muestras reales de vino [65, 119-121]. Por el contrario, estos compuestos no se describen como astringentes en disoluciones sintéticas [18].

Otras moléculas no flavonoides como los ácidos fenólicos y los ésteres etílicos de éstos han sido principalmente descritos como amargos [68-71] aunque también se ha demostrado que aumentan la percepción de astringencia [17, 52]. Con respecto a los ácidos fenólicos presentes en los vinos, se les ha atribuido una implicación importante en la percepción astringente rugosa [12, 13]. Del mismo modo, esta sub-cualidad de astringencia también se ha atribuido a los ácidos orgánicos [92, 122-124]. Entre los ácidos del vino, el ácido aconítico parece jugar un papel importante en la astringencia rugosa de los vinos tintos jóvenes, muy probablemente debido a su bajo umbral sensorial, que apenas alcanza los 0.1 mg L^{-1} [12, 33]. Sin embargo, en este caso parece ser más importante la relación entre ambos isómeros (*trans/cis* aconítico) que la concentración absoluta de cada uno de ellos tal y como se sugiere en el Capítulo 2 de la Sección II de esta tesis. Resultados similares fueron obtenidos con determinados flavonoles.

Por otro lado, un grupo de flavonoles glicosilados han sido descritos como inductores de una astringencia sedosa tanto en el vino [12] como en productos procedentes de arándanos [125] mientras que Gonzalo-Diago y col. [66] atribuyeron al flavonol quercetina-3-rutinosido características secantes. Independientemente de la sub-cualidad de esta familia de compuestos su impacto sensorial parece ser muy importante, principalmente debido a sus bajos umbrales sensoriales (0.1 a 2.1 mg L^{-1} ; ver la Tabla I-4) y sus altos índices DoT [12, 108].

Finalmente, en cuanto al papel que juega el etanol en la percepción de la astringencia existe una gran cantidad de bibliografía al respecto, sin embargo, su efecto en la percepción de este atributo resulta contradictorio. Hay algunos estudios con disoluciones sintéticas de vino muy simples (formadas sólo por el ácido tartárico y el ajuste del pH a 3.5) que confirman que una disminución en el contenido de alcohol

conduce a una reducción de la astringencia [91, 96, 126], sin embargo, en otro trabajo se observó que un aumento de etanol de 8 % a 14 % provocó un incremento de más del doble en la percepción del amargor, pero no se observó ningún cambio en la astringencia [127]. Otros estudios examinaron el efecto del etanol en las disoluciones de vino sintético más complejas (con la adición de los compuestos no volátiles presentes en las matrices de vino reales tales como polisacáridos, proteínas, etc.) donde observaron que un aumento en el contenido de etanol dio lugar a un aumento significativo en la astringencia percibida [92, 122, 128], así como en las interacciones proteína-tanino durante el consumo de vino.

3. INTERACCIONES SABOR-SABOR Y SABOR-ASTRINGENCIA

Hasta el momento, esta revisión se ha centrado en la implicación de moléculas no volátiles en el sabor y la astringencia del vino. No obstante, el estudio por separado de moléculas capaces de generar estas sensaciones no es suficiente para explicar ni el sabor ni la astringencia. La presencia de interacciones **sabor-sabor**, interacciones **sabor-astringencia**, interacciones **aroma-astringencia** y **aroma-sabor** ha sido demostrada en los últimos años. De hecho, se han llevado a cabo estudios destinados a evaluar estas interacciones en disoluciones sintéticas binarias o incluso ternarias con compuestos sensorialmente activos [26, 109, 129, 130]. Igualmente, hay algunos estudios realizados con matrices más complejas para observar interacciones entre moléculas no volátiles (por ejemplo, proteínas, polisacáridos de vino, glicerol o glucosa) [92, 131]. En general, estos estudios están de acuerdo en que las interacciones son dependientes del producto, debido principalmente a la presencia de uniones físico-químicas entre las moléculas. Además de estas interacciones entre compuestos del producto, el sabor y la astringencia percibidas durante el consumo son también el resultado de interacciones a nivel perceptivo [132]. Así por una parte, los mecanismos físico-químicos son el resultado de la modificación de estímulos en receptores y que dependen del producto y de su comportamiento en la boca y, por otro lado, los mecanismos perceptivos proceden de la percepción de los alimentos por los sujetos e incluyen mecanismos sensitivos y cognitivos. Mientras los mecanismos sensitivos se generan a nivel periférico, es decir donde se deriva la competencia entre dos estímulos a nivel de los receptores, los mecanismos cognitivos tienen lugar en el sistema central, involucrando tanto la memoria como el lenguaje [133].

En la bibliografía consultada, se ha puesto de manifiesto la presencia de interacciones sensoriales entre las moléculas no volátiles presentes en el vino y que conducen a modificar el sabor o las sensaciones táctiles. Por ejemplo, Martin [134] demostró que la variación en la concentración de ácido tartárico y sacarosa, en el intervalo de concentraciones encontradas en los vinos tipo "Champagne" afectó de manera significativa a la **acidez** y el **dulzor** percibidos, concluyendo que había un efecto claro supresor de **dulce-ácido**. Hufnagel y col. [13] demostraron con experimentos de reconstitución que la **acidez** percibida generada por los ácidos tartárico, galacturónico, acético, succínico, málico, láctico es suprimida ligeramente por los cloruros de potasio, magnesio y amonio, lo que apunta a un efecto supresor del sabor **ácido** por parte del sabor **salado** (interacción **ácido-salado**).

También se ha demostrado que la percepción del amargor se ve suprimida por la presencia de azúcares [135, 136] o glicerol [92], lo que sugiere un efecto supresor del sabor **amargo** por parte del sabor **dulce** en vinos (interacción **amargo-dulce**).

En cuanto a la **astringencia**, se ha observado que esta sensación táctil disminuye de manera significativa al aumentar la **viscosidad** [92, 137]. Este hecho podría estar relacionado con un efecto enmascarante o supresor (interacción **astringencia-viscosidad**). Además, se ha puesto de manifiesto que un aumento en el pH, normalmente asociado con una disminución de la acidez del vino, conlleva una disminución de la astringencia, atribuyéndose a una disminución de las formas fenolato y a un aumento de moléculas no cargadas susceptibles a la unión con proteínas [91, 138], lo que sugiere que el sabor **ácido** es un potenciador de la **astringencia** (interacción **ácido-astringencia**).

Recientemente, se ha puesto de manifiesto la existencia de interacciones **dulce-astringente** y **dulce-amargo** en el vino, ya sea por moléculas del aroma [32] o por moléculas no volátiles [16]. Por ejemplo, el incremento del aroma afrutado asociado a los vinos blancos (frutas blancas, amarillas y tropicales) ha dado lugar a una disminución en la percepción de astringencia y amargor relacionado con un aumento en la percepción de dulzor [13]. Este hecho se ha relacionado con la presencia de interacciones cognitivas, ya que un aumento en el aroma afrutado induce un aumento en la percepción de dulzor y por tanto una disminución de la astringencia y del amargor. Este efecto ha sido descrito como aprendizaje asociativo, puesto que tiene lugar una interacción congruente entre el dulzor y el afrutado [139-141]. Con relación a esto, Abdi [142] destacó que a pesar de que los sentidos del sabor, el olfato y los sistemas trigeminales están obviamente separados anatómicamente y son responsables de diferentes funciones, no son cognitivamente independientes. Los diferentes receptores se pueden incorporar en el mismo sistema perceptivo.

La posible interacción de las sensaciones táctiles y sabores básicos en muchos alimentos y bebidas complejos sugiere que los mecanismos tanto fisiológicos como psicológicos son esenciales para la comprensión de la percepción sensorial. A pesar de que se han llevado a cabo muchos estudios sobre las interacciones sabor-sabor y sabor-astringencia con moléculas presentes en los vinos, ya sea en disoluciones sintéticas simples [143] o con matrices más complejas [16, 13], estos mecanismos fisiológicos y psicológicos están lejos de estar claros en el vino, por lo que se hace esencial investigar más a fondo las interacciones sensoriales en matrices complejas similares al vino.

4. EVOLUCION DE LAS PROPIEDADES SENSORIALES Y QUÍMICAS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO EN BOTELLA

Hasta ahora, se ha hecho una revisión sobre la implicación de las moléculas no volátiles y las interacciones sensoriales en la percepción del sabor y la astringencia. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el vino además de ser una matriz muy compleja formada por un número importante tanto de moléculas volátiles como no volátiles, sufren importantes cambios y de ahí la naturaleza dinámica (y no estática) de las sensaciones que genera un vino a lo largo de su vida (especialmente desde su embotellado hasta su consumo). Una vez el vino se embotella tienen lugar un gran número de reacciones que dan lugar a cambios sensoriales. Independientemente del tipo de elaboración, variedad... la etapa de estancia en botella es crucial para la evolución del vino y es clave su control ya que de ésta dependen las sensaciones que el consumidor final percibe en el vino y por lo tanto la percepción de calidad del mismo. En esta larga etapa, las condiciones de almacenamiento tales como temperatura, humedad, transferencia de oxígeno... resultan esenciales para la evolución de las características sensoriales. En esta línea, muchas de las regulaciones en las denominaciones de origen de los vinos tintos de alta calidad imponen un período mínimo de envejecimiento en botella para lograr los atributos sensoriales requeridos por la propia denominación. Estas modificaciones sensoriales implican cambios en el aroma [144], en el color [145], en la astringencia [98] o cambios en la acidez [146]. Sin embargo, paralelamente, el envejecimiento implica considerables inversiones económicas, por lo que es muy importante entender el momento, factores y mecanismos que ocurren durante el envejecimiento en botella y que afectan a las características organolépticas.

Por otro lado, está ampliamente aceptado que existen vinos con distinta capacidad para envejecer, coexistiendo vinos que en un periodo relativamente corto de tiempo sufren grandes evoluciones con otros que son capaces de mantenerse invariables durante periodos mucho más largos de envejecimiento. Esta capacidad para afrontar el envejecimiento parece estar íntimamente ligada a su composición polifenólica [68]. Así cambios en las características de color, astringencia y amargor están aparentemente ligados a cambios experimentados en la composición fenólica de los vinos.

Durante el envejecimiento el color rojo brillante de los vinos jóvenes disminuye en intensidad con un aumento de la luminosidad [147] además se produce un cambio de color desde los tonos rojo-azulados a los tonos rojo-teja [148]. Además tiene lugar un cambio en el perfil aromático debido a fenómenos simultáneos como la formación de

nuevos compuestos volátiles por reacciones de oxidación [149], hidrólisis y esterificación [150]. Respecto al sabor y sensaciones táctiles durante el envejecimiento se producen reacciones de oxidación, polimerización, hidrólisis, acomplejación entre otras, que dan lugar a cambios principalmente en la astringencia, e igualmente, pueden existir cambios en el amargor de los vinos [151]. También son descritos pequeños cambios en la acidez y a la par pueden aparecer cambios en la percepción del volumen en boca, persistencia e intensidad global. No obstante, las últimas investigaciones centradas en el estudio de la evolución del vino en botella sugieren importantes cambios en el perfil aromático [144, 152-155], así como en color [106, 152, 156] y no tantos ni tan claros en los atributos evaluados en boca [146, 152, 157].

Los profesionales del vino tienen que evaluar la capacidad de envejecimiento y prever la evolución que va a tener este durante su estancia en botella. Sin embargo, las características en las que se basan hoy en día los profesionales para emitir sus juicios sobre la capacidad de envejecer un vino no están claramente definidas [158]. En esta línea, los profesionales definen un vino con alto potencial para afrontar su estancia en botella como un vino con buena estructura y cuerpo, junto con una capacidad antioxidante suficiente para contrarrestar el efecto del oxígeno. Por lo tanto, la composición polifenólica del vino influye mucho en estas características [159], aunque sin embargo, existe poca bibliografía en la que se relacionen los factores intrínsecos del vino (composición química y/o perfil sensorial) con la capacidad de afrontar el envejecimiento [75, 77, 78]. En esta línea, Langlois y col. [158] concluyeron que la combinación de la fase visual y gustativa, así como determinadas notas olfativas son en los que se basan los profesionales a la hora de juzgar el potencial de envejecimiento de los vinos, dándole más peso a los aspectos gustativos y sensaciones en boca, como una alta astringencia y una baja acidez.

Durante el envejecimiento en botella los compuestos polifenólicos participan en numerosas reacciones químicas que se dan tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Además, es también aceptado que un consumo moderado de oxígeno durante el envejecimiento en botella puede acelerar o provocar reacciones específicas que influyen también en las propiedades de un vino.

En la actualidad, no disponemos de un conocimiento claro ni de la evolución de las propiedades sensoriales de los vinos durante su envejecimiento en botella ni de la evolución de los distintos compuestos responsables de estas características. De hecho, ni siquiera disponemos del conocimiento suficiente como para establecer de manera sistemática los compuestos responsables de cada una de estas sensaciones. Realmente,

todo el control que hoy en día existe sobre esta fase en la evolución del vino es empírica y se basa en la tradición y experiencia. Esto conduce a que, en muchos de los casos de vinos defectuosos, el 48% concretamente, los defectos están relacionados con un envejecimiento deficiente, ya sea por problemas de reducción u oxidación [160]. Las pérdidas económicas y de imagen debidas a estos problemas son muy altas y los técnicos reaccionan de manera conservadora, empleando cantidades en exceso de antioxidantes y tapones de calidad superior a la necesaria, condiciones probablemente alejadas de las que pudieran considerarse óptimas.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Charters, S., & Pettigrew, S. (2007). The dimensions of wine quality. *Food Quality and Preference*, 18, 997–1007.
- [2] Sáenz-Navajas, M. P., Ballester, J., Peyron, D., & Valentin, D. (2014). Extrinsic attributes responsible for red wine quality perception: A cross-cultural study between France and Spain. *Food Quality and Preference*, 35, 70-85.
- [3] Sáenz-Navajas, M. P., Ballester, J., Pêcher, C., Peyron, D., & Valentin, D. (2013). Sensory drivers of intrinsic quality of red wines. Effect of culture and level of expertise. *Food Research International*. 54, 1506-1518.
- [4] Jover, A. J. V., Montes, F. J. L., & Fuentes, M. D. F. (2004). Measuring perceptions of quality in food products: The case of red wine. *Food Quality and Preference*, 15, 453–469.
- [5] Veale, R., & Quester, P. (2009). Do consumer expectations match experience? Predicting the influence of price and country of origin on perceptions of product quality. *International Business Review*, 18, 134–144.
- [6] Yegge, J.M., & Noble, A.C. (2001). In The identification of sensory and non-sensory attributes of California Chardonnay wines that influence acceptance and purchase intent for differing segments of consumers. Proceedings of the American Society for Enology and Viticulture, 50th Anniversary Annual Meeting, Seattle, WA, 2001, American Society for Enology and Viticulture: Seattle, WA, 28–31.
- [7] Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Analytical characterization of the aroma of five premium red wines. Insights into the role of odour families and the concept of fruitiness of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 4501–4510.
- [8] Campo, E., Cacho, J., & Ferreira, V. (2008). The chemical characterization of the aroma of dessert and sparkling white wines (Pedro Ximenez, Fino, Sauternes, and Cava) by gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2477–2484.
- [9] Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., & Cacho, J. (2005). Prediction of the wine sensory properties related to grape variety from dynamic-headspace gas chromatography-olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5682–5690.
- [10] Marchal, A., Waffo-Téguo, P., Génin, E., Mérillo, J. M., & Dubourdieu, D. (2011). Identification of new natural sweet compounds in wine using centrifugal partition chromatography-gustatometry and Fourier transform mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 83, 9629-9637.
- [11] López, R., Mateo-Vivaracho, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). Optimization and validation of a taste dilution analysis to characterize wine taste. *Journal of Food Science*, 72, 345–351.
- [12] Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008a). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1376–1386.
- [13] Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008b). Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9190–9199.

- [14] Breslin, P.A.S. (2001). Human gustation and flavour. *Flavour and Fragrance Journal*, 16, 439–456.
- [15] Sáenz-Navajas, M., Campo, E., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5574–5585.
- [16] Sáenz-Navajas, M. P., Avizcuri, J. M., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2012) Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chemistry*, 134, 1484-1493.
- [17] Preys, S., Mazerolles, G., Courcoux, P., Samson, A., Fischer, U., Hanafi, A., Bertrand, D., & Cheynier, V. (2006). Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*, 563, 126–136.
- [18] Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513, 57–65.
- [19] Bosselli, E., Giomo, A., Minardi, M., & Frega, N. G. (2008). Characterization of phenolics in Lacrima di Morro d'Alba wine and their role on its sensory attributes. *European Food Research and Technology*, 227, 709–720.
- [20] Ough, C. S., & Amerine, M. A. (1988). *En methods for analysis of musts and wines*. Ed. John Wiley and Sons. New York, p 377.
- [21] Thorngate, J. H. (1997). The physiology of human sensory response to wine: A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48, 271–279.
- [22] Wilson, C. W. M., O'Brien, C., & Macairt, J. G. (1973). Effect of metronidazole on human taste threshold to alcohol. *British Journal of Addiction*, 68, 99–110.
- [23] Scinska, A., Koros, E., Habrat, B., Kukwa, A., Kostowski, W., & Bienkowski, P. (2000). Bitter and sweet components of ethanol taste in humans. *Drug and Alcohol Dependence*, 60, 199–206.
- [24] Mattes, R. D., & DiMeglio, D. (2001). Ethanol perception and ingestion. *Physiology & Behavior*, 72, 217–229.
- [25]. Noble, A. C., & Bursick, G. F. (1984). The contribution of glycerol to perceived viscosity and sweetness in white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35, 110–112.
- [26] Zamora, M. C., Goldner, M. C., & Galmarini, M. V. (2006). Sourness-sweetness interactions in different media: White wine, ethanol and water. *Journal of Sensory Studies*, 21, 601–611.
- [27] Amerine, M. A., & Roessler, E. B. (1983). *Wines: Their Sensory Evaluation*, Freeman, W.H.: New York, p 432.
- [28] Peynaud. (1996). *The taste of wine*. John Wiley and Sons: New York, 1996.
- [29] Thorngate. (1992). *Flavan-3-ols and their polymers in grapes and wines: Chemical and sensory properties*. University of California, Davis.
- [30] Noble, A. C. (1994). Bitterness in wine. *Physiology & Behavior*, 56, 1251–1255.

- [31] Blackman, J., Rutledge, D. N., Tesic, D., Saliba, A., & Scollary, G. R. (2010). Examination of the potential for using chemical analysis as a surrogate for sensory analysis. *Analytica Chimica Acta*, 660, 2–7.
- [32] Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry*, 121, 1139–1149.
- [33] Sáenz-Navajas, M. P., Ferreira, V., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 673, 151–159.
- [34] Sáenz-Navajas, M. P., Martín-López, C., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Sensory properties of Premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 9–19.
- [35] Dadic, M., & Belleau, G. (1973). Polyphenols and beer flavour. *Proceedings. American Society of Brewing Chemists*, 4, 107–114.
- [36] Peleg, H., Noble, A. C. (1995). Perceptual properties of benzoic-acid derivatives. *Chemical Senses*, 20, 393–400.
- [37] Warmke, R., Belitz, H. D., & Grosch, W. (1996). Evaluation of taste compounds of Swiss cheese (Emmentaler). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung*, 203, 230–235.
- [38] Marchal, A., Marullo, P., Moine, V., & Dubordieu, D. (2011). Influence of yeast macromolecules on sweetness in dry wines: Role of the *Saccharomyces cerevisiae* protein Hsp12. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 2004–2010.
- [39] Pilone, G. J., Clayton, M. G., & Vanduivenboden, R. J. (1991). Characterization of wine lactic-acid bacteria—single broth culture for tests of heterofermentation, mannitol from fructose, and ammonia from arginine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 42, 153–157.
- [40] Wisselink, H. W., Weusthuis, R. A., Eggink, G., Hugenholtz, J., & Grobber, G. J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: A review. *International Dairy Journal*, 12, 151–161.
- [41] Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 139–173.
- [42] Marchal, A., Pons, A., Lavigne, V., & Dubordieu, D. (2013). Contribution of oak wood ageing to the sweet perception of dry wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 19, 11–19.
- [43] Fowles, G. W. A. (1992). Acids in grapes and wines: A review. *Journal of Wine Research*, 3, 25–41.
- [44] Ebeler, S. E. (2001). Analytical chemistry: Unlocking the secrets of wine flavour. *Food Reviews International*, 17, 45–64.
- [45] Sass-Kiss, A., Kiss, J., Havadi, B., & Adanyi, N. (2008). Multivariate statistical analysis of botrytised wines of different origin. *Food Chemistry*, 110, 742–750.

- [46]. Clarke, R. J., & Bakker, J. (2004). En *Wine Flavour Chemistry*. Ed. Blackwell Publishing: Oxford, UK, p80–81.
- [47] Whiting, G. C. (1976). Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages—A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 82, 84–92.
- [48] Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F., & Kunkee, R. E. (1998). *Principles and Practices of Winemaking*, Aspen Publishers.
- [49] Biasoto, A. C. T., Catharino, R. R., Sanvido, G. B., Eberlin, M. N., & da Silva, M. (2010). Flavour characterization of red wines by descriptive analysis and ESI mass spectrometry. *Food Quality and Preference*, 21, 755–762.
- [50] Comuzzo, P., & Zironi, R. (2013). Biotechnological strategies for controlling wine oxidation. *Food Engineering Reviews*, 5, 217-229.
- [51] Rotzoll, N., Dunkel, A., & Hofmann, T. (2005). Activity-guided identification of (S)-malic acid 1-O-D-glucopyranoside (morelid) and γ -aminobutyric acid as contributors to umami taste and mouth-drying oral sensation of morel mushrooms (*morchella deliciosa* Fr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4149-4156.
- [52] Lethonen, P. (1996). Determination of amines and amino acids in wine—A review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 127–133.
- [53] Scharbert, S., & Hofmann, T. (2005). Molecular definition of black tea taste by means of quantitative studies, taste reconstitution, and omission experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 5377-5384.
- [54] Maga, J. A., & Lorenz, K. (1973). Taste threshold values for phenolic acids which can influence flavour properties of certain flours, grains and oilseeds. *Cereal Science Today*, 18, 326–332.
- [55] Verette, E., Noble, A. C., & Somers, T. C. (1988). Hydroxycinnamates of vitis-vinifera-sensory assessment in relation to bitterness in white wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 45, 267–272.
- [56] Titan, R.R., Li, G., Wan, S.B., Pan, Q.H., Zhan, J.C., Li, J.M., Zhang, Q.H., & Huang, W.D. (2008). Comparative study of 11 phenolic acids and five flavan-3-ols in cv. Vidal: Impact of natural icewine making versus concentration technology. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 216–222.
- [57] Desportes, C., Charpentier, M., Duteurtre, B., Maujean, A., & Duchiron, F. (2001). Isolation, identification, and organoleptic characterization of low-molecular-weight peptides from white wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 376–380.
- [58] Frank, S., Wollmann, N., Schieberle, P., & Hofmann, T. (2011). 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* 59, 8866-8874.
- [59] Gutierrez, V. L. (2002). Sensory descriptive analysis between white wines fermented with oak chips and in barrels. *Journal of Sensory Studies*, 67, 2415–2419.
- [60] Gutierrez-Afonso, V. L., Darias, J., Armas, R., Medina, M.R., & Diaz, M.E. (1998). Descriptive analysis of three white wine varieties cultivated in the Canary Islands. *American Journal of Enology and Viticulture*, 49, 440–444.

- [61] Scacco, A., Verzera, A., Lanza, C.M., Sparacio, A., Genna, G., Raimondi, S., Tripodi, G., & Dima, G. (2010). Influence of soil salinity on sensory characteristics and volatile aroma compounds of Nero d'Avola Wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 498–505.
- [62] Kanga, B. S., Jang-Eun Lee, J. E., Parka, H. J. (2014). Electronic tongue-based discrimination of Korean rice wines (makgeolli) including prediction of sensory evaluation and instrumental measurements. *Food Chemistry*, 151, 317-323.
- [63] Okada, K., Gogami, Y., & Oikawa, T. (2013). Principal component analysis of the relationship between the D-amino acid concentrations and the taste of the sake. *Amino Acids*, 44, 489-498.
- [64] Rudnitskaya, A., Nieuwoudt, H. H., Muller, N., Legin, A., du Toit, M., & Bauer, F. F. (2010). Instrumental measurement of bitter taste in red wine using an electronic tongue. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 3051–3060.
- [65] Bosselli, E., Boulton, R. B., Thorngate, J. H., & Frega, N. G. (2004). Chemical and sensory characterization of DOC red wines from Marche (Italy) related to vintage and grape cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3843–3854.
- [66] Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2014). Contribution of low molecular weight phenols to bitter taste and mouthfeel properties in red wines. *Food Chemistry*, 154, 187-198.
- [67] Vaia, R., & McDaniel, M. (1996). Sensory effects of quercetin in a model wine and a chardonnay. In *Second Rose Marie Pangborn Memorial Symposium*, Noble, A. C., Ed. *Food Quality and Preference*, 7, 339–340.
- [68] Jaffré, J., Valentin, D., Dacremont, C., & Peyron, D. (2009). Burgundy red wines: representation of potential for aging. *Food Quality and Preference*, 20, 505-513.
- [69] Brossaud, F., Cheynier, V., & Noble, A. C. (2001). Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 33–39.
- [70] Cliff, M. A., King, M. C., & Schlosser, J. (2007). Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*, 40, 92–100.
- [71] Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., & Noble, A. C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1123–1128.
- [72] Arnold, R. A., Noble, A. C., & Singleton, V. L. (1980). Bitterness and astringency of phenolic fractions in wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 28, 675–678.
- [73] Noble, A. C. (2002). Astringency and bitterness of flavonoid phenols. *Chemistry of Taste: Mechanisms, Behavior, and Mimics*, 825, 192–201.
- [74] Fischer, U., & Noble, A. C. (1994). The effect of ethanol, catechin concentration, and pH on sourness and bitterness of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 6–10. 635.
- [75] Ancín-Azpilicueta, C., Barriuso-Esteban, B., Nieto-Rojo, R., & Aristizábal-López, N. (2004). Extraction of volatile compounds in model wine from different oak woods: effect of SO₂. *Food Research International*, 37, 375-383.

- [76] Robichaud, J. L., & Noble, A. C. (1990). Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 53, (3), 343-353.
- [77] Díaz-Plaza, E.M., Reyero, J.R., Pardo, F., Alonso, G.L., & Salinas, M.R. (2002). Influence of oak wood on the aromatic composition and quality of wines with different tannin content. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 2622-2626.
- [78] Garde-Cerdán, T., Ancín-Azpilicueta, C. (2006). Review of quality factors on wine ageing in oak barrels. *Food science and Technology*, 17, 438-447.
- [79] Etaio, I., Pérez Elortondo, F. J., Albisu, M., Gaston, E., & Schlich, P. (2009). Sensory attribute evolution in bottled young red wines from Rioja Alavesa. *European Food Research and Technology*, 228, 695-705.
- [80] Stevens, J.C. (1997). Detection of very complex taste mixtures: Generous integration across constituent compounds. *Physiology & Behavior* 62, 1137-1143.
- [81] Breslin, P.A.S. (2001). Human gustation and flavour. *Flavour and Fragrance Journal* 16, 439-456.
- [82] Singleton, V. L. (1969). Phenolic substances in grape and wines, and their significance. En *Advances in Food Research*. Ed. Academic Press, New York, Vol. Supplement 1.
- [83] Margalith, P. Z. (1983). *Flavour Microbiology*, xx: Springfield, IL.
- [84] Fischer, U., Strasser, M., & Gutzler, L. (2000). Impact of fermentation technology on the phenolic and volatile composition of German red wines. *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 81-94.
- [85] Soares, S., Kohl, S., Thalmann, S., Mateus, N., Meyerhof, W., & De Freitas, V. (2013). Different phenolic compounds activate distinct human bitter taste receptors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1523-1533.
- [86] Nikfardjam, M. S. P., & Pickering, G. J. (2008). Influence of variety and commercial yeast preparation on red wine made from autochthonous Hungarian and Canadian grapes. Part I: Phenolic composition. *European Food Research and Technology*, 227, 1077–1083.
- [87] La Torre, G. L., La Pera, L., Rando, R., Lo Turco, V., Di Bella, G., Saitta, M., & Dugo, G. (2008). Classification of Marsala wines according to their polyphenol, carbohydrate and heavy metal levels using canonical discriminant analysis. *Food Chemistry*, 110, 729–734. 645.
- [88] Noble, A. C., Strauss, C. R., Williams, P. J., & Wilson, B. (1988). Contribution of terpene glycosides to bitterness in muscat wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 39, 129–131. 650.
- [89] Otagiri, K., Noshio, Y., Shinoda, I., Fukui, H., & Okai, H. (1985). Studies on a model of bitter peptides including arginine, proline and phenylalanine residues. 1. Bitter taste of dipeptides and tripeptides, and bitterness increase of the model peptides by extension of the peptide-chain. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49, 1019–1026.
- [90] Bauer, R., Cowan, D. A., & Crouch, A. (2010). Acrolein in Wine: Importance of 3-hydroxypropionaldehyde and derivatives in production and detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3243–3250.

- [91] Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P. L., & Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, 19, 286–291.
- [92] Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., & Waters, E. J. (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19, 596–607.
- [93] Lesschaeve, I., & Noble, A. C. (2005). Polyphenols: Factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 330–335.
- [94] Demiglio, P., & Pickering, G. J. (2008). The influence of ethanol and pH on the taste and mouthfeel sensations elicited by red wine. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 6, 143–150.
- [95] Gawel, R., Iland, P. G., & Francis, I. L. (2001). Characterizing the astringency of red wine: a case study. *Food Quality and Preference*, 12, 83–94.
- [96] Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., & Cheynier, V. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15, 209–217.
- [97] Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2013). Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8861–8870.
- [98] Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, 126, 1971–1977.
- [99] Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. J. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 564–573.
- [100] Fernandez, K., Kennedy, J. A., & Agosin, E. (2007). Characterization of *Vitis vinifera* L. cv. Carmenere grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3675–3680.
- [101] Scharbert, S., Holzmann, N., & Hofmann, T. (2004). Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3498–3508.
- [102] Delcour, J. A., Vandenberghe, M. A., Corten, P. F., & Dondéyne, P. (1984). Flavor threshold of polyphenolics in water. *American Journal of Enology and Viticulture*, 35, 134–135.
- [103] Rossi, J. A., & Singleton, V. L. (1966). Flavour effects and adsorptive properties of purified fractions of grape seed phenols. *American Journal of Enology and Viticulture*, 17, 240–246.
- [104] Glabasnia, A., & Hofmann, T. (2006). Sensory-directed identification of taste-active ellagitannins in American (*Quercus alba* L.) and European oak wood (*Quercus robur* L.) and quantitative analysis in bourbon whisky and oak-matured red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3380–3390.

- [105] Okamura, S., & Watanabe, M. (1981). Determination of phenolic cinnamates in white wine and their effect on wine quality. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 2063-2070.
- [106] Monteleone, E., Condelli, N., Dinnella, C., & Bertuccioli, M. (2004). Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*, 15, 761-769
- [107] Vidal, S., Francis, L., Willians, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*, 85, 519-525.
- [108] Sáenz-Navajas, M.P., Fernandez-Zurbano, P., Tao, Y.S., Dizy, M., & Ferreira, V. (2010) Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12407-12416.
- [109] Ishikawa, T., & Noble, A. C. (1995). Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality and Preference*, 6, 27-33.
- [110] Aceres Mella, A.C., Peña Neira, A. Jaime Narvaez Bastias, J., Jara Campos, C., Lopez Solis, R., & Canals, J. M. (2013). Comparison of analytical methods for measuring proanthocyanidins in wines and their relationship with perceived astringency. *International Journal of Food Science and Technology*, 48, 2588-2594.
- [111] Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., Rozes, N., Arola, L., & Zamora, F. (2004). New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 742-746.
- [112] Kennedy, J. A., Ferrier, J., Harbertson, J. F., & Gachons, C. P. D. (2006). Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 481-485.
- [113] Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M. N., & Vallis, L. (2001). Correlations between saliva protein composition and some T-I parameters of astringency. *Food Quality and Preference*, 12, 145-152.
- [114] de Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 940-945.
- [115] Pocock, K. F., Sefton, M. A., & Williams, P. J. (1994). Taste thresholds of phenolic extracts of French and American oakwood. The influence of oak phenols on wine flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 429-434.
- [116] Puech, J. L., Feuillat, F., & Mosedale, J. R. (1999). The tannins of oak heartwood: Structure, properties, and their influence on wine flavor. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50, 469-478.
- [117] Stark, T., Wollmann, N., Wenker, K., Losch, S., Glabasnia, A., & Hofmann, T. (2010). Matrix-calibrated LC-MS/MS quantitation and sensory evaluation of oak ellagitannins and their transformation products in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6360-6369.
- [118] Oberholster, A., Francis, I. L., Iland, P. G., & Waters, E. J. (2009). Mouthfeel of white wines made with and without pomace contact and added anthocyanins. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 15, 59-69.

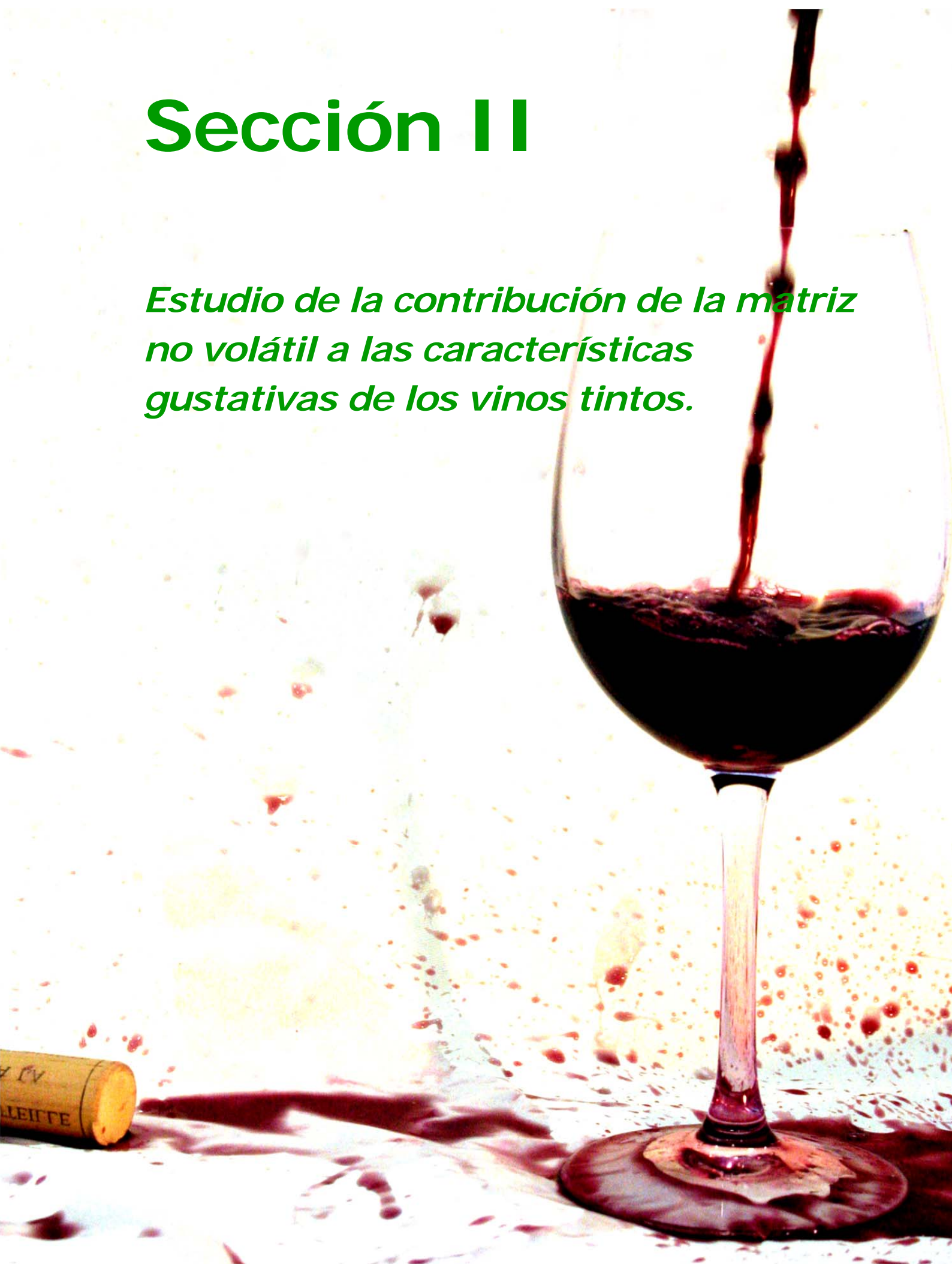
- [119] Gawel, R., Francis, L., & Waters, E. J. (2007). Statistical correlations between the in-mouth textural characteristics and the chemical composition of Shiraz wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2683-2687.
- [120] Landon, J. L., Weller, K., Habertson, J. F., & Ross, C. F. (2008). Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington state red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 153-158.
- [121] Villamor, R., Harberson, J., & Ross, C. (2009). 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*, 60, 442-449.
- [122] Sowalsky, R. A., & Noble, A. C. (1998). Comparison of the effects of concentration, pH and anion species on astringency and sourness of organic acids. *Chemical Senses*, 23, 343-349.
- [123] Lawless, H. T., Home, J., & Giasi, P. (1996). Astringency of organic acids is related to pH. *Chemical Senses*, 21, 397-403.
- [124] Rubico, S. M., & McDaniel, M. R. (1992). Sensory evaluation of acids by free-choice profiling. *Chemical Senses*, 17, 273-289.
- [125] Laaksonen, O., Sandell, M., Jarvinen, R., & Kallio, H. (2011). Orosensory contributing compounds in crowberry (*Empetrum nigrum*) press-byproducts. *Food Chemistry*, 124, 1514-1524.
- [126] Lea, A. G. H., & Arnold, G. M. (1978). Phenolics of ciders—bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 478-483.
- [127] Fischer, U., Boulton, R. B., & Noble, A. C. (1994). Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationships between saliva flow rate and temporal perception or gustatory stimuli. *Food Quality and Preference*, 5, 55-64.
- [128] Obreque-Slier, E., Pena-Neira, A., & Lopez-Solis, R. (2010). Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3729-3735.
- [129] Hewson, L., Hollowood, T., Chandra, S., & Hort, J. (2008). Taste-aroma interactions in a citrus flavoured model beverage system: Similarities and differences between acid and sugar type. *Food Quality and Preference*, 19, 323-334.
- [130] Pfeiffer, J. C., Hort, J., Hollowood, T. A., & Taylor, A. J. (2006). Taste-aroma interactions in a ternary system: A model of fruitiness perception in sucrose/acid solutions. *Percept Psychophys*, 68, 216-227.
- [131] Robinson, A. L., Ebeler, S. E., Heymann, H., Boss, P. K., Solomon, P. S., & Trengove, R. D. (2009). Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10313-10322.
- [132] Noble, A. C. (1996). Taste-aroma interactions. *Trends in Food Science & Technology*, 7, 439-444.
- [133] Small, D. M., & Prescott, J. (2005). Odour/taste integration and the perception of flavour. *Experimental Brain Research*, 166, 345-357.

- [134] Martin, N. (2002). Sweet/sour balance in champagne wine and dependence on taste/odour interactions. *Food Quality and Preference*, 13, 295–305.
- [135] Keast, R. S. J., Canty, T. M., & Breslin, P. A. S. (2004). The influence of sodium salts on binary mixtures of bitter-tasting compounds. *Chemical Senses*, 29, 431–439.
- [136] Lyman, B. J., & Green, B. G. (1990). Oral astringency-Effects of repeated exposure and interactions with sweeteners. *Chemical Senses*, 15, 151–164.
- [137] Skogerson, K., Runnebaum, R., Wohlgemuth, G., de Ropp, J., Heymann, H., & Fiehn, O. (2009). Comparison of gas chromatography-coupled time-of-flight mass spectrometry and H-1 nuclear magnetic resonance spectroscopy metabolite identification in white wines from a sensory study investigating wine body. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6899–6907.
- [138] Siebert, K. J., & Euzen, C. (2008). The relationship between expectorant pH and astringency perception. *Journal of Sensory Studies*, 23, 222–233.
- [139] Prescott, J. (1999). Flavour as a psychological construct: Implications for perceiving and measuring the sensory qualities of foods. *Food Quality and Preference*, 10, 349–356.
- [140] Zamora, M. C., & Guirao, M. (2002). Analysing the contribution of orally perceived attributes to the flavour of wine. *Food Quality and Preference*, 13, 275–283.
- [141] Bonnans, S., & Noble, A. C. (1993). Effect of sweetener type and of sweetener and acid levels on temporal perception of sweetness, sourness and fruitiness. *Chemical Senses*, 18, 273–283.
- [142] Abdi, H. (2002). What can cognitive psychology and sensory evaluation learn from each other *Food Quality and Preference*, 13, 445–451.
- [143] Caporale, G., Policastro, S., Monteleone, E. (2004). Bitterness enhancement induced by cut grass odorant (cis-3-hexen-1-ol) in a model olive oil. *Food Quality and Preference*, 15, 219-227.
- [144] Godden, P., Francis, L., Field, J., Gishen, M., Coulter, A., Valente, P., Hoj, P., & Robinson, E. (2001). Wine bottle closures: Physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine I. Performance up to 20 months post-bottling. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 64-105.
- [145]. Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle – I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins. *European Food Research and Technology*, 220, 607-614.
- [146] Gómez-Gallego, M.A., Gómez García-Carpintero, E., Sánchez-Palomo, E., González Viñas, M.A., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2013). Evolution of the phenolic content, chromatic characteristics and sensory properties during bottle storage of red single-cultivar wines from Castilla La Mancha region. *Food Research International* 51, 554-563.
- [147] Pérez-Magariño, S., & Gonzalez-San Jose M.L. (2006) Polyphenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96,197-208.
- [148] Monagas, M., Martín-Álvarez P.J., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé B. (2007). Effect of the modifier (Graciano vs. Cabernet Sauvignon) on blends of Tempranillo wine during ageing in the bottle. II. Colour and overall appreciation. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 107-115.

- [149] Spilman, P. L., Pollnitz, A. P., Liacopoulos, D., Skouroumounis, G. L., & Sefton, M. A. (1997). Accumulation of vanillin during barrel-aging of white, red, and model wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 2584-2589.
- [150] Jarauta, I., Cacho, J., & Ferreira, V. (2005). Concurrent phenomena contributing to the formation of the aroma of wine during aging in oak wood: An analytical study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4166-4177.
- [151] Mateus, N., Pinto, R., Ruao, P., & de Freitas, V. (2004). Influence of the addition of grape seed procyanidins to port wines in the resulting reactivity with human salivary proteins. *Food Chemistry*, 84, 195-200.
- [152] Caillé, S., Samson, A., Wirth, J., Diéval, J. B., Vidal, S., & Cheynier, v. (2010). Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre ad port bottling. *Analitica Chimica Acta*, 660, 35-42.
- [153] Wirth, J., Caillé, S., Souquet, J. M., Samson, A., Dieval, J. B., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2012). Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rosé wines. *Food Chemistry*, 132, 1861-1871.
- [154] Hopfer, H., Buffon, P. A., Ebeler, S. E., & Heymann, H. (2013). The combined effects of storage temperature and packaging on the sensory, chemical, and physical properties of a Cabernet sauvignon wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3320-3334.
- [155]. O'Brien, V., Francis, I. L., & Osidacz, P. (2009). Packaging choices affect consumer enjoyment of wines. *Wine Industry Journal*, 24, 48-54.
- [156] Wirth, J., Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Dieval, J. B., Aagaard, O., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2010). The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines. *Food Chemistry*, 123, 107-116.
- [157] Gambuti, A., Rinaldi, A., Ugliano, M., & Moio, L. (2013). Evolution of phenolic compounds and astringency during aging of red wine: effect of oxygen exposure before and after bottling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1618-1627.
- [158] Langlois, J., Ballester, J., Campo, E., Dacremont, C., & Peyron, D. (2010). Combining olfactory and gustatory clues in the judgment of aging potential of red wine by wine professionals. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 15-22.
- [159] Escalona, E., Birkmyre, L., Piggot, J.R., & Paterson, A. (2002). Effect of maturation in small oak casks on the volatility of red wine aroma compounds. *Analytica Chimica Acta*, 458, 45-54.
- [160] Ugliano, M., Kwiatkowski, M. J., Travis, B., Francis, I. L., Waters, E. J., Herderich, M. J., & Pretorius, I. S. (2009). Post-bottling management of oxygen to reduce off-flavour formation and optimize wine style. *Wine Industry Journal*, 24, 24-28.

Sección II

Estudio de la contribución de la matriz no volátil a las características gustativas de los vinos tintos.



SECCIÓN II. PRESENTACIÓN

1. INTRODUCCION

Todo el proceso vitivinícola está enfocado a la obtención de *vinos de calidad*, pero ¿qué son *vinos de calidad*?. De los parámetros químicos que habitualmente se manejan durante la elaboración del vino, es la acidez volátil el que más información puede reportarnos sobre un importante defecto, que indicaría falta de calidad del vino. Análisis más detallados de la composición química pueden revelar la existencia de otros defectos principalmente relacionados con el aroma, ya que esto no ocurre con las características percibidas en boca. No obstante, algunas notas aromáticas como el "cuero", considerada defecto por expertos no lo es tanto para los consumidores [1], lo que obviamente conduce a diferentes conceptos de calidad. Así, una variable importante para poder definir y tratar de concretar la calidad de un vino son las características organolépticas y la percepción que de ellas tenga la(s) persona(s) que las percibe donde el grado de conocimiento de producto es muy importante [1]. En la actualidad, la evaluación de las características organolépticas es una de las mejores formas, sino la única, de poder tener una medida del concepto de calidad de los vinos que puede tener un determinado segmento de la población. Las propiedades organolépticas utilizadas para evaluar un vino son el aspecto visual, el aroma y el sabor y sensaciones táctiles. Estas últimas aparecen como criterios empleados tanto por los consumidores como por los expertos a la hora de describir la calidad. Así, descriptores tales como vinos planos, redondos, elegantes, carnosos, potentes o persistentes son algunos atributos empleados para describir no sólo la intensidad de las sensaciones percibidas sino también su calidad.

Actualmente, los más modernos análisis de laboratorio pueden revelar una parte importante de las características de los vinos así como detectar ciertos defectos, sin embargo, no son capaces de evaluar todos los parámetros relacionados con la calidad y el sabor de los vinos. En este sentido, tales resultados analíticos no permiten distinguir entre lo que podría considerarse un vino estándar y un gran vino, o dicho de otra forma, vinos con idénticas características físico-químicas pueden presentar valoraciones muy diferentes. Por tanto, la evaluación mediante el análisis sensorial se convierte en un aspecto esencial para la evaluación de la calidad y el sabor. Sin embargo, a pesar de que se han realizado algunos intentos a la hora de correlacionar los resultados sensoriales y la concentración de moléculas responsables del sabor [2-5] así como con la calidad [5] todavía no existe un estudio completo y sistemático que sea capaz de aportar la

información necesaria para localizar las moléculas o grupo de moléculas clave que caractericen estas sensaciones organolépticas.

Por otro lado, estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio [7, 8] han demostrado fuertes interacciones entre la percepción del sabor y las sensaciones táctiles con las moléculas del aroma. Dicha interacción se manifiesta primeramente en la atribución de propiedades sápidas a los aromas [9-11], fenómeno relacionado con la experiencia previa y con la similaridad perceptual [12]. La interacción más importante que se produce es aquella en la que existe una supresión o potenciación de gustos por la percepción simultánea de olores [13, 14], lo que puede tener lugar a concentraciones por debajo de la concentración del umbral sensorial [15]. Por ejemplo, uno de los odorantes que más interacciona con el sabor dulce es la vainilla [16], aunque también el aroma de coco (relacionado con γ -lactonas encontradas en el vino) se ha visto que potencia el amargor [17], al igual que el cis-3-hexenol [18].

Por otro lado, también se ha demostrado el fenómeno contrario, esto es, la influencia del gusto y las sensaciones táctiles en la percepción aromática [19, 20-22]. Dichas interacciones parecen ser específicas del producto [17]. Cabe destacarse que aunque este tema se ha abordado relativamente poco en el caso del vino [22], muchas de las moléculas empleadas por los investigadores para estudiar la interacción gusto/olfato en disoluciones sintéticas, así como las presentes en otros productos son moléculas que se encuentran en el vino. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las conclusiones obtenidas a partir de disoluciones sintéticas, u otras matrices pueden variar en una matriz tan compleja como es el vino. De hecho, como ejemplo existen resultados contradictorios acerca de la contribución del etanol a la astringencia del vino, existiendo trabajos con disoluciones sintéticas simples donde el aumento de etanol conduce a un descenso de la astringencia [23, 24], otros donde el aumento de etanol en la misma magnitud no se traduce en ningún cambio en la percepción de astringencia [25] y otros con disoluciones sintéticas más complejas donde un aumento en el contenido en etanol produce un aumento significativo de esta percepción [26, 27].

A pesar de haberse realizado progresos en este tema, se sigue sabiendo muy poco acerca de la interacción entre moléculas con propiedades gustativas y quemoestésicas y prácticamente nada acerca de la interacción entre éstas y las moléculas aromáticas del vino. Sin embargo dicha interacción es crítica para la comprensión de la calidad del vino, existiendo bases científicas bien fundadas acerca de la implicación de aromas en la percepción gustativa, táctil y quemoestésica y a la

inversa. En esta línea, nuestro grupo de investigación ha desarrollado un método para la desaromatización de la fracción no volátil y su posterior reconstitución con etanol y la fracción volátil obteniendo vinos reconstituidos sensorialmente similares a vinos reales, que han permitido avanzar en la investigación y demostrar la existencia de fuertes interacciones entre la matriz volátil y no volátil [4, 22].

Por todo ello, en esta sección de la memoria se presenta el efecto que ejerce la matriz volátil en la percepción del sabor de los vinos tintos mediante la evaluación sensorial de distintas muestras de vino reconstituido, que se han preparado combinando distintas matrices no volátiles con la misma fracción volátil. Igualmente, se presenta la contribución de determinados compuestos, principalmente fenólicos, a la astringencia y a la calidad evaluada en boca, mostrando fuertes interacciones entre moléculas de la misma familia incluso entre isómeros.

2. OBJETIVOS GENERALES

El interés de los tres Capítulos presentados en esta sección se articula en torno a los siguientes objetivos generales y bajo la hipótesis de que es posible, mediante el conocimiento de la composición química del vino (odorantes, precursores, material polifenólico, composición no volátil) junto con un conocimiento de las interacciones que se producen entre ellos determinar cuáles van a ser las propiedades sensoriales, así como la calidad de un vino:

- Evaluar la implicación que las moléculas de la fracción no volátil tienen en la percepción del sabor y astringencia.
- Evaluar en qué medida la percepción retronasal y ortonasal del aroma modifica la percepción en boca de los vinos tintos.
- Determinar la implicación y contribución de determinadas moléculas no volátiles en la astringencia y calidad en boca de los vinos tintos.

3. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Sáenz-Navajas, M.P., Ballester, J., Pêcher, C., Peyron, D., Valentin, D. (2013). Sensory drivers of intrinsic quality of red wines. Effect of culture and level of expertise. *Food Research International* 54, 1506-1518
- [2] Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008a). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1376–1386.
- [3] Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008b). Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9190–9199.
- [4] Sáenz-Navajas, M., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry*, 121, 1139–1149.
- [5] Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2014). Contribution of low molecular weight phenols to bitter taste and mouthfeel properties in red wines. *Food Chemistry* 154, 187-198.
- [6] Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2013). Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61), 8861-8870.
- [7] Sáenz-Navajas, M.P., Fernandez-Zurbano, P., Tao, Y.S., Dizy, M., & Ferreira, V. (2010) Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12407-12416.
- [8] Sáenz-Navajas, M.-P., Ferreira, V., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultraperformance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 673, 151–159.
- [9] Stevenson, R. J., Prescott, J., & Boakes, R. A. (1995). The acquisition of taste properties by odors. *Learning and Motivation*, 26, 433-455.
- [10] Stevenson, R. J., Boakes, R. A., & Prescott, J. (1998). Changes in odor sweetness resulting from implicit learning of a simultaneous odor-sweetness association: An example of learned synesthesia. *Learning and Motivation*, 29, 113-132.
- [11] Stevenson, R. J., Oaten, M. J. (2010). Sweet odours and sweet tastes are conflated in memory. *Acta Psychologica*, 134, 105-109.
- [12] Schifferstein, H. N. J., & Verlegh, P. W. J. (1996). The role of congruency and pleasantness in odor-induced taste enhancement. *Acta Psychologica*, 94, 87-105.
- [13] Delwiche, J. (2004). The impact of perceptual interactions on perceived flavor. *Food Quality and Preference*, 15, 137-146.
- [14] Prescott, J. (1999). Flavour as a psychological construct: implications for perceiving and measuring the sensory qualities of foods. *Food Quality and Preference*, 10, 349-356.

- [15] Dalton, P., Doolittle, N., Nagata, H., & Breslin, P. A. S. (2000). The merging of the senses: integration of subthreshold taste and smell. *Nature Neuroscience*, 3, 431-432.
- [16] Sakai, N., Kobayakawa, T., Gotow, N., Saito, S., & Imada, S. (2001). Enhancement of sweetness ratings of aspartame by a vanilla odor presented either by orthonasal or retronasal routes. *Perceptual and Motor Skills*, 92, 1002-1008.
- [17] Labbe, D., Damevin, L., Vaccher, C., Morgeneegg, C., & Martin, N. (2006). Modulation of perceived taste by olfaction in familiar and unfamiliar beverages. *Food Quality and Preference*, 17, 582-589.
- [18] 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, (3), 219-227.
- [19] Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., & Waters, E. J. (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19, 596-607.
- [20] Dufour, C., & Sauvaitre, I. (2000). Interactions between anthocyanins and aroma substances in a model system. Effect on the flavor of grape-derived beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1784-1788.
- [21] Dufour, C., & Bayonove, C. L. (1999). Interactions between wine polyphenols and aroma substances. An insight at the molecular level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 678-684.
- [22] Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5574-5585.
- [23] Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., Waters, E., & Cheynier, V. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15, 209-217.
- [24] Lea, A. G. H., & Arnold, G. M. (1978). Phenolics of ciders—bitterness and astringency. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 478-483.
- [25] Fischer, U., Boulton, R. B., & Noble, A. C. (1994). Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationships between saliva flow rate and temporal perception or gustatory stimuli. *Food Quality and Preference*, 5, 55-64.
- [26] Sowalsky, R. A., & Noble, A. C. (1998). Comparison of the effects of concentration, pH and anion species on astringency and sourness of organic acids. *Chemical Senses*, 23, 343-349.
- [27] Obreque-Slier, E., Pena-Neira, A., & Lopez-Solis, R. (2010). Enhancement of both salivary protein-enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3729-3735.

SECCIÓN II. CAPÍTULO I

Contribución de las fracciones no volátil y volátil en las propiedades sensoriales en boca de los vinos tintos: Estrategias de reconstrucción química y clasificación sensorial.

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de interacciones sensoriales tanto en disoluciones sintéticas sencillas, que contienen compuestos naturales presentes en el vino [1, 2], así como en otros sistemas más complejos ha sido ampliamente demostrado en la bibliografía científica [3, 4]. En general, los estudios sensoriales llevados a cabo con alimentos están de acuerdo en las siguientes conclusiones: (a) las interacciones dependen de los productos estudiados debido a la presencia de enlaces físico-químicos entre las moléculas responsables de la liberación de diferentes patrones de la fracción volátil, y (b) el flavor percibido es el resultado de las interacciones a nivel cognitivo. Por lo tanto, trabajar con matrices complejas similares al producto real es esencial para aumentar el conocimiento acerca de las interacciones del flavor, tal y como se pone de manifiesto en la bibliografía [5]. Recientemente, se ha desarrollado una metodología relativamente simple para la obtención de muestras reconstituidas de vino [6], que ha hecho posible evaluar la existencia y los efectos tanto de interacciones físico-químicas [7] como cognitivas [6] en muestras de vino. Respecto a las primeras [7], se ha observado que la matriz no volátil del vino ejerce una gran influencia en la liberación de compuestos odorantes. Estas interacciones físico-químicas son suficientemente fuertes incluso para hacer que el aroma de un vino blanco huela como el de un vino tinto y viceversa, y también para crear ciertas diferencias en el aroma percibido entre vinos tintos [7]. Respecto a las interacciones cognitivas [6], se ha observado que extractos de aroma frutal procedentes de vinos blancos son capaces de aumentar la intensidad de la percepción del sabor dulce y de disminuir la astringencia y el amargor en todo tipo de vinos, condicionando también la intensidad global y la persistencia en vinos blancos [6]. Sin embargo, los efectos causados por los extractos del aroma de vinos tintos en las propiedades sensoriales en boca son menos claros. De hecho, al reemplazar la fracción aromática de un determinado vino tinto por la fracción aromática extraída de otro vino tinto muy diferente no produjo ningún efecto consistente en el sabor, la astringencia o la persistencia, lo que sugiere que la fracción aromática sólo desempeña un papel secundario en los atributos evaluados en boca de los vinos tintos. Este resultado

aparentemente está en contra del hecho experimental observado en el proceso de desaromatización de vinos tintos, donde los vinos tintos desaromatizados presentan poca o ninguna estructura sávida y conlleva una evidente pérdida de equilibrio gustativo, lo que sugiere que la composición aromática en realidad sí contribuye activamente en la percepción sensorial en boca. Se puede pensar en dos posibles explicaciones no excluyentes para esta aparente contradicción. La primera de ellas estaría relacionada con la necesidad de la presencia de una cierta cantidad mínima, pero no crítica, de compuestos aromáticos para encontrar un perfil sensorial equilibrado en boca. En este caso, pequeños cambios representados por la sustitución de una composición aromática de vino tinto por una segunda procedente también de vino tinto, no serían suficientes para crear cambios tan fuertes como los observados en vinos completamente desaromatizados. La segunda explicación sería que los cambios en las percepciones sensoriales en boca introducidos al cambiar la composición aromática podrían haber pasado desapercibidos por la metodología descriptiva cuantitativa utilizada en trabajos anteriores [6]. En estos, los descriptores medidos en boca fueron limitados a atributos del sabor, astringencia, intensidad global y persistencia. En el caso en el que los cambios estén relacionados con atributos como “plenitud en boca”, “cuerpo”, “redondez”, “mineralidad”, atributos usados frecuentemente por catadores profesionales para definir las propiedades en boca del vino, o relacionados con la percepción del aroma en boca, harían que dichos cambios no hubieran sido reflejados en los resultados. Debido a este hecho, se ha elegido esta vez un método sensorial no verbal conocido como prueba de clasificación (sorting task), ya que este método proporciona una evaluación general del grado de similitud entre muestras sin requerir una definición previa de los atributos sensoriales.

La prueba de clasificación es un procedimiento simple, muy empleado en psicología y que últimamente se ha extendido al análisis sensorial, en el que se pide a los participantes que examinen las muestras y las agrupen de acuerdo a propiedades similares (olor, sabor, color, etc.). El procedimiento de clasificación se basa en un proceso cognitivo usado naturalmente en la vida cotidiana y que no requiere una evaluación cuantitativa de los estímulos. Se ha demostrado que esta prueba se adapta especialmente bien a la evaluación de alimentos, ya que es rápido y produce poca fatiga y tedio, aunque pueden aparecer problemas de memoria a corto plazo cuando tiene que evaluarse un gran número de muestras o productos (> 20 muestras) [8, 9]. De manera, que se ha observado que el número óptimo de productos complejos a evaluar

podría situarse entre 9 y 20 muestras [8, 10]. Estos tests suelen ir seguidos por una breve caracterización de los grupos establecidos mediante unos pocos atributos, con el fin de tener una descripción basta de los productos. El tratamiento de los datos se basa frecuentemente en el escalado multidimensional (MDS, *Multidimensional Scaling*) y puede incluir también el estudio de correlaciones entre las dimensiones MDS y los atributos sensoriales o físico-químicos de las muestras [11, 12]. A pesar de que existen pequeñas diferencias, los mapas de percepción obtenidos de las pruebas de clasificación son globalmente comparables con aquellos obtenidos por un análisis descriptivo clásico [13, 14]. Este método ha sido utilizado en una amplia variedad de bebidas como agua potable [16, 17], cerveza [8] o vino [18, 19].

El presente capítulo se ha diseñado con el fin de determinar hasta qué punto la fracción no volátil de los vinos tintos es responsable de las similitudes/diferencias del flavor percibido en boca. Para lograr tal objetivo, se llevó a cabo una prueba de clasificación con un grupo de muestras formado por 4 vinos tintos comerciales y 10 vinos reconstituidos, que contenían matrices no volátiles muy diferentes pero idéntica composición aromática. Se pidió a los participantes que agrupasen las muestras de acuerdo al flavor global percibido en boca. La prueba de clasificación se llevó a cabo bajo tres condiciones diferentes de evaluación: (a) con la nariz tapada y por lo tanto sin percepción del aroma (NA), (b) permitiendo únicamente la percepción del aroma retronasal (RA), y (c) permitiendo tanto la percepción del aroma retronasal como el ortonasal (ROA). La hipótesis inicial de trabajo fue que la composición volátil desempeña un papel primordial en la percepción global de las sensaciones en boca y, por consiguiente, que las muestras que comparten composición aromática deberían ser percibidas de manera más similar en las condiciones que permiten la percepción del aroma (RA y ROA) que en la condición que no lo permite (NA).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Estudio piloto.

Este primer estudio tiene como objetivo obtener una visión general de la agrupación de las muestras (vinos y reconstituidos) en el espacio MDS derivado de la prueba sensorial de clasificación y compararla con la posición de estas muestras en el gráfico de componentes principales derivado de la composición química de la fracción no volátil de los vinos.

2.1.1. Muestras.

En el presente estudio se emplearon un total de 14 muestras (ver Tabla I-1). Cuatro de éstas (numeradas del 1 al 4 en la tabla) eran vinos tintos comerciales. Las otras 10 muestras (numeradas del 5 al 14 en la tabla, siendo réplicas las muestra 5 y 11) fueron vinos reconstituidos preparados mezclando la fracción no volátil (fracción del sabor sin olor) de nueve vinos comerciales, que presentaban grandes diferencias en la composición polifenólica (IPTs entre 77.4 - 50.6 para los vinos Muga (W_Mug) y Estola (W_Est) respectivamente) con la fracción volátil aromática de un mismo vino (muestra 1, Muga Reserva 2004). Las fracciones no volátiles se prepararon por liofilización y posterior extracción líquido-líquido, mientras que los extractos volátiles se prepararon mediante extracción en fase sólida como se describe en la bibliografía [6], pero con las siguientes modificaciones. La extracción se realizó con cartuchos de extracción en fase sólida (SPE) (en tubos de 6 mL) rellenos con 2000 mg de resina LiChrolut EN, los cuales se colocaron en un equipo de extracción (VAC ELUT 20 Station, Varian) y se acondicionaron pasando lentamente 20 mL de etanol y 30 mL de una disolución hidroalcohólica (12% etanol (v/v), 5 g L⁻¹ de ácido tartárico, ajustando el pH a 3.0 con NaOH 0.1 M). A continuación, se pasaron 500 mL de vino. Después, se introdujo una etapa de lavado para eliminar las moléculas apolares astringentes (moléculas del tipo flavonol). Para ello, se hicieron pasar en primer lugar 17.5 mL de agua (pH 3.0) y después 75 mL de una disolución de agua/etanol (70/30 v/v). El cartucho se aclaró posteriormente con 16 mL de disolución hidroalcohólica, y finalmente los compuestos volátiles fueron eluidos con 16 mL de etanol, usando presión positiva con el fin de evitar el contacto con el aire. Por último, el extracto fue fortificado con BHA (Butilhidroxianisol, 10 mg L⁻¹) para evitar posibles oxidaciones y fue almacenado en viales sellados sin espacio de cabeza a una temperatura de - 25 °C hasta la preparación de las muestras.

Los vinos reconstituidos finales se prepararon mezclando 16 mL de extracto etanólico volátil (correspondiente al extracto volátil de 500 mL de vino), 100 mL de extracto no volátil (procedentes de 500 mL de vino) y 51.5 mL de etanol, llevando la mezcla a un volumen final de 500 mL con agua mineral embotellada Solán de Cabras®. El contenido final de etanol de las muestras fue 13.5 (v/v). Se ha comprobado que esta metodología es muy útil para proporcionar la misma composición aromática a diferentes matrices no volátiles de vino [6, 7]. El proceso completo se llevó a cabo por triplicado y la muestra (500 mL) procedente de cada tres reconstituciones se mezcló con el fin de obtener 1500 mL de 10 vinos reconstituidos homogéneos. Dos de estas 10 muestras reconstituidas fueron réplicas (muestras 5 y 11), por lo que también se mezclaron para obtener muestras idénticas y evitar un efecto final de la botella. Por tanto, se obtuvieron 10 vinos reconstituidos (uno por duplicado) que contenían diferentes matrices no volátiles con exactamente la misma composición aromática y con el mismo contenido de etanol (ajustado a 13.5% (v/v)). Estos diez vinos reconstituidos, junto con cuatro de los vinos comerciales originales (en este caso manteniendo su aroma original) fueron sometidos a análisis químicos y sensoriales.

Tabla I-1: Muestras (cuatro vinos originales y diez vinos reconstituidos) empleadas en el experimento

| Muestra | Código de muestra | Tipo de muestra | Vino | |
|---------|-------------------|--------------------|---|-------------------------|
| 1 | W_Mug (1) | Vino | Muga Reserva 2004, D.O.Ca.Rioja | |
| 2 | W_Val (2) | Vino | Finca Valpiedra Reserva 2005, D.O.Ca.Rioja | |
| 3 | W_Neo (3) | Vino | Neo Reserva 2007, D.O.Ribera del Duero | |
| 4 | W_Est (4) | Vino | Estola crianza 2005, D.O.Mancha | |
| | | | Fracción no volátil | Fracción volátil |
| 5 | R_Mug1 (5) | Vino Reconstituido | Muga Reserva 2004, D.O.Ca.Rioja | Muga Reserva |
| 6 | R_Val (6) | Vino Reconstituido | Valpiedra Reserva 2005, D.O.Ca.Rioja | Muga Reserva |
| 7 | R_Neo (7) | Vino Reconstituido | Neo Reserva 2007, D.O.Ribera del Duero | Muga Reserva |
| 8 | R_Est (8) | Vino Reconstituido | Estola Crianza 2005, D.O.Mancha | Muga Reserva |
| 9 | R_Mon (9) | Vino Reconstituido | La Montesa Reserva 2001, D.O.Ca.Rioja | Muga Reserva |
| 10 | R_Gan (10) | Vino Reconstituido | Fincas de Ganuza Reserva 2003, D.O.Ca.Rioja | Muga Reserva |
| 11 | R_Mug2 (11) | Vino Reconstituido | Muga Reserva 2004, D.O.Ca.Rioja | Muga Reserva |
| 12 | R_San (12) | Vino Reconstituido | San Róman 2005, D.O.Toro | Muga Reserva |
| 13 | R_Car (13) | Vino Reconstituido | Carmelo Roderer Reserva 2004, D.O. Ribera del Duero | Muga Reserva |
| 14 | R_One (14) | Vino Reconstituido | Les Ones 2002, D.O.Ca.Priorat | Muga Reserva |

2.1.2. Análisis químicos.

Los parámetros enológicos convencionales de los vinos se determinaron de acuerdo con las prácticas oficiales de la OIV. Los ácidos málico y láctico se determinaron mediante métodos enzimáticos según los métodos oficiales de análisis de la AOAC [20]. El Índice de Polifenoles Totales (IPT) se estimó como la absorbancia a 280 nm y la Intensidad de Color (IC) como la suma de absorbancias a 420 nm, 520 nm y 620 nm [21]. Los análisis de azúcares reductores, contenido de etanol, pH, acidez total y acidez volátil se realizaron por Espectrometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier (IRFT) con un equipo WineScan™ FT 120 (FOSS®, Barcelona), que fue previamente calibrado con los métodos oficiales de la OIV. Las proantocianidinas precipitables con proteína (PPAs) se estimaron usando ovoalbúmina como agente de precipitación y disoluciones de ácido tánico como patrones de acuerdo por el método descrito en la bibliografía [22]. Todas las determinaciones se llevaron a cabo por triplicado a temperatura ambiente (20 ± 2 °C).

2.1.3. Prueba de clasificación. (*Sorting task*)

Participantes.

Un total de 35 jueces (18 mujeres y 17 hombres) con edades comprendidas entre 25 y 56 años (edad media = 34 años) participaron en el estudio piloto. Los panelistas eran miembros del personal de la Universidad de La Rioja y del Instituto de Ciencias de la Vid y del Vino. Todos ellos formaban parte de un panel de cata de vino entrenado en el análisis sensorial descriptivo. Por tanto, tenían una larga experiencia en análisis sensorial (al menos seis meses), aunque ninguno de ellos tenía experiencia en procedimientos de pruebas de clasificación. Previo a los experimentos, los panelistas participaron en dos sesiones preliminares de una hora de duración, durante las cuales se familiarizaron con: (a) muestras similares a aquellas empleadas en el estudio (se presentaron grupos de vinos reconstituidos junto con vinos comerciales). Sin ser conscientes de ello, en estas sesiones los panelistas evaluaron indistintamente vinos originales (W_Mug, W_Val, W_Est, W_Neo) y reconstituidos (R_Mug, R_Val, R_Est, R_Neo, R_Mon, R_Gan, R_San, R_Car, R_One) y discutieron abiertamente acerca de las propiedades gustativas y aromáticas. Ninguno de ellos hizo comentario alguno en cuanto a posibles diferencias en la naturaleza de las muestras, (b) con el volumen de muestra (15 mL) y (c) con el uso de una tapa especial en las copas durante la evaluación de los vinos con la que se evitaba la percepción orthonasal.

Evaluación de las muestras.

Cada panelista participó en una sesión de 45 minutos de duración. A los participantes se les presentaron las 14 muestras del estudio (15 mL) en copas negras normalizadas [23], con tapas similares a las del café, tal como se muestra en la Figura I-1, codificadas con un número de tres cifras y colocadas en orden aleatorio. Se pidió a los participantes que agruparan los 14 vinos en base a sus similitudes según las sensaciones globales percibidas en boca (aroma, sensación táctil, sabor, intensidad, persistencia...) (ver ANEXO I). Como ayuda para recordar, los panelistas pudieron tomar notas personales. Los participantes podían hacer tantos grupos como ellos desearan. Una vez completada la tarea, escribieron los códigos de las muestras de cada grupo en una ficha destinada a este fin (ver ANEXO II).



Figura I-1. Puesto preparado para la prueba de clasificación de las 14 muestras.

Entre muestra y muestra los panelistas tenían que hacer uso de un protocolo de enjuague con el fin de evitar efectos sensoriales acumulativos (especialmente de la astringencia y amargor) (ver ANEXO III). Este protocolo de enjuague se aplicó tras la evaluación de cada vino, de manera que una vez expectorado se enjuagaban la boca con una disolución de pectina (1 g L^{-1}) que se expectoraba a los 10 segundos. Entre los enjuagues con pectina y los vinos, los participantes se enjuagaron la boca dos veces con agua desionizada, durante 20 segundos, según lo descrito por Colonna y col. (2005) [24]. Todos los vinos fueron servidos a temperatura ambiente y fueron evaluados en

cabinas individuales. Las sesiones tuvieron lugar en una sala de análisis sensorial con aire acondicionado para el control de la temperatura (aproximadamente a 20 °C). A los panelistas no se les informó sobre la naturaleza de las muestras.

2.1.4. Análisis de datos.

Datos químicos.

Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) para el grupo de variables químicas. Después se aplicó un análisis clúster jerárquico (HCA) con el criterio de Ward a las coordenadas factoriales de las muestras en el espacio definido por el PCA. Los términos que mejor caracterizaron cada uno de los clústers fueron identificados utilizando el parámetro del valor-test [25]. El valor test corresponde a un criterio estadístico similar a una estandarización de variables (media = 0 y desviación típica = 1). Los análisis se llevaron a cabo con el software SPAD (versión 5.5, CISIA-CERESTIA, Montreuil, Francia).

Datos de la prueba de clasificación.

Para cada sujeto, los resultados se codificaron en una matriz individual de similitudes (vinos x vinos), en la que 1 significa que dos vinos se han establecido en el mismo grupo y 0 para dos vinos colocados en grupos diferentes. Estas matrices individuales se sumaron con todos los sujetos; la matriz de co-ocurrencia resultante representa la matriz global de similitud donde los números más elevados indican mayor similitud entre muestras. La suposición subyacente de este método es que las muestras agrupadas juntas son más similares que las muestras agrupadas en grupos diferentes.

Escalado multidimensional (MDS) y análisis clúster (HCA).

La matriz de co-ocurrencia se sometió a un análisis de escalado multidimensional (MDS) con el fin de obtener una representación espacial de los vinos [12]. Se utilizó un algoritmo de escalado no paramétrico (alternando un escalado de mínimos cuadrados). Este procedimiento busca de manera iterativa una solución conservando el orden jerárquico de las similitudes percibidas entre productos. La calidad del ajuste se midió por el valor de stress, que está basado en la suma de los cuadrados de las distancias entre objetos observados en los datos sin procesar (datos iniciales) y objetos observados en el espacio MDS p -dimensional (datos finales). El stress varía de 0 (ajuste perfecto) a 1 (peor ajuste posible), generalmente un valor por debajo de 0.2 se considera como un buen acuerdo entre las configuraciones iniciales y finales [26]. El análisis MDS se realizó con el software SAS/STAT versión 6.0 (SAS Institute Inc., Cary, New York, EEUU). Las

coordenadas de las muestras en la configuración MDS retenida se sometieron a un análisis clúster (HCA) con el criterio de Ward (algoritmo RECIP) para medias con el software SPAD (versión 5.5, CISIA-CERESTIA, Montreuil, Francia). El HCA hace que sea posible comprobar la disposición espacial de los datos MDS y mejorar la interpretación del mapa sensorial identificando los vinos que pertenecen al mismo clúster [25].

2.2. Estudio a gran escala.

Dos meses después de la realización del estudio piloto y a la vista de los resultados preliminares se realizó un segundo estudio a mayor escala. Este segundo estudio introdujo cambios en (a) la preparación de los extractos y (b) la estrategia sensorial. En primer lugar, se propuso evaluar si la repetición de la prueba de clasificación con vinos reconstituidos preparados a partir de extractos más próximos a los vinos originales desde el punto de vista químico (incluyendo una corrección de la acidez volátil), conduciría a resultados similares a los obtenidos en el estudio piloto. Este hecho se confirmaría o refutaría por un estudio independiente con las mismas muestras bajo las mismas condiciones (evaluación RA). En segundo lugar, en este nuevo estudio la prueba de clasificación se realizó bajo dos condiciones adicionales con el fin de explorar si la composición aromática puede modificar la percepción global en boca. Los experimentos fueron llevados a cabo por un total de 30 panelistas (18 mujeres y 12 hombres entre 24 y 45 años, edad media = 30 años) procedentes de los 35 panelistas anteriores que realizaron el estudio piloto.

Primero, el examen de los datos químicos de los extractos reconstituidos empleados en el estudio piloto resaltó que la acidez volátil de dichas muestras estuvo por debajo de 0.1 g L^{-1} como consecuencia del lavado del extracto con una disolución hidroalcohólica. Por esta razón, en el nuevo protocolo, después de la elución de los compuestos volátiles con etanol, los extractos eluidos fueron fortificados con ácido acético para corregir la pérdida de este compuesto, hasta alcanzar un acidez volátil final de 0.30 g L^{-1} aproximadamente. Además, se pretendió confirmar los resultados preliminares al repetir la prueba sensorial de clasificación con muestras reconstituidas preparadas a partir de extractos en los que la acidez volátil fue corregida. En segundo lugar, se planteó si las distancias en el mapa MDS entre muestras que comparten el aroma serían las mismas o no bajo las condiciones de evaluación con diferentes niveles de accesibilidad a la información aromática. Para esto, los panelistas llevaron a cabo tres pruebas de clasificación distintas que tuvieron lugar al menos con un día de diferencia. En cada una

de las tres sesiones los panelistas realizaron la prueba exclusivamente bajo una de las tres condiciones, en el orden en que se presentan a continuación:

(a) **Sesión 1:** con oclusión nasal mediante el uso de una pinza en la nariz (sin percepción del aroma, NA) (ver Figura I-2).

(b) **Sesión 2:** sin oclusión nasal, pero evitando la percepción ortonasal mediante el uso de una tapa de plástico (como las utilizados para café) que cubría la copa de vino (sólo posible la percepción retronasal de los odorantes, AR). Esta condición de evaluación es equivalente a la realizada durante el estudio piloto (ver Figura I-2).

(c) **Sesión 3:** sin oclusión nasal y sin tapa, lo que permite la percepción retronasal además de una percepción involuntaria ortonasal del aroma (ROA) (ver Figura I-2).



Figura I-2. Instrumentos para evitar la percepción de los aromas ortonasal y retronasal (NA), ortonasal (RA) y permitiendo la percepción de ambos.

A los panelistas se les presentaron en cada sesión las mismas muestras colocadas en orden aleatorio en copas negras aprobadas por la ISO [23] y codificadas con diferentes números de tres cifras.

Una vez establecidos los grupos, en una hoja específica (ver ANEXO II) anotaron los códigos de los vinos que formaban cada grupo. Con el propósito de ayudar a la comprensión de las estrategias de agrupación seguidas por los panelistas en cada condición de evaluación, se pidió a los participantes que seleccionan unos pocos términos de una lista (ver ANEXO IV) para describir las propiedades sensoriales que mejor caracterizan los vinos de cada grupo. La lista incluía los siguientes descriptores: frutos rojos, especias, madera, vegetal/verduras, animal, frutas amarillas, frutas blancas, cítricos, frutos secos, frutas pasas, sotobosque, floral y frutas negras; astringente, dulce, ácido y amargo, equilibrado, intenso aromáticamente o intenso globalmente. Para esta prueba adicional, los participantes pudieron degustar de nuevo el contenido restante de las muestras, pero no modificar los grupos ya establecidos.

2.2.1. Análisis de datos.

Datos químicos.

El PCA se calculó para el conjunto de datos de las variables químicas tal y como se explica en la sección del estudio piloto. Además, se calcularon los coeficientes de regresión lineales con el software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EEUU) con el fin de comprobar si existían correlaciones simples entre las variables químicas y las sensoriales.

Datos de la prueba de clasificación. Escalado multidimensional.

Los datos fueron sometidos a análisis MDS y HCA siguiendo la misma metodología que para el estudio piloto.

Análisis del vocabulario.

Cada panelista describió cada grupo de vinos con uno o dos términos de la lista. Los términos seleccionados para un grupo de muestras se asocian a cada uno de los vinos del grupo. La suposición subyacente dentro de este enfoque es que todas las muestras pertenecientes a un mismo grupo fueron descritos por los términos de la misma manera. Así, se calculó la frecuencia de citación de cada término y sólo los términos citados al menos por el 15% del panel (> 5 panelistas) fueron considerados.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Estudio piloto.

Por un lado, La Figura I-3 muestra la agrupación de las muestras de acuerdo con los datos químicos de la matriz no volátil. Por otro lado, la matriz de similitud obtenida de la prueba sensorial de clasificación dio como resultado la representación MDS que se muestra en la Figura I-4. Las dos primeras dimensiones llevan asociado un valor de stress aceptablemente bajo ($P < 0.05$) [26].

El análisis clúster de ambos conjuntos de datos generó exactamente los mismos dos grupos de muestras. En ambas figuras, el clúster 1 (*) se ha resaltado con una elipse. De acuerdo con el análisis clúster, aparecen dos grandes clústers: clúster 1 (icono de las muestras: *), formado por ocho muestras (San_R, R_Neo, R_Gan, R_Mug1, R_Mug2, W_Val, W_Neo y W_Mug) y clúster 2 (icono de las muestras: ^) formado por seis muestras (R_Est, W_Est, R_Car, R_Mon, R_Val y R_One).

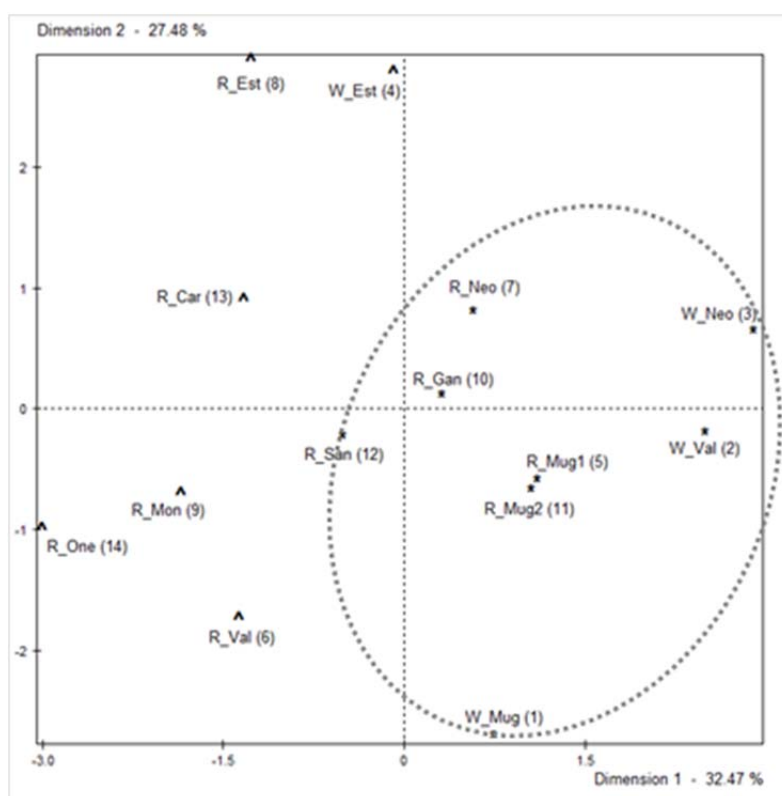


Figura I-3: Análisis de componentes principales obtenido con los datos químicos. Vinos con el mismo icono (* o ^) pertenecen al mismo clúster según el HCA.

Según el valor test aplicado a la matriz de los datos químicos, el primer grupo (*) se caracterizó significativamente ($P < 0.001$) por valores altos en contenido fenólico total (IPT) y en la intensidad del color (IC). Para los vinos pertenecientes a este grupo, se observó también una correlación significativa ($P < 0.05$) entre IPT y el contenido de proantocianidinas precipitables con proteína (PPAs). En gran cantidad de trabajos se ha encontrado que este último parámetro se correlaciona significativamente con la astringencia sensorial percibida en los vinos tintos [20, 25]. Esto sugiere que los jueces han clasificado las muestras en base a la astringencia. Así, los vinos del clúster 1 (*) parecen ser los más astringentes, habiendo sido clasificados en un grupo diferente a los menos astringentes, clúster 2 (^).

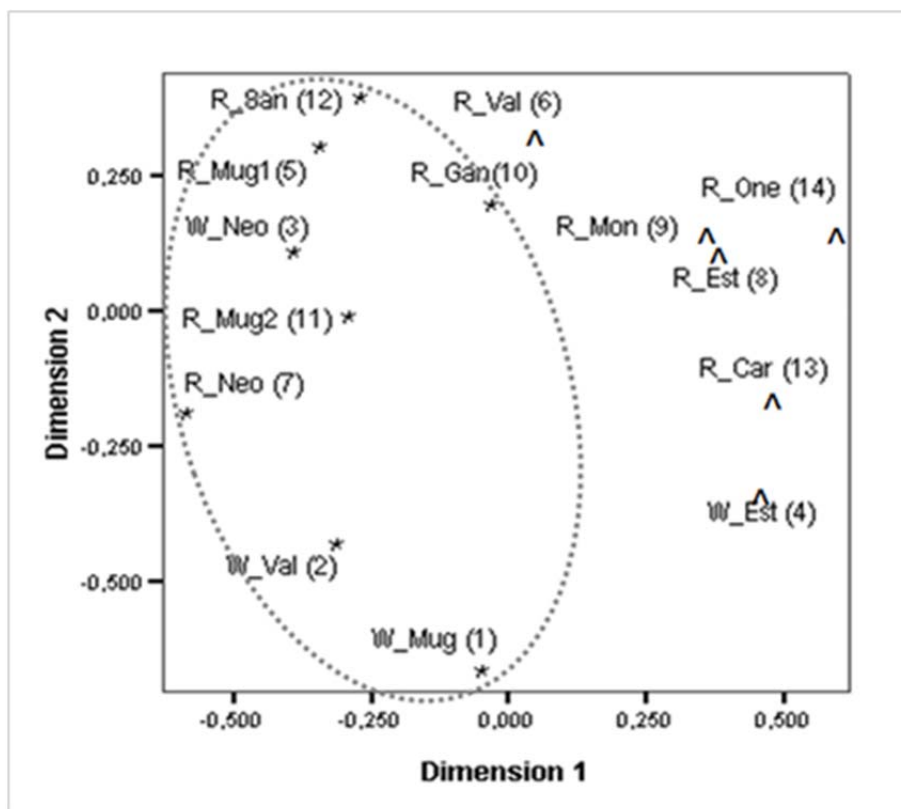


Figura I-4: Plano MDS obtenido de la prueba de clasificación en el estudio piloto. Vinos con el mismo icono (* o ^) pertenecen al mismo clúster según el HCA.

Estos resultados de este estudio apuntan que: (1) las muestras que comparten composición volátil no están agrupadas en el mismo clúster, y (2) los clústers derivados tanto de la clasificación de las variables químicas (composición no volátil) como de las dimensiones derivadas de la prueba de clasificación son en ambos casos exactamente iguales. Ambas observaciones sugieren que los participantes no clasificaron las muestras

basándose en las similitudes de las propiedades aromáticas de las muestras, sino que parece ser que lo hacen basándose en diferencias en la astringencia percibida.

3.2. Estudio a gran escala.

3.2.1. Análisis químicos.

La composición no volátil de las muestras de vino estudiadas se muestra en la Tabla I-2. El contenido en azúcares reductores fue el típico para vinos secos y estuvo en un rango desde 1.1 hasta 3.4 g L⁻¹. Los valores de pH (promedio = 3.6), y de acidez total (promedio = 5.2 g L⁻¹) fueron en todas las muestras relativamente altos y bajos respectivamente, ya que los vinos originales fueron elaborados principalmente con la variedad Tempranillo (> 70% en todos los casos). El contenido de etanol de los cuatro vinos originales varió entre 12.3% y 14.1% (v/v), mientras que todas las muestras reconstituidas contenían 13.5% (v/v) de etanol.

En cuanto a la composición fenólica es importante tener en cuenta que el IPT estuvo significativamente correlacionado tanto con el Índice de Color (F = 13.006, P = 0.004) como con las proantocianidinas precipitables con proteína (PPAs) (F = 20.586; P = 0.001). Respecto a la acidez volátil, todo los extractos de vino empleados para las reconstituciones fueron fortificados con idénticos contenidos en ácido acético (concentración media de 0.30 mg L⁻¹) con el fin de obtener vinos reconstituidos con una concentración de ácido acético más cercana a la de las muestras de vino comerciales. Con el fin de comprobar que la adición de ácido acético externa no provocó ningún extraño matiz sensorial, se realizó una prueba triangular enfrentando un reconstituido Muga vs. un reconstituido Muga fortificado con 0.30 mgL⁻¹ de este compuesto. Los resultados (4 respuestas correctas de 15 respuestas; no significativo) indicaron que la corrección de la acidez volátil en las muestras reconstituidas no introdujo ningún cambio relevante desde un punto de vista sensorial.

Con el fin de verificar que no existen diferencias drásticas entre los vinos originales y sus correspondientes vinos reconstituidos en lo que respecta a la composición no volátil global, se realizó un PCA seguido de análisis clúster para las 14 muestras y las variables químicas (Figura I-5). En general, la composición no volátil se mantuvo en los vinos reconstituidos en cuanto a los parámetros estudiados, ya que tres de los cuatro pares de muestras de vino reconstituido-vino original se representan juntos en el dendrograma derivado del análisis clúster (resaltado con una línea de puntos en la figura), a excepción de R_Val, que está situado aparte de W_Val como se puede ver en la Figura I-5.

Tabla I-2: Composición química de los vinos objetos de estudio

| Vino | pH | AV ^a (g L ⁻¹) | ATT ^b (g L ⁻¹) | AR (g L ⁻¹) | Acido Láctico (g L ⁻¹) | Alcohol (v/v) | IPT ^c (u.a.) | IC ^c (u.a.) | T |
|-------------|------|---|--|----------------------------|--|------------------|-------------------------|---------------------------|------|
| W_Mug (1) | 3.47 | 0.49 | 6.35 | 2.84 | 1.46 | 13.9 | 77.4 | 15.8 | 0.90 |
| W_Val (2) | 3.50 | 0.58 | 5.10 | 3.00 | 1.63 | 14.1 | 73.7 | 12.3 | 0.83 |
| W_Neo (3) | 3.77 | 0.55 | 5.19 | 1.72 | 1.82 | 13.5 | 73.8 | 13.1 | 0.99 |
| W_Est (4) | 3.59 | 0.61 | 5.20 | 3.40 | 1.38 | 12.3 | 50.6 | 7.3 | 0.43 |
| R_Mug1 (5) | 3.57 | 0.29 | 5.94 | 3.10 | 1.48 | 13.5 | 83.5 | 16.5 | 1.01 |
| R_Val (6) | 3.43 | 0.25 | 4.55 | 1.13 | 1.62 | 13.5 | 69.4 | 11.8 | 0.78 |
| R_Neo (7) | 3.89 | 0.37 | 5.19 | 1.80 | 1.77 | 13.5 | 80.2 | 12.6 | 1.11 |
| R_Est (8) | 3.70 | 0.41 | 4.68 | 3.44 | 1.30 | 13.5 | 49.3 | 8.3 | 0.48 |
| R_Mon (9) | 3.51 | 0.23 | 4.96 | 1.45 | 0.68 | 13.5 | 55.5 | 8.0 | 0.34 |
| R_Gan (10) | 3.41 | 0.29 | 5.42 | 2.30 | 0.80 | 13.5 | 65.6 | 11.6 | 0.59 |
| R_Mug2 (11) | 3.57 | 0.29 | 5.84 | 3.10 | 1.48 | 13.5 | 83.5 | 16.5 | 1.01 |
| R_San (12) | 3.55 | 0.28 | 4.19 | 1.82 | 0.62 | 13.5 | 65.9 | 10.6 | 1.09 |
| R_Car (13) | 3.67 | 0.36 | 5.16 | 3.23 | 1.11 | 13.5 | 67.7 | 13.2 | 0.92 |
| R_One (14) | 3.39 | 0.24 | 5.43 | 1.61 | 0.39 | 13.5 | 57.3 | 9.4 | 0.85 |

^a expresado en g L⁻¹ de ácido acético^b expresado en g L⁻¹ de ácido tartárico^c expresado en unidades de absorbancia (u.a)

Este hecho podría atribuirse a una pérdida de materia no volátil durante el proceso de reconstitución, posiblemente debido a las precipitaciones de azúcares, sales o polifenoles. Como se puede ver en la Tabla I-2, R_Val presenta menores contenidos en todas las variables medidas que los de su correspondiente vino original, W_Val.

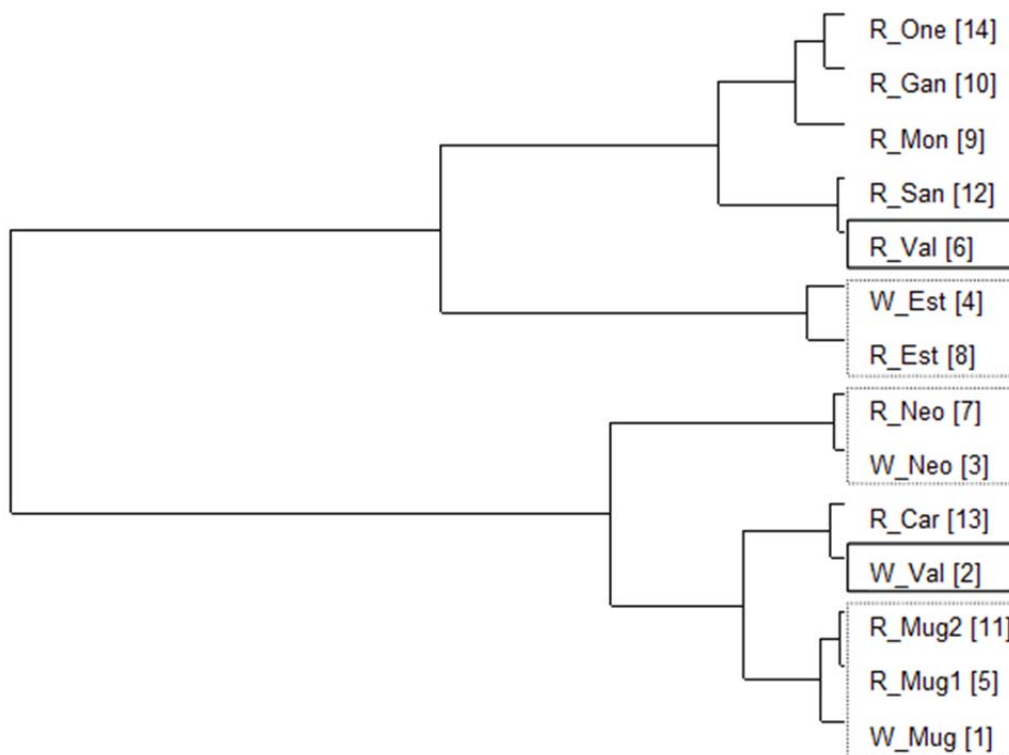


Figura I-5: Clústers obtenido de PCA-HCA calculados para los ocho parámetros químicos en las 14 muestras de vino (4 vinos W_Xxx y 10 reconstituidos (R_Xxx))

3.2.2. Análisis de la prueba de clasificación.

En las tres condiciones (NA, RA y ROA) se requirieron tres dimensiones para alcanzar valores de stress por debajo de 0.2, lo cual es indicativo de un buen ajuste a los datos de similitud [26]. Los gráficos se muestran en la Figura I-6. La reproducibilidad general del panel se exploró mediante el uso de las posiciones relativas del par de réplicas (R_Mug1 y R_Mug2) en los gráficos de MDS. El análisis clúster derivado de las coordenadas MDS de las muestras reveló que las muestras duplicadas se agruparon juntas bajo las tres condiciones. Sin embargo, las réplicas estaban mucho más cerca en la condición de NA, que en las condiciones de RA o ROA (ver Figura I-6a-c), lo que indica que el panel fue menos reproducible en estas dos últimas situaciones. Así, el número de veces que las dos réplicas se agruparon juntas fue mayor en la condición NA (9 veces, el

30% de los panelistas) que en las condiciones de RA y ROA, con 5 y 6 veces, respectivamente. Estos últimos valores están, de hecho, por debajo del nivel de azar, lo que sugiere que los sujetos encuentran más dificultades para identificar que estas muestras son equivalentes en las dos condiciones en las que el aroma se puede percibir.

El experimento a mayor escala confirma prácticamente los resultados derivados del estudio piloto utilizando una estrategia similar (la condición RA), pero con muestras en las que se había corregido la acidez volátil. Tal y como se puede observar comparando las Figuras I-4 y I-6b. En ambas configuraciones se observa como las muestras del clúster 1 (*) (W_Val, W_Mug, W_Neo, R_Val, R_Mug1, R_Mug2, R_Neo, R_Gan y R_San) se encuentran situados muy próximos y proyectados a la derecha de la Figura I-6b.

De manera adicional, el experimento a gran escala debería proporcionar claves sobre el papel de la percepción del aroma en las propiedades en boca. Si la hipótesis inicial de trabajo fuese cierta, las muestras reconstituidas que comparten un aroma común deberían agruparse juntas en los gráficos MDS para las condiciones en las que se permite la percepción de aroma. Los resultados del estudio preliminar (estudio piloto) efectivamente ya sugieren que no es el caso, dado que las agrupaciones de los vinos según la composición química no volátil (Figura I-3) y según la prueba de clasificación (Figura I-4) son en realidad equivalentes. En particular, si la hipótesis fuese correcta, se debería esperar un efecto de agrupación mayor debido al aroma común en la condición NA (sin percepción de aroma, ningún efecto de agrupación) que en las condiciones RA (sólo percepción de aroma retronasal, efecto de agrupación) y ROA (percepción de aroma orto y retronasal, el más fuerte efecto de agrupación). Sin embargo, los resultados experimentales derivados de los análisis MDS y clústers indican claramente que no se cumplen estas premisas, ya que las diferencias entre las muestras reconstituidas no se minimizan en las condiciones RA o ROA. De hecho, lo que se observa es más bien lo contrario: la adición de la misma composición aromática a diferentes fracciones no volátiles hace que se perciban las muestras incluso más diferentes entre ellas. En primer lugar, este hecho se puede confirmar puesto que los vinos reconstituidos se agrupan juntos significativamente ($F = 2.43$; $P = 0.092$) un menor número de veces en la condición de ROA (número promedio de panelistas que han agrupado juntas dos pares de muestras reconstituidos = 5.8 veces) que en las condiciones de NA y RA (promedio = 6.7 veces en ambas condiciones).

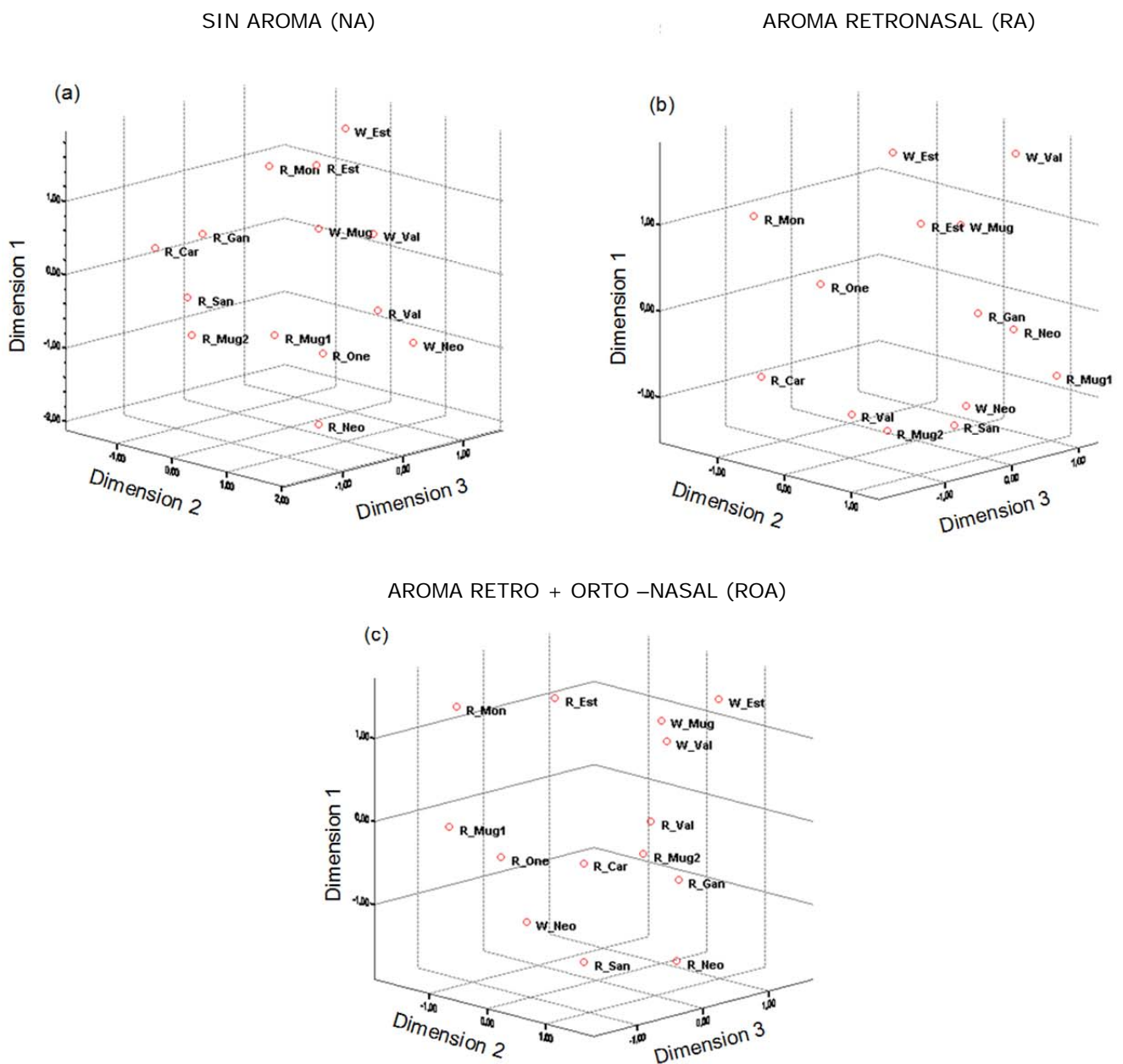


Figura I-6: Proyección de las configuraciones 3D del MDS resultantes de las matrices de similitud obtenidas a partir de la prueba de clasificación sensorial llevada a cabo bajo tres condiciones: (a) con nariz tapada sin percepción del aroma (NA), (b) nariz sin tapar pero evitando percepción ortonasal del aroma (RA), y (c) nariz sin tapar permitiendo la percepción ortonasal y retronasal (ROA).

En segundo lugar, el número de clústers proporcionado por el HCA en las distintas condiciones aumenta de dos, en el caso NA, a cuatro en el caso de ROA. Además, los vinos reconstituidos en esta última condición se clasificaron más separadamente.

Una posible idea para entender estos resultados inesperados viene del hecho de que el panel encuentra cada vez mayor dificultad para agrupar correctamente las muestras duplicadas (R_Mug1 y R_Mug2) en las condiciones RA y ROA. Se pueden proponer dos

explicaciones posibles. La primera es que los panelistas disponen de una mayor información sensorial y por lo tanto más compleja (estímulos tanto olfativos como gustativos) en las condiciones RA y ROA que en NA. Dicha dificultad sería incluso mayor en la condición ROA, en la que se activan los receptores olfativos en dos intervalos de tiempo diferentes (correspondientes a las percepciones ortonasal y retronasal), lo que daría lugar a un mayor nivel de interacciones entre los distintos sentidos (aroma-sabor, aroma-sensaciones táctiles, etc...) [28]. Una segunda explicación podría tener su origen en la mayor dificultad ligada a la prueba de clasificación de las muestras, la mayoría de las cuales tienen una composición aromática común. Esa dificultad sería mayor si el aroma tiene realmente un papel activo en la percepción en boca.

Por otro lado, y con la intención de comprender la estrategia seguida por el panel en la prueba de clasificación, las coordenadas de los vinos en el gráfico tridimensional MDS para cada condición se correlacionaron tanto con la composición no volátil (Tabla I-2) como con las descripciones verbales dadas por los sujetos después de la prueba de clasificación (Tabla I-3). Los resultados del estudio de correlación se resumen en la Tabla I-4. Como puede observarse, existe una asociación importante ($P \leq 0.01$) entre la Dimensión 1 y la "astringencia sensorial" en las tres condiciones. Del mismo modo, la primera dimensión en las tres condiciones está siempre significativamente correlacionada con el contenido en proantocianidinas precipitables con proteína (PPAs) ($P < 0.05$). De acuerdo con estos resultados, parece que el principal factor conducente a la clasificación de las muestras (independientemente de la condición de evaluación) es la percepción de astringencia, que depende directamente del contenido en PPAs. Esta observación está de acuerdo con los resultados del estudio piloto (ver las Figuras I-3 y I-4). Resulta interesante anotar, que en el caso de la condición NA, la primera dimensión está también ligeramente correlacionada tanto con el contenido en azúcares reductores como con la percepción del dulzor. La segunda dimensión se correlaciona con la acidez volátil y la tercera dimensión con la percepción sensorial de amargor. Esto significa que la mayor parte de la información retenida en la configuración 3-D del MDS de la condición de NA puede explicarse en términos de la percepción de los descriptores de astringencia y los sabores básicos dulzor y amargor. Por el contrario, en ambas condiciones donde está disponible el aroma (RA y ROA) ninguna de las descripciones verbales proporcionadas por el panel se correlacionó significativamente con la segunda o tercera dimensión. Los datos de correlación confirmaron que los panelistas clasificaron

las muestras de acuerdo con los parámetros sensoriales principalmente relacionados con la percepción de astringencia como el contenido en PPAs.

Se podría argumentar que los resultados pueden estar sesgados por otros efectos relacionados con la metodología sensorial. Así, la sesión 1 (NA) se dirigió exclusivamente a encontrar diferencias en base a las sensaciones en boca (sabor y sensaciones táctiles), de manera que los participantes podrían inconscientemente haber hecho énfasis en estas sensaciones cuando llevaron a cabo la clasificación bajo las otras dos condiciones, descuidando así las sensaciones percibidas por vía retronasal y ortonasal. Otra posible limitación podría estar relacionada con el protocolo, ya que se les ha forzado a tomar un sorbo y expectorar lo que también podría hacer que los participantes se centren excesivamente en las sensaciones en boca. Este hecho ayudaría también a explicar el bajo número de descriptores aromáticos dados en la Tabla I-3.

Tabla I-3: Descriptores comunes citados (entre paréntesis se muestra el % de sujetos que citaron el término) por más del 15% del panel

| Vino | Sin percepción del aroma (NA) | Percepción retronasal (RA) | Percepción retro- y ortonasal (ROA) |
|--------|---|---|--|
| W_Mug | astringente (40), ácido (36.7), amargo (30) | astringente (53.3), ácido (30) | ácido (43.3), astringente (36.7), amargo (16.7) |
| W_Val | ácido (26.7), astringente (23.3), dulce (20), amargo (16.7) | fruta roja-negra (23.3), amargo (20), ácido (20) | ácido (30), amargo (30), fruta roja-negra (20), astringente (20) |
| W_Neo | astringente (56.7), amargo (33.3), ácido (23.3) | astringente (70), ácido (20), madera (20), amargo (16.7), fruta roja-negra (16.7) | ácido (33.3), astringente (26.7), amargo (23.3), dulce (16.7), fruta roja-negra (16.7) |
| W_Est | astringente (33.3), ácido (26.7), amargo (23.3), dulce (23.3) | astringente (30), ácido (26.7), amargo (16.7), dulce (16.7) | ácido (26.7), astringente (16.7), amargo (16.7), equilibrio (16.7) |
| R_Mug1 | astringente (46.7), ácido (40), amargo (20), dulce (16.7) | astringente (70), ácido (20), amargo (20), madera (16.7) | astringente (46.7), ácido (40), amargo (16.7) |
| R_Val | ácido (46.7), astringente (30), amargo (20) | astringente (36.7), ácido (20), amargo (20) | ácido (36.7), amargo (26.7), astringente (20) |
| R_Neo | astringente (53.3), ácido (30), amargo (20) | astringente (60), amargo (26.7), fruta roja-negra (20) | astringente (50), ácido (23.3) |
| R_Est | astringente (40), ácido (30), amargo (30), dulce (16.7) | astringente (30), amargo (23.3), madera (16.7) | astringente (23.3), amargo (20), ácido (20), madera (16.7) |
| R_Mon | astringente (33.3), ácido (23.3), amargo (20), dulce (16.7) | ácido (20), astringente (20), madera (16.7) | ácido (26.7), astringente (26.7), amargo (16.7), madera (16.7) |
| R_Gan | ácido (43.3), astringente (33.3), amargo (23.3) | astringente (40), amargo (26.7), ácido (20) | astringente (46.7), ácido (23.3), amargo (20) |
| R_Mug2 | astringente (66.7), ácido (30), amargo (26.7) | astringente (43.3), ácido (23.3), amargo (23.3) | astringente (50), ácido (33.3) |
| R_San | astringente (56.7), ácido (23.3), amargo (23.3) | astringente (80), amargo (30) | astringente (63.3), persistencia (16.7) |
| R_Car | amargo (40), astringente (33.3), ácido (26.7), dulce (26.7) | astringente (50), amargo (23.3) | astringente (43.3), madera (20), ácido (16.7) |
| R_One | astringente (46.7), ácido (40), amargo (26.7) | astringente (46.7), ácido (26.7), amargo (26.7) | ácido (30), amargo (30), astringente (26.7), fruta roja-negra (23.3) |

En tercer lugar, es posible que 15 mL de muestra fuera un volumen demasiado pequeño para que los panelistas pudieran proporcionar descriptores aromáticos concretos, por lo que sería factible que una repetición en la degustación de las muestras podría haber dado lugar a un aumento en el uso de descriptores aromáticos por parte de los participantes. Sin embargo, el hecho de que el estudio piloto, en el que sólo se estudió una condición, condujera a conclusiones similares, así como la concordancia entre los resultados de un estudio anterior [6] en el que no se utilizó el procedimiento forzado de probar y escupir, junto con el nulo efecto común observado en las muestras que comparten el aroma, hacen pensar que dichos posibles sesgos no están alterando el carácter general de los resultados. De manera, que los resultados sugieren que las propiedades sensoriales en boca están principalmente determinadas por la composición no volátil. Sin embargo, la inexistencia de correlación entre el dulzor y el amargor con las dimensiones de los espacio MDS obtenidos para las condiciones RA y ROA (Tabla I-4) indica que la percepción de aroma está ejerciendo un significativo, aunque no predominante, papel en la percepción sensorial en boca.

Tabla I-4: Correlaciones significativas ($P < 0.1$) entre variables sensoriales y químicas y las coordenadas MDS en dimensiones 1, 2 y 3 (ns: no significativo).

| Condición | Dimensión 1 | | | Dimensión 2 | | | Dimensión 3 | | |
|------------------------|-------------|-------|-------|-------------|----|-----|-------------|-------|-------|
| | NA | RA | ROA | NA | RA | ROA | NA | RA | ROA |
| PPAs ^a | <0.001 | 0.002 | 0.002 | ns | ns | ns | ns | 0.084 | ns |
| Az. Reductores | 0.099 | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | 0.063 |
| Acidez Volátil | ns | 0.091 | ns | 0.025 | ns | ns | ns | ns | ns |
| Ácido Láctico | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | 0.015 | ns |
| Acidez Total | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | 0.067 | ns |
| Dulzor sensorial | 0.073 | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Amargor sensorial | ns | ns | ns | ns | ns | ns | 0.039 | ns | ns |
| Astringencia sensorial | 0.01 | 0.002 | 0.001 | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

^a proantocianidinas precipitables con proteína

Otra forma de explorar más profundamente el efecto de la composición aromática consiste en observar la distancia Euclídea en el espacio MDS entre vino y muestra de vino reconstituido correspondiente para cada uno de los pares de W_Val/R_Val; W_Est/R_Est; W_Neo/R_Neo, puesto que contienen la misma matriz no volátil pero diferente composición aromática. En el caso de que el aroma ejerciese un papel nulo en las propiedades sensoriales en boca, la disimilitud percibida dentro de cada par debería permanecer constante entre las condiciones estudiadas. Estos datos de distancia se

resumen la Tabla I-5 y muestran diferentes tendencias. La pareja Est, la menos astringente y más pobre en PPAs, muestra un aumento constante de la disimilitud con el aumento de percepción de aroma, lo que sugiere que en este caso, el aroma está ejerciendo un papel eficaz en las propiedades sensoriales. En el par Neo, el más astringente y más rico en PPAs, no se observó un aumento de la disimilitud entre las muestras de NA a RA, pero sí que se observó un fuerte aumento de RA (o NA) a ROA, lo que sugiere que el aroma está ejerciendo un efecto pero sólo cuando tiene lugar la percepción orthonasal (ROA).

Tabla I-5: Distancias Euclídeas entre pares de vino originales (W) y reconstituidas (R) en el espacio MDS para las tres condiciones de evaluación (NA, RA y ROA).

| Par | NA | RA | ROA |
|---------------------|------|------|------|
| W_Val/R_Val | 2.77 | 3.79 | 1.21 |
| W_Neo/R_Neo | 1.92 | 1.51 | 2.24 |
| W_Est/R_Est | 0.70 | 1.49 | 2.13 |
| Distancia media | 1.80 | 2.26 | 1.86 |
| Desviación Estándar | 1.04 | 1.32 | 0.57 |

Este hecho es totalmente coherente con las descripciones dadas a W_Neo y R_Neo en la Tabla I-3, que revelan que la muestra W_Neo en condiciones ROA se percibe como mucho menos astringente que la muestra R_Neo. Por último, en el par Val la disimilitud aumenta de NA a RA, pero disminuye fuertemente de RA a ROA. En este caso, sin embargo, la menor diferencia con la condición ROA puede ser debida a una similitud relativa entre el aroma del vino original W_Val y el aroma utilizado para la reconstitución que proviene de una muestra con una fuerte similitud varietal, geográfica y tecnológica entre ambos vinos (W_Val y W_Mug).

La presencia de las interacciones específicas entre las moléculas no volátiles y volátiles se pueden observar claramente mediante la comparación de las descripciones sensoriales de las muestras (Tabla I-3). El comportamiento de la muestra R_One es destacable ya que es el único vino reconstituido descrito con atributos aromáticos (frutas rojas-negras) por casi un 25% del panel en la condición ROA. Esta muestra es considerada como bastante astringente en las condiciones NA y RA, pero no la ROA. Se puede razonar que los atributos aromáticos de fruta roja-negra aparecen como consecuencia de un patrón de liberación del aroma de la matriz R_One, y que además son la causa de una reducción en la astringencia percibida. Este resultado, por lo tanto, sugiere que una interacción químico-física específica matriz no volátil × aroma conduce a

un perfil volátil que induce una percepción del aroma frutal que a su vez provoca una interacción sensorial que hace que el vino sea menos astringente. Esta observación es consistente con estudios anteriores [6] donde se encontró que un aumento en la percepción de aroma afrutado condujo a una disminución en las sensaciones de astringencia y amargor de los vinos. El caso de la muestra W_Neo es similar, pero como se puede ver en la tabla, sugiere que se requiere la percepción orthonasal para una efectiva percepción sensorial.

4. CONCLUSIONES

Los resultados han demostrado claramente que, a nivel general, la percepción del aroma no es el principal responsable de la generación de las sensaciones en boca de los vinos tintos, lo que sin duda se debe principalmente a la percepción de astringencia y a los compuestos químicos que la causan, en particular las proantocianidinas precipitables con proteína (PPAs). Sin embargo, la percepción del aroma juega un papel importante en la percepción en boca y parece superar, reemplazar o modificar fuertemente el papel desempeñado por el dulzor y el amargor. El papel de la percepción del aroma, parece ser más importante siempre que la astringencia, polifenoles totales y PPAs son más reducidos. Además, los resultados obtenidos indican que cuando el matiz aromático de fruta roja-negra se percibe claramente, exclusivamente en las condiciones en las que la percepción orthonasal del aroma es permitida, se produce una fuerte reducción de la astringencia. Por otra parte, ese matiz de fruta roja-negra ha demostrado ser el resultado no de una composición aromática específica, sino más bien el resultado de un patrón de liberación del aroma como consecuencia de la interacción entre los compuestos aromáticos y la matriz no volátil. La existencia de todas esas interacciones químico-físicas y sensoriales indica que la comprensión de la percepción sensorial global del vino requiere no sólo el conocimiento sobre el contenido del vino en moléculas sensoriales activas, sino también un mayor conocimiento acerca de patrones diferenciales de liberación de sustancias odoríferas, y acerca de la relación entre el perfil aromático y la percepción del aroma, así como una mejor comprensión de las interacciones sensoriales entre aroma y astringencia.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Stevenson, R.J. (2009). An initial evaluation of the functions of human olfaction. *Chemical Senses*, 35, 3-20.
- [2] Welge-Lussen, A., Drago, J., Wolfensberger, M., & Hummel, T. (2005). Gustatory stimulation influences the processing of intranasal stimuli. *Brain Research*, 1038, 69-75.
- [3] Jones, P.R., Gawel, R., Francis, I.L., & Waters, E.J., (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19, 596-607.
- [4] Robinson, A.L., Ebeler, S.E., Heymann, H., Boss, P.K., Solomon, P.S., & Trengove, R.D. (2009). Interactions between wine volatile compounds and grape and wine matrix components influence aroma compound headspace partitioning. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10313-10322.
- [5] Bajec, M.R., & Pickering, G.J. (2008). Astringency: Mechanisms and perception. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48, 858-875.
- [6] Sáenz-Navajas, M.P., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry*, 121, 1139-1149.
- [7] Sáenz-Navajas, M-P., Campo, E., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5574-5585.
- [8] Chollet, S., Lelièvre, M., Abdi, H., & Valentin, D. (2011). Sort and beer: Everything you wanted to know about the sorting task but did not dare to ask. *Food Quality and Preference*, 22, 507-520.
- [9] Patris, B., Gufoni, V., Chollet, S., & Valentin, D. (2007). Impact of Training on Strategies to Realize a Beer Sorting Task: Behavioral and Verbal Assessments, Vietnam National University-Ho Chi Minh City Publishing House, Ho Chi Minh (Vietnam).
- [10] Valentin, D., Chollet, S., Lelièvre, M., & Abdi, H. (2012). Quick and dirty but still pretty good: a review of new descriptive methods in food science. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1563-1578.
- [11] Kruskal, J.B., & Wish, M. (1978). *Multidimensional Scaling*, Sage Publications, Beverly Hills and London.
- [12] Schiffmann, S.S., Reynolds, M.L., & Young, F.W. (1981). *Introduction to Multidimensional Scaling: Theory, Methods and Applications*, New York, Academic Press.
- [13] Faye, P., Bremaud, D., Daubin, M.D., Courcoux, P., Giboreau, A., & Nicod, H. (2004). Perceptive free sorting and verbalization tasks with naive subjects: An alternative to descriptive mappings. *Food Quality and Preference*, 15, 781-791.
- [14] Saint-Eve, A., Kora, E.P., Martin, N. (2004). Impact of the olfactory quality and chemical complexity of the flavouring agent on the texture of low fat stirred yogurts assessed by three different sensory methodologies. *Food Quality and Preference*, 15, 655-668.

- [15] Cartier, R., Rytz, A., Lecomte, A., Poblete, F., Krystlik, J., Belin, E., & Martin, N. (2006). Sorting procedure as an alternative to quantitative descriptive analysis to obtain a product sensory map. *Food Quality and Preference*, 17, 562-571.
- [16] Falahee, M., & MacRae, A.W. (1997). Perceptual variation among drinking waters: The reliability of sorting and ranking data for multidimensional scaling. *Food Quality and Preference*, 8, 389-394.
- [17] Falahee, M., & MacRae, A.W. (1995). Consumer appraisal of drinking water: Multidimensional scaling analysis. *Food Quality and Preference*, 6, 327-332.
- [18] Campo, E., Cacho, J., & Ferreira, V. (2008). The chemical characterization of the aroma of dessert and sparkling white wines (Pedro Ximénez, Fino, Sauternes, and Cava) by gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 2477-2484.
- [19] Parr, W.V., Valentin, D., Green, J.A., & Dacremont, C. (2010). Evaluation of French and New Zealand Sauvignon wines by experienced French wine assessors. *Food Quality and Preference*, 21, 56-64.
- [20] AOAC (2002). Method 993.05: L-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice. *Official Methods of Analysis*.
- [21] Ribéreau-Gayon, P. (1970). Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique*, 52, 627-631.
- [22] Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., Rozes, N., Arola, L., & Zamora, F. (2004). New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 742-746.
- [23] ISO NORM 3591 (1977). International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- [24] Colonna, A.E., Adams, D.O., & Noble, A.C. (2004). Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 26-31.
- [25] Lebart, L., Morineau, A., & Piron, M. (1995) *Statistique exploratoire multidimensionnelle*, Dunod, Paris, pp. 177-184.
- [26] Cox, T.F., & Cox, M.A.A. (2001). *Multidimensional Scaling*, Chapman and Hall.
- [27] Sáenz-Navajas, M.P., Tao, Y.S., Dizy, M., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12407-12416.
- [28] Bult, J.h.F., de Wijk, R.A., & Hummel, T. (2007). Investigations on multimodal sensory integration: Texture, taste, and ortho- and retronasal olfactory stimuli in concert. *Neuroscience Letters*, 411, 6-10.

SECCIÓN II. CAPÍTULO II

Reflexiones sobre la base química de la astringencia de los vinos tintos españoles

1. INTRODUCCION

El consumo de vino tiene principalmente un objetivo hedónico, lo que implica que las propiedades organolépticas del vino juegan un papel destacado en la percepción del mismo y por lo tanto de su calidad del vino. Este hecho aumenta el interés en encontrar las moléculas químicas principales responsables de las atractivas propiedades sensoriales de los vinos [1-5].

La importancia de moléculas volátiles y no volátiles en las propiedades sensoriales del vino ha sido demostrada sobre todo en trabajos acerca de las interacciones sensoriales. Estos estudios han demostrado que las propiedades sensoriales del vino son el resultado de interacciones perceptivas entre las modalidades sensoriales y/o las interacciones entre las moléculas del vino, que pueden afectar a la volatilidad odorífera, a la liberación del flavor, y la a intensidad global del flavor percibido y por lo tanto la percepción de calidad del vino [6-8].

En la actualidad, existen una gran cantidad de estudios publicados que tratan sobre los compuestos aromáticos y su implicación en las percepciones sensoriales del vino, demostrando que el trabajo en este campo está bastante avanzado [2, 9, 10]. También hay una amplia gama de investigaciones realizadas con el objetivo de buscar compuestos no volátiles en el vino con propiedades sensoriales [1, 11, 12]. Sin embargo, la contribución real de estas moléculas no volátiles a las propiedades sensoriales globales de los vinos está aún lejos de ser clara.

Entre las moléculas no volátiles, se ha descrito en varias ocasiones que los compuestos fenólicos con alto peso molecular juegan un importante papel en la calidad general del vino tinto, especialmente aquellos que presentan astringencia. Esto podría explicarse por el hecho de que este atributo percibido en boca se ha relacionado con la percepción de calidad de profesionales del mundo del vino [13, 14, 15, 16].

La mayoría de los trabajos que tratan sobre la composición química cuantitativa señalan que las proantocianidinas (flavanoles polimerizados) podrían ser los principales contribuyentes a la astringencia percibida en el vino debido a su capacidad para precipitar proteínas salivales [17, 18, 19, 20, 21, 22]. Sin embargo, hay investigaciones

[23-25] que muestran que ni el contenido de proantocianidinas analizado ni los métodos químicos desarrollados para la determinación de la astringencia por precipitación de proteínas [20, 21] son suficientes para explicar la diferente astringencia percibida en los vinos. Este hecho se ha atribuido a la capacidad de los compuestos más pequeños para formar complejos con proteínas de la saliva, pero no precipitar [19, 26] lo que conduce a una menor lubricación y una fricción causada por las partículas, ya sea como resultado de la precipitación de la proteína salival o de su floculación. En este contexto, varios estudios apoyan la hipótesis de que la astringencia se presenta cuando existe una ruptura de la película lubricante de la saliva que recubre la cavidad oral [27, 28], en lugar de ser el resultado de una mera precipitación de proteínas salivales. Estos trabajos están de acuerdo con investigaciones recientes que demuestran la posible implicación de moléculas no volátiles de bajo peso molecular en la astringencia de los vinos tintos [24, 25, 29, 30].

Siendo conscientes de la importancia de adquirir conocimientos sobre el impacto real de las moléculas no volátiles en las propiedades sensoriales en boca generados en los vinos y con el fin de proporcionar una posterior comprensión acerca de la percepción sensorial del vino, el principal objetivo del presente Capítulo es determinar la influencia de ciertos compuestos no volátiles en la percepción de las diferentes sensaciones generadas en boca, especialmente en la astringencia, por medio de datos cuantitativos. Más específicamente, los objetivos concretos de este trabajo son, en primer lugar, estudiar correlaciones entre las propiedades sensoriales en boca y la composición no volátil, para luego evaluar el verdadero impacto sensorial de los compuestos no volátiles en muestras de vino tinto. Para conseguir tales objetivos, un conjunto de 34 vinos tintos españoles envejecidos se sometieron a un análisis sensorial descriptivo mediante un panel entrenado. Además, se identificaron y cuantificaron moléculas sensorialmente activas mediante métodos HPLC-DAD-MS y UV-Vis y también se determinaron parámetros enológicos convencionales en el mismo conjunto de muestras. Se investigó la posible implicación de las moléculas no volátiles analizadas en las propiedades sensoriales en boca por medio de herramientas estadísticas y posteriormente se confirmó sensorialmente su efecto con ensayos de adición o fortificado en muestras de vino reales.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Vinos

Se evaluaron treinta y cuatro vinos tintos españoles con crianza en barrica de 13 Denominaciones de Origen españolas diferentes. La lista detallada de las muestras, incluyendo información general y los datos químicos básicos obtenidos siguiendo los procedimientos normalizados de trabajo, se muestra en la Tabla II-1.

Todos los vinos habían sido envejecidos en barricas de roble y su precio osciló entre 6 y 14 euros/botella en el mercado español. Dichos vinos fueron seleccionados según los registros de ventas para obtener una muestra representativa aleatoria del segmento medio del mercado español de vino tinto.

2.2. Análisis sensorial descriptivo

Un total de 35 estudiantes y miembros del personal de la Universidad de La Rioja fueron reclutados en base a su interés y su disponibilidad durante 20 semanas (una sesión de 60 minutos por semana). No se les gratificó por su participación.

Los miembros del grupo asistieron a 16 sesiones de 1 hora durante un período de cuatro meses para el entrenamiento en el análisis sensorial descriptivo. Durante éste los panelistas trabajaron en subgrupos y fueron entrenados en propiedades en boca (dulzor, acidez, amargor, astringencia, intensidad global y persistencia). Durante el entrenamiento, se presentaron diferentes referencias representativas de sabor y astringencia. Así, se suministró al panel disoluciones con diferentes concentraciones de azúcar de mesa ($0 - 12 \text{ g L}^{-1}$) para ayudar al reconocimiento del dulzor, ácido tartárico ($0 - 1.5 \text{ g L}^{-1}$) para la acidez, sulfato de quinina ($0 - 10 \text{ mg L}^{-1}$) para el amargor, y de sulfato de aluminio y potasio ($0 - 5 \text{ g L}^{-1}$) para la astringencia, con el fin de ayudar al reconocimiento y discriminación entre las diferentes sensaciones orales.

Para la selección de los panelistas, se proporcionó a los participantes seis disoluciones que contenían los cuatro estímulos (dulzor, acidez, amargor y astringencia) en orden aleatorio (dos de ellos fueron presentados por duplicado) y se les pidió que identificaran las sensaciones. Sólo los panelistas que identificaron correctamente todos los atributos se mantuvieron durante el estudio. De acuerdo con este criterio y por razones de asistencia, los datos sensoriales proporcionados por 28 panelistas (9 hombres y 19 mujeres de 21 a 62 años, edad media 29) fueron considerados en el estudio.

Los 28 panelistas seleccionados y entrenados asistieron a cuatro sesiones para la caracterización de las 34 muestras de vino objeto del estudio mediante el protocolo que se muestra en el Anexo V. En cada sesión, se colocó una muestra por duplicado para controlar la reproducibilidad del panel. El número de muestras que se presentaron en cada sesión osciló entre nueve y diez. Se sirvieron diez mililitros de vino en copas negras de tipo tulipa ISO [31] etiquetadas con códigos de tres cifras y cubiertas por placas Petri de plástico. Las muestras se colocaron para cada panelista en un orden diferente de acuerdo con una disposición al azar. A los panelistas se les pidió evaluar el dulzor, la acidez, el amargor y la astringencia en una escala de 10 puntos (0 = "ausencia", 1 = "muy bajo" y 9 = "muy alto"). La intensidad global en boca y persistencia global se evaluaron en una escala de 9 puntos (1 = "muy bajo" y 9 = "muy alto") ya que para estos últimos conceptos el 0 no tiene sentido. Los panelistas evaluaron las muestras usando el protocolo de enjuague entre muestra y muestra descrito en el Capítulo I de esta misma Sección (ver Anexo III), tal y como se detalla en la bibliografía [32].

Todos los vinos se sirvieron a temperatura ambiente y se evaluaron en cabinas individuales. Los panelistas no recibieron información sobre la naturaleza de las muestras a evaluar.

2.3. Análisis químicos

2.3.1. Reactivos.

Todos los productos químicos utilizados fueron de calidad analítica. Todos los disolventes cromatográficos fueron de calidad HPLC. El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia). El gel TSK Toyopearl HW-50F utilizado para el fraccionamiento GPC (cromatografía de permeación de gel) fue suministrado por Tosohaas (Montgomery-ville, PA, EE.UU.), y metanol, ácido fórmico, etanol, acetonitrilo y ácido sulfúrico por Scharlab. El sulfato de quinina dihidrato (98%) se obtuvo de Alfa AESOR. El sulfato de aluminio y potasio y ácido tánico se adquirieron en Panreac. La ovoalbúmina (V-grade), ácido L-tartárico, catequina, epicatequina, ácido *t*-aconítico, ácido *c*-aconítico, miricetina, kaempferol, vainillina, éster etílico del ácido protocatéquico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido cafeico, y quercetina fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. La quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-galactósido, quercetina-3-*O*-glucurónido, kaempferol-3-*O*-glucósido, isorhamnetina-3-*O*-glucósido, miricetina-3-*O*-glucósido, miricetina, kaempferol, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, procianidinas B1 y B2, ácidos ferúlico y *p*-cumárico fueron

Tabla II - 1: Características de los vinos incluyendo origen, añada, variedad, tiempo de envejecimiento en barrica, pH, acidez volátil (AV), acidez total (ATT), azúcares reductores (AR), ácido láctico, alcohol, índice de polifenoles, totales (IPT), intensidad de color (IC) y tonalidad (T) (1 de 3)

| Vino | Denominación de Origen | Año | Variedad | Meses barrica | pH | AV ^a (g L ⁻¹) | ATT ^b (g L ⁻¹) | AR (g L ⁻¹) | Ácido láctico (g L ⁻¹) | Alcohol (v/v) | IPT ^c (u.a.) | IC ^c (u.a.) | T ^d |
|---|--|--------------|--|---------------|--------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|---------------|-------------------------|------------------------|----------------|
| Martue Syrah | Tierra de Castilla | 2006 | Tempranillo, Cabernet Sauvignon | 12 | 3.63 | 0.58 | 5.46 | 1.27 | 1.23 | 13.9 | 52.3 | 9.9 | 0.80 |
| Cumal | D.O.Calatayud | 2006 | Garnacha | 13 | 3.39 | 0.50 | 6.66 | 3.39 | 0.81 | 14.8 | 62.7 | 10.8 | 0.88 |
| Ilurce Vendimia Seleccionada | D.O.Ribera Del Duero | 2005 | Tempranillo (90%), Cabernet (5%), Merlot (5%) | 16 | 3.60 | 0.55 | 5.53 | 1.71 | 1.54 | 13.7 | 59.6 | 10.6 | 0.86 |
| Viña Sastre | D.O.Ribera Del Duero | 2007 | Tempranillo (80%), Cabernet Sauvignon (10%), Merlot (10%) | 5 | 3.63 | 0.48 | 5.42 | 1.92 | 1.98 | 13.4 | 50.2 | 9.6 | 1.00 |
| Santa Cruz de Sierra Cantabria, Cepas Viejas | D.O.Roria D.O.Utiel-Requena | 2007 2006 | Garnacha Bobal (50%), otras (Garnacha, Syrah, Merlot, Cabernet, Tempranillo) (50%) | 3 8 | 3.42 3.63 | 0.31 0.43 | 6.14 5.33 | 3.10 1.92 | 0.46 0.69 | 14.0 15.1 | 55.0 66.2 | 10.2 11.8 | 0.81 0.84 |
| Mestizaje Bobal | D.O.Rioja | 2004 | Tempranillo | 18 | 3.54 | 0.60 | 5.51 | 1.72 | 1.32 | 13.0 | 52.0 | 9.3 | 1.00 |
| Coto de Hayas | D.O.Navarra | 2005 | Garnacha | 12 | 3.39 | 0.53 | 5.95 | 1.88 | 0.46 | 16.2 | 66.6 | 10.4 | 0.79 |
| Pago de los Capellanes | D.O.Ribera Del Duero | 2005 | Tinta del Pais | 14 | 3.67 | 0.51 | 5.10 | 1.89 | 1.18 | 14.9 | 67.4 | 11.8 | 0.71 |
| Arzuaga | D.O.Ca.Rioja | 2005 | Garnacha (60%), Tempranillo (40%) | 12 | 3.49 | 0.58 | 6.06 | 2.11 | 0.69 | 14.0 | 56.5 | 10.5 | 0.86 |
| Cruz de Piedra Rivola, Abadía Retuerta | Tierra de Castilla Tierra de Castilla | 2005 2006 | Prieto Picudo Syrah | 15 12 | 3.41 3.82 | 0.50 0.67 | 5.54 6.84 | 1.52 3.25 | 0.78 2.70 | 14.4 15.7 | 60.1 75.3 | 11.0 17.2 | 0.88 0.78 |

Tabla II-1: cont. (2 de 3)

| Vino | Denominación de Origen | Año | Variedad | Meses barrica | pH | AV ^a (g L ⁻¹) | ATT ^b (g L ⁻¹) | AR (g L ⁻¹) | Acido láctico (g L ⁻¹) | Alcohol (v/v) | IP ^T (u.a.) | IC ^c (u.a.) | T |
|----------------------|------------------------|------|--|---------------|------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|---------------|------------------------|------------------------|------|
| Badacel | D.O. Ca. Priorat | 2005 | Syrah | 10 | 3.32 | 0.47 | 6.06 | 1.66 | 0.52 | 14.2 | 53.5 | 10.1 | 0.77 |
| Castaño Cepas Viejas | D.O. Yecla | 2004 | Monastrell, Cabernet Sauvignon | 14 | 3.72 | 0.69 | 5.14 | 1.76 | 1.40 | 15.0 | 66.7 | 11.4 | 1.00 |
| Remelluri | D.O. Ca. Rioja | 2003 | Tempranillo, Garnacha, Graciano | 22 | 3.58 | 0.48 | 4.84 | 1.96 | 0.99 | 13.8 | 59.1 | 9.0 | 0.87 |
| Puerto salinas | D.O. Alicante | 2003 | Garnacha, Cabernet Sauvignon | 8 | 3.78 | 0.88 | 5.74 | 3.32 | 1.28 | 15.6 | 75.6 | 11.2 | 0.98 |
| Luberrri Monje | D.O. Ca. Rioja | 2003 | Tempranillo (90%), otras (10%) | 16 | 3.54 | 0.51 | 5.33 | 2.64 | 1.03 | 14.2 | 56.0 | 9.6 | 0.80 |
| Gran Caus | D.O. Penedés | 2000 | Cabernet Sauvignon (27%), Cabernet Franc (37%), Merlot (36%) | 12 | 3.39 | 0.58 | 5.86 | 1.64 | 0.64 | 14.0 | 51.2 | 10.5 | 0.88 |
| Gran Coronas Torres | D.O. Penedés | 2004 | Cabernet Sauvignon (85%), Tempranillo (20%) | 12 | 3.58 | 0.54 | 5.27 | 2.69 | 1.20 | 14.2 | 61.6 | 10.6 | 0.93 |
| Piedra Estancia | D.O. Toro | 2002 | Tinta de Toro (95%), Garnacha (5%) | 6 | 3.38 | 0.48 | 5.85 | 1.86 | 1.11 | 14.2 | 55.4 | 10.3 | 0.84 |
| AN/2 | Baleares | 2005 | Callet (65%), Manto negro-Fogones (20%), Syrah (15%) | 12 | 3.66 | 0.53 | 4.59 | 1.66 | 0.91 | 13.8 | 47.2 | 6.3 | 0.98 |
| La Montesa | D.O. Ca. Rioja | 2005 | Garnacha (55%), Tempranillo (40%), Mazuelo (5%) | 12 | 3.57 | 0.49 | 5.36 | 1.52 | 0.99 | 14.2 | 51.6 | 9.3 | 0.80 |
| Barcales | D.O. Carriena | 2004 | Garnacha (80%), Cabernet Sauvignon (20%) | 14 | 3.40 | 0.51 | 6.29 | 2.74 | 0.72 | 14.5 | 74.3 | 11.5 | 1.00 |
| Hacienda Mollada | D.O. Carriena | 2006 | Garnacha | 10 | 3.58 | 0.59 | 5.23 | 1.92 | 0.93 | 14.3 | 52.7 | 10.9 | 0.73 |

Tabla II-1: cont. (3 de 3)

| Vino | Denominación de Origen | Año | Varietalidad | Meses barrica | pH | AV ^a (g L ⁻¹) | ATT ^b (g L ⁻¹) | AR (g L ⁻¹) | Ácido láctico (g L ⁻¹) | Alcohol (v/v) | IPT ^c (u.a.) | IC ^c (u.a.) | T |
|---------------------------------------|---------------------------|------|--|---------------|------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|------------------------------------|---------------|-------------------------|------------------------|------|
| Summa Varietalis | D.O. Dominio de Valdepusa | 2003 | Syrah, Cabernet Sauvignon, Petit Verdot | 12 | 3.61 | 0.64 | 4.94 | 2.16 | 0.69 | 14.0 | 75.4 | 11.7 | 1.00 |
| Dehesa del Carrizal | D.O. Dehesa del Carrizal | 2002 | Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot | 8-10 | 3.71 | 0.50 | 4.88 | 1.05 | 1.15 | 13.3 | 50.6 | 8.8 | 0.87 |
| Enate | D.O. Somontano | 2002 | Cabernet Sauvignon | 12 | 3.53 | 0.39 | 6.24 | 1.51 | 0.91 | 14.1 | 64.7 | 11.6 | 0.97 |
| Atrium | D.O. Penedés | 2002 | Merlot | 6 | 3.46 | 0.48 | 5.37 | 2.19 | 0.85 | 12.9 | 43.8 | 6.6 | 0.98 |
| Muret | D.O. Ribera del Jiloca | 2004 | Garnacha (80%), Tempranillo (20%) | 5 | 3.26 | 0.40 | 6.84 | 4.54 | 0.33 | 15.7 | 66.2 | 9.5 | 0.79 |
| Guelbenzu EVO | D.O. Ribera del Queiles | 2004 | Cabernet Sauvignon (55%), Tempranillo (25%), Merlot (25%) | 12 | 3.56 | 0.53 | 5.80 | 1.35 | 1.31 | 13.6 | 59.0 | 11.0 | 0.92 |
| Care | D.O. Cariñena | 2005 | Merlot, Syraz | 12 | 3.50 | 0.47 | 5.91 | 2.40 | 0.81 | 14.0 | 69.8 | 11.2 | 0.99 |
| Martinet Bru | D.O. Ca. Priorat | 2004 | Garnacha (30%), Cabernet Sauvignon (30%), Merlot (30%), Syrah (10%) | 17 | 3.41 | 0.60 | 5.46 | 0.76 | 0.64 | 14.4 | 48.2 | 10.8 | 0.87 |
| Dominio de Tares, Cepas Viejas | D.O. Bierzo | 2005 | Mencia | 9 | 3.53 | 0.56 | 4.82 | 1.50 | 1.05 | 13.7 | 57.1 | 11.4 | 0.93 |
| Solanes | D.O. Ca. Priorat | 2004 | Cariñena (40%), Garnacha (30%), Cabernet Sauvignon (15%), Merlot (10%), Syrah (5%) | 14 | 3.44 | 0.87 | 5.56 | 1.60 | 0.67 | 14.4 | 55.6 | 9.4 | 0.78 |

^a: expresado en g L⁻¹ de ácido acético.

^b: expresado en g L⁻¹ de ácido tartárico.

^c: expresado en unidades de absorbancia (u.a.).

suministrados de Extrasynthèse. El ácido vanílico y ácido trifluoroacético (TFA) fueron adquiridos en Fluka.

2.3.2. Análisis de la composición no volátil por GPC-HPLC-DAD-MS.

Este análisis se llevó a cabo utilizando el método descrito en la bibliografía [25]. De acuerdo con el método, 2 mL de vino se fraccionaron por cromatografía preparativa: cromatografía de permeación en gel (GPC). Se recogieron dos fracciones y se llevaron a sequedad mediante vacío. Las fracciones 1 y 2 se redisolviéron en 2 mL de ácido fórmico/agua (5:95, v/v) y 7.5 mL de metanol, respectivamente. La fracción F1 fue posteriormente analizada por HPLC-DAD y HPLC-MS. El análisis HPLC-DAD se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos modular 1100 de Agilent (Waldbronn, Alemania) equipado con un inyector G1313A, una bomba cuaternaria G1311A, un desgasificador en línea G1379A, un horno G1316A, un detector de red de fotodiodos G1315B y el software Agilent ChemStation. La columna que se utilizó fue Kromasil de fase reversa 100-C18 (5 μm de empaquetamiento, 250 mm de longitud x 46 mm de diámetro interno), protegida con una precolumna del mismo material (Teknokroma, Barcelona, España). Los compuestos se eluyeron bajo las siguientes condiciones: caudal de 1 mL min^{-1} ; columna termostaticada a 40 °C; eluyente A: ácido fórmico/agua (5:95, v/v); eluyente B: acetonitrilo (100%); gradientes: isocrático 0% B durante 2 minutos, de 0 a 8% de B en 3 minutos, de 8 a 20% de B en 55 minutos, de 20% a 30% de B en 10 minutos, de 30% a 50% de B en 1 minuto, desde 50% a 100% de B en 2 min, seguido de un lavado y reacondicionamiento de la columna. Treinta microlitros de la fracción F1 (en ácido fórmico/agua, 5:95, v/v) se inyectaron directamente en el sistema cromatográfico de HPLC. Se registraron los espectros UV-Vis de 210 a 700 nm, con un ancho de banda de 2.0 nm. La cuantificación se realizó por medidas de área de pico a 365 nm para los flavonoles, 313 nm para los ácidos hidroxicinámicos, 280 nm para los flavanoles y ácidos fenólicos, y 220 nm para los ácidos aconíticos. La identificación de compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención, los espectros UV-Vis y de masas de los patrones. Su cuantificación se realizó por triplicado usando un calibrado con patrones comerciales para cada compuesto. La cuantificación de compuestos no comerciales se realizó con las curvas de calibración y el factor de respuesta de un compuesto estructuralmente cercano (ácido *p*-cumárico para el ácido *t*-cutárico). Las curvas de calibración se obtuvieron mediante la inyección de diferentes concentraciones de los estándares. El rango lineal de calibración ($R^2 > 0.994$ en todos los casos) fue de 0.01 (límite de detección) a 1 mg L^{-1} para los compuestos menos

concentrados y de 1.0 a 100 mg L⁻¹ para los compuestos más concentrados. Los datos cuantitativos de los compuestos identificados se obtuvieron por interpolación de las áreas en las curvas de calibrado construidas a partir del análisis de compuestos patrones de referencia.

El análisis por espectroscopía de masas se llevó a cabo mediante acoplamiento del cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 descrito anteriormente a un espectrómetro de masas Hewlett-Packard 5989 con analizador de doble cuadrupolo equipado con una fuente de electrospray o ESI (HP 59987A) y controlado por el software de MS Agilent 1200. La separación cromatográfica se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Para asegurar un flujo de 19 µl min⁻¹ en la interfaz ESI, el efluente del cromatógrafo de líquidos se dividió por medio de una válvula de split sin volumen muerto. Se observó que este flujo era el óptimo en estas condiciones. Se utilizó nitrógeno como gas nebulizador a una presión de entrada de 80 psi y una temperatura de 225 °C. Todos los espectros de masas se adquirieron en el modo de perfil de ionización positivo de 150 a 700 *m/z*.

2.3.3. Determinación del contenido total de proantocianidinas (TPAs).

La determinación de las proantocianidinas totales se llevó a cabo mediante el ensayo de la vainillina que se realizó de acuerdo con el método descrito en la bibliografía [33] en la segunda fracción obtenida a partir de la GPC. La fracción F2 se disolvió en 7.5 ml de metanol (*muestra*). El volumen total de reacción se fijó en 6 mL, se mezclaron en un vial 1 mL de la *muestra*, 2.5 mL de *reactivo A* (1% m/v de vainillina en metanol), y 2.5 mL de *reactivo B* (10% v/v de ácido sulfúrico/ metanol). La reacción tuvo lugar a 30 °C durante 15 minutos (tiempo para alcanzar el valor máximo de absorbancia a 500 nm). La absorbancia de los aductos coloreados formados entre vainillina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído) y proantocianidinas (flavanoles con un enlace sencillo en la posición 2,3 y grupos hidroxilo en meta libres en el anillo B) fue medida a 500 nm. Paralelamente, se realizó un blanco para cada muestra para eliminar la absorbancia de los pigmentos residuales presentes en la F2. El blanco se preparó de la misma manera descrita para la muestra, pero añadiendo metanol en lugar de vainillina. La cuantificación de proantocianidinas se llevó a cabo mediante una curva de calibración preparada con diferentes concentraciones de catequina pura y por interpolación de las unidades de absorbancia en la curva de calibración. Las muestras se analizaron por triplicado.

2.3.4. Análisis de parámetros convencionales en vinos.

Los parámetros enológicos convencionales de los vinos (contenido de etanol, pH, azúcares reductores, acidez total y volátil) se determinaron por espectrometría de infrarrojos con transformada de Fourier (IRFT) con un WineScan™ FT 120 (FOSS®), que se calibró con muestras de vino analizadas de acuerdo con las prácticas oficiales de la OIV. Los ácidos *L*-málico y láctico se determinaron por métodos enzimáticos conforme a los métodos oficiales de análisis de la AOAC [34]. El Índice de Polifenoles Totales (IPT) se estimó como la absorbancia a 280 nm, la Intensidad de Color (IC) se calculó como la suma de la absorbancia a 420, 520 y 620 nm y el matiz o tonalidad (T) expresó como la relación de A420/A520 (absorbancia a 420 nm/absorbancia a 520 nm) [35].

2.3.5. Análisis de proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs).

Las PPAs precipitables con proteínas (PPAs) se estimaron usando ovoalbúmina como agente de precipitación y disoluciones con distinta concentración de ácido tánico como curva de calibración de acuerdo con un método descrito previamente [21]. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ \text{C}$) y por triplicado.

2.4. Pruebas triangulares con muestras fortificadas.

Con el fin de comprobar que los compuestos no volátiles (sugeridos por los modelos estadísticos construidos en la primera parte del trabajo) podrían desempeñar funciones relevantes en las sensaciones orales del vino, se llevaron a cabo diferentes pruebas triangulares. Un panel sensorial entrenado compuesto por 18 sujetos (doce hombres y seis mujeres, con edades entre 23 y 46 años de edad) realizaron 24 pruebas triangulares de diferentes muestras por duplicado. El protocolo utilizado para las pruebas triangulares se muestra en el Anexo VI. Las muestras enfrentadas en las pruebas triangulares se fortificaron con el compuesto objeto de estudio tanto en agua como en un vino tinto sensorialmente neutro. El vino neutro utilizado para los experimentos de fortificación presentaba baja intensidad aromática y sus propiedades en boca no eran destacadas, siendo su contenido en polifenoles y la percepción de astringencia especialmente bajos. La Tabla II-2 muestra la composición química del vino neutro.

En las pruebas triangulares, se presentaron tres copas a cada juez y se les pidió que seleccionaran la muestra que era sensorialmente diferente. El número de respuestas correctas se comparó con valores tabulados para evaluar la presencia de diferencias sensoriales significativas entre las muestras originales y fortificadas. En el caso en el que

se detectaron diferencias significativas, se pidió a los panelistas que anotaran libremente el descriptor que inducía la diferencia sensorial.

En todas las pruebas, las muestras (10 mL, 20 °C) se presentaron en orden aleatorio en copas de tulipa negras codificadas con un número de tres cifras y cubiertas con una placa Petri. Todos los panelistas habían participado regularmente en pruebas sensoriales al menos durante un año en sesiones de entrenamiento semanales dedicadas a reconocer y distinguir las diferentes sensaciones orales (sabor y sensación en la boca) y en experimentos sensoriales analíticos.

Tabla II-2: Parámetros químicos del vino neutro usado para la adición de diferentes compuestos en las pruebas triangulares.

| parámetros | |
|---|-------|
| pH | 3.53 |
| acidez total ^a | 5.54 |
| acidez volátil ^b | 0.44 |
| ácido málico ^c | 0.0 |
| ácido láctico ^c | 1.4 |
| grado alcohólico (v/v) | 12.6 |
| azúcares reductores ^c | 1.3 |
| índice de polifenoles totales (IPT)(u.a.) | 39.3 |
| TPas ^d | 0.084 |
| PPas ^e | 0.1 |

^a: expresado en g L⁻¹ de ácido tartárico.

^b: expresado en g L⁻¹ de ácido acético.

^c: expresado en g L⁻¹

^d: proantocianidinas totales, expresado en g L⁻¹.

^e: proantocianidinas precipitables con proteína, expresado en unidades de absorbancia (u.a.).

2.5. Análisis estadísticos.

Se llevó a cabo un ANOVA de tres factores para cada uno de los atributos en boca (sabores, astringencia, intensidad global y persistencia) incluyendo los vinos (W), jueces (J) y réplicas (R) como factores fijos y todas las interacciones de primer orden para confirmar la consistencia del panel con los 28 panelistas seleccionados durante las sesiones de entrenamiento. Para los atributos que mostraron un efecto de interacción significativo vino-juez (W x J) ($P \geq 0.05$), se realizó un PCA para evaluar el desacuerdo entre los jueces. Para ello, se empleó una tabla con los vinos en filas y los jueces (media de las puntuaciones de dos repeticiones) en columnas.

Se efectuó un ANOVA de un factor con las medidas repetidas con los atributos evaluados en boca: dulzor, acidez, amargor, astringencia, intensidad global y

persistencia con el fin de evaluar la presencia/ausencia de diferencias significativas entre los vinos para estos atributos.

Se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson y regresiones lineales simples entre los parámetros sensoriales y/o químicos para evaluar correlaciones significativas.

Los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa SPSS (Inc., Chicago, IL) y Software SPAD (versión 5.5, CISIA-CESRESTA, Montreuil, Francia).

Se utilizó una regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR) por medio del algoritmo PLS1 para calcular un modelo predictivo para la astringencia a partir de la composición química por medio del software Unscrambler (versión 9.7 CAMO, Trondheim, Noruega). En primer lugar, se construyó una matriz con los datos químicos cuantitativos (variables X) y la astringencia (variable Y : valor medio dado por todos los panelistas) en columnas y vinos en filas y posteriormente centrada y escalada para obtener datos normalizados. La homocedasticidad y linealidad fueron también confirmadas para evitar sobreestimar la bondad del ajuste. La colinealidad entre las variables X también fue comprobada, para después poder descartar variables con una alta colinealidad que no aportarían nada al modelo. La estrategia seguida para la predicción de la astringencia mediante la composición química comenzó con la construcción de un primer modelo inicial con todas las variables X (medidas químicas de la composición no volátil). Después de esto, se comprobó la existencia de valores atípicos, las muestras con una clara desviación del modelo fueron eliminadas y descartadas del proceso de calibración y se calculó de nuevo el modelo. El número de las variables X en el modelo se redujo después siguiendo un proceso iterativo, buscando el modelo más sencillo con la mejor capacidad de predicción. Se llevó a cabo una validación cruzada completa para estimar la capacidad de predicción de los modelos para una nueva serie de muestras. En la validación cruzada, una de las muestras se mantiene fuera de la calibración, el modelo se vuelve a calcular y se utiliza para la predicción de la astringencia de la muestra que falta. Este paso se repite hasta que todas las muestras se han apartado una vez y posteriormente se calcula la varianza residual de la validación a partir de los residuos de la predicción.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis sensorial descriptivo por el panel entrenado

El ANOVA de tres factores calculado para evaluar la consistencia del panel mostró que el efecto juez fue significativo para todos los atributos. Este efecto es común en el análisis sensorial y se puede explicar por las diferencias entre individuos. Sin embargo, ningún efecto réplica fue significativo, indicando una evaluación consistente de atributos y reflejando la reproducibilidad del panel. La interacción del vino-juez ($W \times J$) fue significativa sólo para el amargor. Un PCA realizado sobre este atributo (jueces en columnas y vinos en filas) reveló que los jueces se proyectan dispersos en los 360° del plano bidimensional del PCA por todo el gráfico generado, lo que indica que existen diferencias en la interpretación en el término amargor y que los jueces pueden necesitar más entrenamiento con respecto a este atributo. Por lo tanto, este término no se consideró en el análisis posterior.

Se calculó un ANOVA de un factor con medidas repetidas para cada uno de los atributos evaluados en boca: dulzor, acidez, astringencia, intensidad global y persistencia. Los cinco atributos mostraron diferencias significativas entre los vinos ($P < 0.001$ en todos los casos), lo que indica que todos ellos son descriptores útiles para la caracterización de las diferencias entre los 34 vinos.

Un análisis simple de correlación (Tabla II-3) entre los atributos sensoriales mostró que la intensidad global y persistencia están positivamente correlacionados ($P < 0.001$) y que ambos términos están a su vez alta y positivamente correlacionados con la percepción de astringencia ($P < 0.001$ en ambos casos). El sabor ácido también presentó correlaciones significativamente positivas con la intensidad global ($P < 0.01$) y se observó una tendencia entre este sabor y la persistencia ($P < 0.1$). Estos datos sugieren que la intensidad global y persistencia están ligados principalmente a las sensaciones orales tales como la astringencia o la acidez en los vinos tintos del presente estudio, en contra de lo que ya se ha observado en los vinos blancos, donde se ha demostrado que ambas sensaciones (intensidad global y persistencia evaluadas en boca) están vinculadas fundamentalmente a la percepción aromática [8].

Tabla II-3: Coeficientes de correlación de Pearson calculados entre los atributos evaluados por el panel entrenado. Las correlaciones significativas aparecen resaltadas en negrita.

| | dulzor | acidez | astringencia | intensidad global | persistencia |
|-------------------|--------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------|
| dulzor | 1 | | | | |
| acidez | 0.103 | 1 | | | |
| astringencia | -0.237 | -0.128 | 1 | | |
| intensidad global | -0.108 | 0.477^b | 0.767^c | 1 | |
| persistencia | -0.185 | 0.324^a | 0.655^c | 0.835^c | 1 |

^a: P < 0.1^b: P < 0.01^c: P < 0.001

3.2. Relación entre propiedades sensoriales en boca y composición química

3.2.1. Dulzor.

Un amplio abanico de trabajos afirman que los principales contribuyentes del sabor dulce son los azúcares reductores glucosa y fructosa [36], sin embargo en el presente estudio la percepción sensorial de dulzor y el contenido en azúcares reductores no se correlacionaron significativamente ($P = 0.166$). Este efecto concuerda con trabajos recientes llevados a cabo con otros grupos de vinos tintos secos [1, 24, 25] y podría ser atribuido a los bajos niveles de azúcares reductores en el conjunto de muestras. De hecho, la concentración de azúcares reductores (media = 1.89 g L^{-1}) está muy por debajo del umbral sensorial calculado en agua para el principal azúcar reductor glucosa: 3.24 g L^{-1} [30] y cerca del umbral sensorial para la fructosa en agua 1.83 g L^{-1} [30]. Del mismo modo, aunque el contenido en etanol ha sido descrito como un potenciador del dulzor [37, 38, 39], no se encontró una correlación significativa ($P = 0.980$) entre el sabor dulce y el contenido en etanol.

3.2.2. Acidez.

En cuanto a la percepción de la acidez, se encontró una correlación positiva significativa entre este sabor y la acidez total determinada en este conjunto de vinos ($P = 0.011$), lo que es congruente con trabajos anteriores [1]. El ácido tartárico, el principal contribuyente a la acidez titulable tiene un umbral sensorial (0.04 g L^{-1}) muy por debajo del valor medio calculado para la acidez total (5.5 g L^{-1}) [30]. Es destacable mencionar que la acidez sensorial no se correlacionó significativamente ni con el pH ($P = 0.741$) ni con el contenido en ácido láctico ($P = 0.308$) en los vinos.

3.2.3. Astringencia.

La astringencia, la intensidad global y la persistencia se encontraron altamente correlacionados entre sí y positivamente con el contenido de polifenoles totales, IPT ($P < 0.001$, en todos los casos). A pesar de que la existencia real de esta relación estadística ha sido ya confirmada en el Capítulo anterior de esta tesis (Sección II. Capítulo I) y en experimentos completos de reconstitución llevados a cabo por nuestro grupo de investigación [8], la contribución de las diferentes familias de compuestos fenólicos a la percepción sensorial de la astringencia no ha sido bien establecida hasta el momento. Trabajos recientes han demostrado que, sorprendentemente, y en contra de lo que se establece en estudios previos, los flavanoles, proantocianidinas dimeras, trimeras y tetrameras no parecen ser los desencadenantes principales de la sensación de astringencia en los vinos tintos. En su lugar, una variedad de diferentes compuestos de bajo peso molecular tales como ciertos polifenoles y ácidos, así como una fracción polimérica parecen jugar un papel muy importante en la percepción de esta sensación táctil en los vinos [24, 29]. Con el fin de confirmar y ampliar aún más estas observaciones, 30 moléculas individuales diferentes (derivados de ácidos, flavonoles, ácidos hidroxicinámicos y flavonoles) y dos familias de moléculas (proantocianidinas totales (TPAs) y proantocianidinas precipitables con proteína (PPAs)) (ver Tabla II-4) con propiedades conocidas de astringencia han sido cuantificadas y posteriormente utilizadas para el cálculo predictivo de modelos PLS para la astringencia. Para garantizar una máxima significación sensorial de los modelos, se utilizaron dos criterios previos para restringir el número de variables que entran en los modelos. En primer lugar, los compuestos o grupos de compuestos deben estar presentes en concentraciones por encima de sus umbrales sensoriales en al menos un vino (criterios de actividad sensorial); y en segundo lugar, sus rangos de aparición dentro del conjunto de muestras deben ser lo suficientemente grandes como para causar una diferencia sensorial (criterio de discriminación sensorial). Atendiendo al criterio de actividad sensorial, se seleccionaron veinte compuestos que presentaron una concentración máxima (max) por encima de los umbrales sensoriales. Como puede verse en la Tabla II-4, estos compuestos fueron cuatro ácidos y derivados (ácidos *c/t*-aconíticos, ácido gálico y éster etílico del ácido protocatéquico), PPAs, TPAs poliméricas totales, cuatro ácidos hidroxicinámicos (ácidos *c*-caftárico, *t*-caftárico, *t-p*-cutárico y *t*-cafeico) y los 10 flavonoles cuantificados. La posible capacidad de discriminación de cada variable fue cuantitativamente estimada utilizando el poder de discriminación o PD (cociente entre

máximos de concentración/umbral de sabor o mínimos de concentración, lo que sea más alto) [10]. Este parámetro puede verse en la Tabla II-4 en la columna encabezada por PD (por potencial de discriminación) y sólo aquellos compuestos para los que PD fue de al menos 2, o muy cercano a 2, fueron seleccionados.

Tabla II-4: Identificación, datos de los espectros de MS (M+), tiempo de retención (TR), concentraciones media, máxima (máx) y mínima (mín), potencial de discriminación –PD- (PD > 2 resaltado en negrita) y umbral sensorial (expresado en mg L⁻¹) para la astringencia.

| Parámetros /compuestos | M ⁺ (m/z) | TR (min) | media (mg L ⁻¹) | máx (mg L ⁻¹) | mín (mg L ⁻¹) | PD máx/mín ^a | umbral sensorial (mg L ⁻¹) |
|---|----------------------|----------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------|--|
| Ácidos y derivados | | | | | | | |
| ácido c-aconítico + ni | 175 | 3.1 | 3.11 | 4.73 | 1.40 | 3.38 | 0.1 |
| ácido t-aconítico | 175 | 3.6 | 4.10 | 5.35 | 2.75 | 1.95 | 0.1 |
| ácido gálico | 171 | 3.9 | 46.61 | 68.01 | 28.36 | 1.36 | 50 |
| ácido protocatéquico | 155 | 6.3 | 7.93 | 14.08 | 2.98 | * | 32 |
| éster etílico del ácido protocatéquico | 183 | 22.2 | 14.13 | 32.31 | 6.19 | 3.59 | 9 |
| Flavanoles | | | | | | | |
| procianidina B1 | 579 | 8.4 | 11.18 | 15.24 | 7.64 | * | 139 |
| epigallocatequina | 307 | 8.6 | 7.84 | 11.39 | 6.18 | * | 159 |
| catequina | 291 | 8.9 | 18.75 | 23.40 | 12.90 | * | 119 |
| procianidina B2 | 579 | 9.7 | 12.42 | 16.37 | 9.19 | * | 110 |
| galato de epigallocatequin | 459 | 9.9 | 11.70 | 15.48 | 8.67 | * | 87 |
| epicatequina | 291 | 11.7 | 18.25 | 39.25 | 12.99 | * | 270 |
| galato del catequina | 443 | 13.7 | 13.61 | 16.97 | 11.28 | * | 110 |
| galato de epicatequina | 443 | 17.4 | 7.84 | 11.39 | 6.18 | * | 110 |
| proantocianidinas precipitables con proteína (TPAs) | | | 10.2 | 14.3 | 6.9 | 2.1 | nd |
| proantocianidinas totales (TPAs) | | | 252.6 | 550.9 | 40.5 | 13.6 | 12.0 |
| Ácidos hidroxicinámicos y derivados | | | | | | | |
| ácido c-caftárico | 311 | 7.5 | 4.28 | 5.47 | 2.63 | 1.09 | 5 ^a |
| ácido t-caftárico | 311 | 7.9 | 25.97 | 60.80 | 9.80 | 6.20 | 5 ^a |
| ácido t-p-cutárico | 295 | 9.3 | 14.83 | 23.10 | 5.90 | 2.31 | 10 |
| ácido t-cafeico | 181 | 10.2 | 8.91 | 13.10 | 5.04 | 1.31 | 10 |
| ácido t-p-cumárico | 165 | 13.5 | 2.37 | 3.57 | 1.72 | * | 23 |
| ácido t-ferúlico | 195 | 19.4 | 4.34 | 7.23 | 2.75 | * | 13 |
| Flavonoles | | | | | | | |
| miricetin-3-O-glucósido | 451 | 17.6 | 2.51 | 6.35 | 0.29 | 6.35 | 1.0 |
| quercetin-3-O-galactósido | 465 | 23.3 | 3.33 | 6.52 | 0.86 | 7.58 | 0.2 |
| quercetin-3-O-glucurónido | 465 | 24.3 | 9.42 | 17.91 | 1.09 | 16.4 | 1.0 |
| quercetin-3-O-glucósido | 479 | 27.9 | 2.42 | 13.38 | 0.07 | 133.8 | 0.1 |
| miricetina | 319 | 29.2 | 8.43 | 10.65 | 7.98 | 1.33 | 3.1 |
| kaempferol-3-O-glucósido | 509 | 36.0 | 7.96 | 15.20 | 6.18 | 2.46 | 0.3 |
| isorhamnetin-3-O-glucósido | 479 | 38.6 | 0.78 | 6.96 | 0.10 | 6.33 | 1.1 |
| quercetin | 303 | 44.0 | 7.44 | 16.30 | 0.08 | 1.6 | 10 |
| kaempferol | 287 | 58.3 | 4.33 | 40.59 | 0.09 | 2.03 | 20 |

^a: si mín < umbral, PD = máx/umbral sensorial; si mín > umbral, PD = máx/mín

ni: no identificado

nd: no disponible

*: máx < umbral

Catorce compuestos presentaron PD ≥ 2 (marcados en negrita en la Tabla II-4) e incluyen siete flavonoles (kaempferol, kaempferol-3-O-glucósido, miricetina-3-O-glucósido, isohramnetina-3-O-glucósido, quercetina-3-O-glucósido, quercetina- 3-O-

galactósido y quercetina-3-O-glucurónido), PPAs y TPAs, ácidos *t*-caftárico (*Caft*) y *t*-p-cutárico (*Cout*), éster etílico del ácido protocatéquico (*Procat*) y ácido *t*-aconítico (*t*-Acon) y el pico correspondiente al ácido *c*-aconítico (*c*-Acon) eluyendo con un pico no identificado. También se consideraron dos parámetros más, el contenido de etanol y la relación de ácidos *t*-aconítico/*c*-aconítico (*trans/cis*) para el modelo de astringencia. Por un lado, se ha descrito que un aumento de contenido de etanol (*Et*) tiende a intensificar la astringencia [1, 11, 40, 41] y se ha encontrado una correlación significativa entre alcohol y este atributo en boca ($F = 17.77$; $P < 0.001$) en el conjunto de los vinos estudiados. Por otra parte, como se verá más adelante, diferentes pruebas sensoriales sugieren que la relación de los ácidos *t*-aconítico/*c*-aconítico juega un papel relevante desde el punto de vista sensorial en la percepción de la astringencia y, de hecho, se observó una correlación positiva ($F = 5.72$; $P = 0.022$) entre este parámetro y la astringencia sensorial en este conjunto del vinos.

Las regresiones PLS se calcularon con los 14 compuestos/grupos de compuestos que cumplieran tanto los criterios de actividad sensorial como los de discriminación sensorial (marcadas en negrita en la Tabla II-4), junto con el contenido de alcohol y la relación *trans/cis*. Además, se aplicó un criterio adicional de significación (criterio de Martens), de manera que se consideraron significativas las variables para las cuales los límites de incertidumbre resultantes de los coeficientes de regresión (2 desviaciones estándar por debajo de las condiciones ideales) no pasan la línea de cero [42]. Teniendo en cuenta estos criterios, se obtuvieron dos modelos PLS diferentes:

$$(1) \text{ Astringencia} = -0.016 + 0.37 * Et + 0.29 * Procat + 0.23 * Cout + 0.50 * PPAs + 0.07 * c-Acon + 0.05 * Caft$$

$$(2) \text{ Astringencia} = -3.59 + 0.35 * Et + 0.22 * Cout + 0.32 * PPAs + 0.22 * t/c + 0.16 * Caft$$

En el modelo (1) se identificaron cuatro muestras anómalas y se eliminaron del modelo. Este modelo de dos componentes principales explicó el 76% de la varianza original (70% por validación cruzada) con raíz del error cuadrático medio (*RMSE*) de 0.448. En el modelo (2), el cual está constituido también por dos componentes, sólo una muestra se identificó anómala, la varianza explicada fue ligeramente menor, 67% (63% por validación total cruzada) que la dada para el modelo (1), pero la raíz del error cuadrático medio de predicción (*RMSEP*) fue mejor, 0.377. Los pesos de *X* e *Y*, y los gráficos de variables predichas vs medidas de este último modelo se muestran en las Figuras II-1 y II-2, respectivamente.

Ambos modelos son muy significativos desde el punto de vista estadístico y ambos relacionan la astringencia sensorial con medidas químicas sensorialmente relevantes. En

el primer modelo aparece esta percepción sensorial positivamente relacionada con el contenido en seis compuestos diferentes relacionados con la astringencia (etanol, éster etílico del ácido protocatéquico, PPA, ácidos *t-p*-cumárico, *c*-aconítico y *t*-caftárico); en el segundo, el éster etílico del ácido protocatéquico y el ácido *c*-aconítico son reemplazados por la relación de ácidos *t/c*-aconítico. Ambos modelos sugieren fuertemente que las TPAs precipitables con proteína no son las únicas responsables de la percepción de la astringencia, sino que diferentes ácidos fenólicos de bajo peso molecular tienen también alto impacto en la astringencia. Este hecho está de acuerdo con publicaciones recientes llevadas a cabo con fracciones aisladas de vino [24, 29] y con la predicción de la astringencia calculada con un conjunto de 24 vinos tintos españoles [25]. Los modelos también confirman que el contenido en etanol es un copartícipe activo de la astringencia. Posteriormente se realizaron algunas pruebas adicionales sensoriales para confirmar otros aspectos más específicos de los modelos y adquirir más conocimiento acerca de la implicación de los compuestos que figuran en la Tabla II-4 en las características sensoriales del vino.

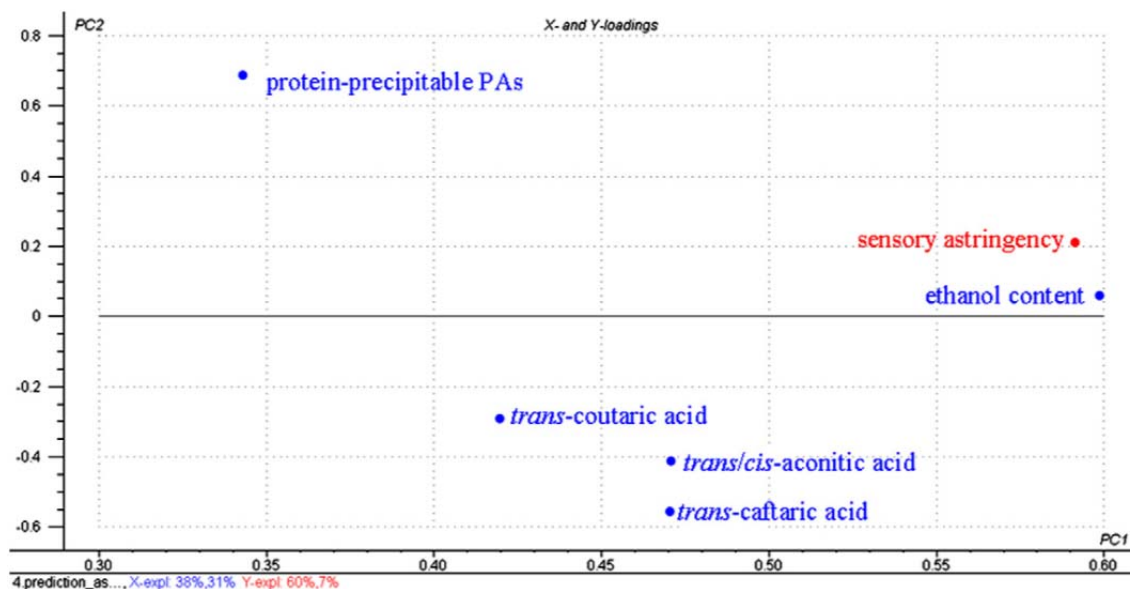


Figura II-1: Predicción de la astringencia mediante regresión PLS (modelo (2)). Las variables X significativas y la variable predicha (astringencia) se proyectan en las primeras dos componentes principales (PC1 y PC2)

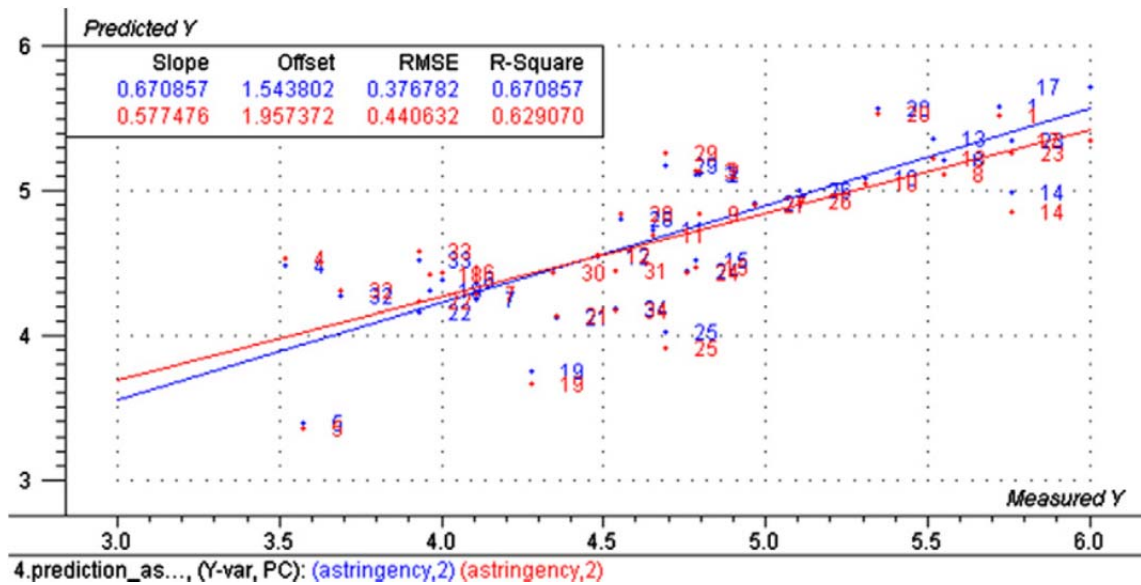


Figura II-2: Gráfico de las puntuaciones de astringencia predicha vs. medida obtenidas con la (a) calibración (en rojo) y (b) validación (en azul) de los modelos PLS (modelo [2]) calculadas para las 34 muestras de vino (numeradas del 1 al 34 en el gráfico).

3.3. Pruebas triangulares para evaluar el impacto sensorial de los compuestos no volátiles

La posible función sensorial en boca desempeñado por las diferentes moléculas no volátiles fue verificada mediante 24 pruebas de adición o fortificación realizadas tanto en vino neutro, como en disoluciones acuosas. Las pruebas sensoriales fueron tests triangulares realizados por duplicado. Hasta donde llega nuestro conocimiento, es la primera vez que se realizan pruebas de este tipo sobre percepciones sensoriales orales. Los resultados se resumen en la Tabla II-5. En las pruebas 1 y 2 (Tabla II-5) la fracción polimérica aislada por GCP a partir de un vino altamente astringente se añadió a un vino tinto neutro. Como se muestra en la tabla, la adición de dicha fracción polimérica induce diferencias sensoriales significativas en la matriz de vino neutro. La astringencia de la muestra fortificada fue descrita como más astringente por el 100% de los panelistas en la prueba 1, donde la adición de TPAs se llevó a cabo a concentraciones reales en vino. En la prueba 2, el vino neutro fue fortificado con la fracción de TPAs diluida 1:10. El análisis sensorial mostró que en esta prueba 2, la muestra fortificada fue identificada no sólo como más astringente (50% de las respuestas) sino también como más ácida (60% de las respuestas). Estos resultados confirman la destacada relevancia sensorial de este grupo de compuestos en las propiedades sensoriales de astringencia y sabor de los vinos tintos.

El resto de los resultados obtenidos en las pruebas de adición o fortificación fueron sorprendentes y revelaron la existencia de interacciones perceptivas extremadamente

complejas entre los diferentes compuestos no volátiles sensorialmente activos. Cabe destacar, que la adición de ácido *c*-aconítico tanto en vino como en agua (pruebas 4 y 5) no pudo ser detectada por nuestro panel, lo que está en claro contraste con los resultados obtenidos por nuestro grupo de investigación [24, 25] y el del profesor Hofmann [29], y también está en aparente contradicción con el papel que este compuesto parece desempeñar en la astringencia atendiendo al modelo (1). Del mismo modo, la adición de ácido *t*-caftárico al vino (prueba 13), no se pudo detectar, por lo tanto no se confirma la implicación que ambos modelos atribuyen a este compuesto. El éster etílico del ácido protocatéquico y el ácido cutárico, también presentes en los modelos de astringencia, no pudieron ser verificados debido a la falta de la cantidad necesaria de estándar o patrón para llevar a cabo las pruebas sensoriales.

La complejidad del problema se ilustra perfectamente con los experimentos sensoriales realizados con los ácidos *t*-y *c*-aconítico (Pruebas 4 - 10 de la Tabla II-5), con las llevadas a cabo también con los ácidos cafeico y caftárico (pruebas 11 - 15 en la tabla) y con las que se realizaron con diferentes flavonoles (pruebas 18 - 24). Mientras que nuestro panel sensorial parecía tener un umbral sensorial para el ácido *c*-aconítico mucho más alto que el del panel utilizado en la bibliografía [29], el ácido *t*-aconítico podría ser detectado significativamente a los niveles máximos que se encuentran en el conjunto de muestras (pruebas 6 y 7 en la Tabla II-5), lo que demuestra inequívocamente que este compuesto es sensorialmente activo en tal concentración en una matriz neutra de vino. Ingenuamente, se hipotetizó que ambos isómeros ejercerían un efecto aditivo, por lo que la adición simultánea de ambos compuestos sería fácilmente detectada por el panel sensorial. Por el contrario, lo que se ha observado repetidamente, ya que todos estos experimentos fueron posteriormente replicados, es que la adición de la mezcla de la dos isómeros tanto a vino (prueba 8) como a agua (prueba 9) no pudieron ser detectados.

Tabla II-5: Pruebas triangulares realizadas para comprobar el efecto de la adición de diferentes compuestos en las propiedades sensoriales orales de un vino neutro (nd: no detectado).a: relación de concentración de los ácidos *t/c*-aconíticos.

| prueba | matriz | compuesto | concentración en vino neutro (mg L ⁻¹) | concentración añadida en vino (mg L ⁻¹) | <i>t/c</i> -aconítico ^a | P ^b |
|-----------|-------------|--|--|---|------------------------------------|----------------|
| 1 | vino | TPAs | 84.25^b | 333.22^c | | 99.9% |
| 2 | vino | TPAs | 84.25^b | 145.75^c | | 95% |
| 3 | vino | sacarosa | nd | 5.00 ^d | | ns |
| 4 | vino | ácido <i>c</i> -aconítico | 1.27 | 4.34 | 1.29 | ns |
| 5 | agua | ácido <i>c</i> -aconítico | nd | 5.55 | nd | ns |
| 6 | vino | ácido <i>t</i>-aconítico | 5.39 | 11.26 | 8.86 | 95% |
| 7 | agua | ácido <i>t</i>-aconítico | nd | 5.86 | 5.86 | 95% |
| 8 | vino | ácido <i>c</i> -aconítico + ácido <i>t</i> -aconítico | 1.27 + 5.39 | 4.67 + 11.20 | 2.39 | ns |
| 9 | agua | ácido <i>c</i> -aconítico + ácido <i>t</i> -aconítico | nd | 5.39 + 6.65 | 1.23 | ns |
| 10 | vino | ácido <i>c</i> -aconítico + ácido <i>t</i> -aconítico + sacarosa | 1.27 + 5.39 + 0.0 | 4.67 + 11.20 + 5 | 2.39 | ns |
| 11 | vino | ácido <i>t</i> -cafeico | 14.55 | 24.85 | | ns |
| 12 | vino | ácido <i>t</i>-cafeico | 14.55 | 34.97 | | 95% |
| 13 | vino | ácido <i>t</i> -caftárico | 15.79 | 75.62 | | ns |
| 14 | vino | ácido <i>c</i> -aconítico + ácido <i>t</i> -aconítico + ácido <i>t</i> -cafeico | 1.27 + 5.39 + 14.55 | 4.67 + 11.20 + 24.85 | | ns |
| 15 | vino | ácido <i>c</i> -aconítico + ácido <i>t</i> -aconítico + ácido <i>t</i> -cafeico + sacarosa | 1.27 + 5.39 + 14.55 + 0.0 | 4.67 + 11.20 + 24.85 + 5 | | ns |
| 16 | vino | ácido protocatéquico | 2.21 | 8.61 | | ns |
| 17 | vino | ácido protocatéquico | 2.21 | 16.56 | | ns |
| 18 | vino | quercetin-3- <i>O</i> -galactósido | nd | 4.10 | | ns |
| 19 | agua | quercetin-3-<i>O</i>-galactósido | nd | 4.90 | | 90% |
| 20 | vino | quercetin-3-<i>O</i>-glucósido | nd | 8.34 | | 95% |
| 21 | agua | quercetin-3- <i>O</i> -glucósido | nd | 8.51 | | ns |
| 22 | vino | quercetin-3-<i>O</i>-glucurónido | 5.88 | 16.49 | | 95% |
| 23 | vino | quercetin-3- <i>O</i> -galactósido + quercetin-3- <i>O</i> -glucósido | nd | 3.52 + 8.22 | | ns |
| 24 | agua | quercetin-3- <i>O</i> -galactósido + quercetin-3- <i>O</i> -glucósido | nd | 5.81 + 8.60 | | ns |

b: significación del efecto; ns: no significativo. Efectos significativos destacados en negrita.

c: expresado en mg L⁻¹ de TPAs medidas por el ensayo de la vainillina en la fracción 2 obtenida por GPC.d: expresado en g L⁻¹.

Una posible explicación de esto deriva de la especificidad en la unión al receptor que produce la astringencia como ha sido reseñado por otros autores [43, 44, 45]. Atendiendo a esta hipótesis, el isómero *cis* se uniría al receptor más eficazmente que el isómero *trans*, impidiendo su detección por un mecanismo de antagonismo. Por lo tanto, sólo aquellas muestras con una relación *t/c*-aconítico más alta (Tabla II-5) podría ser detectado diferente del vino neutral no fortificado, lo que confirmaría la importancia sensorial que el modelo (2) atribuye a este parámetro.

La falta de aditividad en las respuestas sensoriales provocadas por compuestos no volátiles estructuralmente similares también se observa en los experimentos llevados a cabo con los ácidos *t*-cafeico, *t*-caftárico y *t*- y *c*-aconítico (pruebas 11 - 15 en la Tabla II-5). Los resultados fueron, sin embargo, bastante diferentes cuando la adición de los ácidos se llevó a cabo junto con un compuesto de carácter dulce. La presencia de una cantidad no detectable de sacarosa (prueba 3) en una mezcla de ácidos *c*-y *t*-aconítico (prueba 10) o de los ácidos *t*-aconítico y *t*-cafeico (prueba 15) produjo un aumento significativo (a un nivel del 95%) en el número de panelistas (16 de los 36 panelistas) que fueron capaces de diferenciar entre el vino y la muestra fortificada en comparación con las pruebas 8 o 14, donde sólo los ácidos estaban presentes en la muestra fortificada. Mientras que todos estos resultados ciertamente parecen confirmar la pobre aditividad de las señales sensoriales relacionadas con la astringencia, también revelan la posible existencia de interacciones entre las distintas sensaciones (dulzor x astringencia).

Interacciones perceptivas similares o incluso más complejas se han observado en las pruebas realizadas con diferentes flavonoles (pruebas 18 - 24). Los tres compuestos ensayados pudieron ser detectados en las concentraciones que se encuentran en el vino, lo que significa sin duda que son potencialmente activos desde el punto de vista sensorial. Sin embargo, se encontró que los efectos sensoriales fueron muy dependientes de la composición de la matriz. Por ejemplo, el favonol quercetina-3-*O*-glucósido podría inducir diferencias significativas en el vino (prueba 20), pero no en disolución acuosa (prueba 21). Mientras que se observó justo lo contrario para quercetina-3-*O*-galactósido, que es capaz de generar diferentes propiedades sensoriales en una disolución acuosa (prueba 19), pero no en el vino neutro (prueba 18). Una vez más, se observó que las muestras fortificadas con una mezcla de ambos isómeros (pruebas 23 y 24) no es sensorialmente diferente de la muestra de referencia (pruebas 18 - 21).

4. CONCLUSIONES

En resumen, esta investigación ha dado a conocer algunos aspectos sobre la base química de la astringencia del vino, ofreciendo dos modelos estadísticamente significativos para explicar esta percepción sensorial del vino que contiene compuestos astringentes sensorialmente activos y sensorialmente discriminantes. Aunque los modelos no pudieron ser completamente validados sensorialmente, debido a la no disponibilidad de todos los compuestos puros, la investigación ha demostrado que la sensación de astringencia del vino viene dada principalmente por proantocianidinas poliméricas, y secundariamente, por ciertos ácidos fenólicos, la relación ácido *t/c*-aconítico y ciertos flavonoles. La investigación ha puesto de manifiesto la existencia de interacciones extremadamente complejas entre los compuestos no volátiles en la percepción sensorial en boca. Particularmente notable es el potencial antagonismo encontrado entre pares de isómeros astringentes, la presencia de interacciones sensoriales del tipo dulce x astringente, así como la alta dependencia de la matriz en algunas respuestas sensoriales. Estos resultados sugieren la necesidad de nuevas pautas y procedimientos experimentales para desvelar completamente la verdadera relevancia sensorial de los compuestos no volátiles en el flavor general del vino.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Blackman, J., Rutledge, D. N., Tesic, D., Saliba, A., & Scollary, G. R. (2010). Examination of the potential for using chemical analysis as a surrogate for sensory analysis. *Analytica Chimica Acta*, 660, 2–7.
- [2] Ferreira, V., San Juan, F., Escudero, A., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Sáenz-Navajas, M. P., et al. (2009). Modelling quality of premium Spanish red wines from gas chromatography–olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7490–7498.
- [3] Ferrer-Gallego, R., García-Marino, M., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2010). Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Analytica Chimica Acta*, 660, 22–28.
- [4] Parpinello, G. P., Versari, A., Chinnici, F., & Galassi, S. (2009). Relationship among sensory descriptors, consumer preference and color parameters of Italian Novello red wines. *Food Research International*, 42, 1389–1395.
- [5] Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Vila-Crespo, J. (2009). Characterisation and classification of Spanish Verdejo young white wines by volatile and sensory analysis with chemometric tools. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1927–1935.
- [6] Polásková, P., Herszage, J., & Ebeler, S. E. (2008). Wine flavor: Chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews*, 32, 2478–2489.
- [7] Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 5574–5585.
- [8] Sáenz-Navajas, M., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry*, 121, 1139–1149.
- [9] Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Marques, J. C., & Cacho, J. (2006). Quantitative gas chromatography–olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines. *Analytica Chimica Acta*, 563, 180–187.
- [10] Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). 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*, 55, 4501–4510.
- [11] Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., et al. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15, 209–217.
- [12] Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513, 57–65.
- [13] Buratti, S., Ballabio, D., Benedetti, S., & Cosio, M. S. (2007). Prediction of Italian red wine sensorial descriptors from electronic nose, electronic tongue and spectrophotometric measurements by means of Genetic Algorithm regression models. *Food Chemistry*, 100, 211–218.

- [14] Lattey, K. A., Bramley, B. R., & Francis, I. L. (2010). Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 189–202.
- [15] Sáenz-Navajas, M. P., Martín-López, C., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2011). Sensory properties of Premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 9–12.
- [16] Varela, P., & Gambaro, A. (2006). Sensory descriptive analysis of Uruguayan Tannat wine: Correlation to quality assessment. *Journal of Sensory Studies*, 21, 203–217.
- [17] Fernandez, K., Kennedy, J. A., & Agosin, E. (2007). Characterization of *Vitis vinifera* L. cv. Carmenere grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 3675–3680.
- [18] Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P. L., & Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, 19, 286–291.
- [19] Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M. N., & Vallis, L. (2001). Correlations between saliva protein composition and some T-I parameters of astringency. *Food Quality and Preference*, 12, 145–152.
- [20] Kennedy, J. A., Ferrier, J., Harbertson, J. F., & Gachons, C. P. D. (2006). Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57, 481–485.
- [21] Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., Rozes, N., Arola, L., & Zamora, F. (2004). New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 742–746.
- [22] Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., et al. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 564–573.
- [23] Ishikawa, T., & Noble, A. C. (1995). Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality and Preference*, 6, 27–33.
- [24] Sáenz-Navajas, M.-P., Ferreira, V., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 673, 151–159.
- [25] Sáenz-Navajas, M. P., Tao, Y. S., Dizy, M., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of Premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12407–12416.
- [26] de Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 940–945.
- [27] de Wijk, R. A., & Prinz, J. F. (2005). The role of friction in perceived oral texture. *Food Quality and Preference*, 16, 121–129.

- [28] Prinz, J. F., & Lucas, P. W. (2000). Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation*, 27, 991–994.
- [29] Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1376–1386.
- [30] Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008). Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9190–9199.
- [31] ISO NORM 3591 (1977). International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- [32] Colonna, A. E., Adams, D. O., & Noble, A. C. (2004). Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 26–31.
- [33] Sun, B. S., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267–4274.
- [34] AOAC (2002). Method 993.05: L-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice. *Official Methods of Analysis*.
- [35] Ribéreau-Gayon, P. (1970). Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique*, 52, 627–631.
- [36] Ough, C. S., & Amerine, M. A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines*. New York: John Wiley and Sons.
- [37] Mattes, R. D., & DiMeglio, D. (2001). Ethanol perception and ingestion. *Physiology and Behavior*, 72, 217–229.
- [38] Scinska, A., Koros, E., Habrat, B., Kukwa, A., Kostowski, W., & Bienkowski, P. (2000). Bitter and sweet components of ethanol taste in humans. *Drug and Alcohol Dependence*, 60, 199–206.
- [39] Wilson, C. W. M., O'Brien, C., & Macairt, J. G. (1973). Effect of metronidazole on human taste threshold to alcohol. *British Journal of Addiction*, 68, 99–110.
- [40] Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., & Waters, E. J. (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19, 596–607.
- [41] Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A., & López-Solís, R. (2010). Enhancement of both salivary protein–enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 3729–3735.
- [42] Martens, H., & Martens, M. (2000). Modified Jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modelling by partial least squares regression (PLSR). *Food Quality and Preference*, 11, 5–16.
- [43] Hakkinen, L., Uitto, V. J., & Larjava, H. (2000). Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology*, 2000, 127–152.
- [44] Hofmann, T., & Schwarz, B. (2008). Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology*, 227, 1693–1698.

[45] Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., & Yamada, K. (2004). A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11, 380–381.

SECCIÓN II. CAPÍTULO III

Asignación de calidad: Una aproximación experimental para la evaluación de la base química responsable de la calidad en boca de los vinos tintos

1. INTRODUCCION

La calidad del vino es un concepto complejo que está muy influenciado por el nivel de implicación del consumidor [1, 2] o la experiencia en el sector del vino [3, 4], entre otros factores. Los consumidores más involucrados, que tienen más conocimiento e interés por el vino, son capaces de entender y llevar a cabo el proceso de evaluación de la calidad con más facilidad que los consumidores menos habituados [1]. Con respecto al nivel de experiencia, los expertos del mundo del vino parecen tener conceptos de calidad alineados y comunes, probablemente debido a que regularmente asisten a sesiones de cata formales, en las que a menudo tienen la información técnica sobre los vinos que catan. Esto conduce a una menor variabilidad y una mayor coherencia en las respuestas frente a las obtenidas por consumidores menos experimentados [5], que basan sus evaluaciones en su experiencia de consumo personal y que se traduce en respuestas personalizadas y subjetivas [6]. El hecho de que la evaluación de la calidad se base en aspectos técnicos de elaboración del vino para los expertos y en la experiencia personal para los consumidores, conduce a una falta de homogeneidad en el concepto de calidad entre los profesionales del vino y los consumidores con baja experiencia [7]. Por otra parte, la heterogeneidad que se observa en las respuestas entre los consumidores hace necesaria la segmentación entre los consumidores menos experimentados [8]. Por el contrario, los expertos han demostrado compartir conceptos de calidad dando lugar a una evaluación consensuada de la calidad [7, 9, 10]. Sin embargo, determinados estudios han puesto de manifiesto que si bien los expertos pueden ponerse de acuerdo sobre los atributos responsables de la calidad, es más difícil obtener un mismo valor de calidad, ya que parecen ser participante-dependientes [11, 12]. La comprensión de los factores responsables en la unidad de la percepción de calidad por los expertos es importante ya que las opiniones de estos influyen en las decisiones de compra del consumidor final [13, 14]. Esta es la razón por la que existen numerosos estudios encaminados a establecer correlaciones entre las puntuaciones de calidad obtenidas por los expertos y las propiedades sensoriales de los vinos. En este contexto, las evaluaciones de calidad realizadas por expertos [7, 9, 15, 16] o los

consumidores de vino altamente interesados [10] se han correlacionado con los perfiles sensoriales obtenidos por paneles entrenados. De estos estudios se obtiene una correlación significativa entre los aromas afrutados (rojas-negras o pasas dependiendo del tipo de vino) y aromas a madera, así como la astringencia o la acidez y las puntuaciones de calidad dadas por los expertos. Por el contrario, los aromas vegetales, a sotobosque o animal suelen ser aromas vinculados a vinos de baja calidad, ya que se correlacionan con los defectos derivados de una gestión inadecuada del proceso de elaboración. En general, se observa que los expertos basan principalmente sus criterios de calidad en primer lugar en la presencia o ausencia de odorantes negativos o defectuosos y en segundo lugar en la presencia de aromas positivos como la fruta [17]. En última instancia, las sensaciones generadas en boca [9] y el color [18] sirven para crear el juicio de valor de calidad final [17]. Por todo ello, los compuestos volátiles parecen ser los principales responsables de la calidad del vino, mientras que los compuestos no volátiles parecen jugar un papel secundario. Sin embargo, es ampliamente conocido que los parámetros enológicos convencionales medidos en bodega para el control de calidad se basan principalmente en la composición no volátil, tales como: azúcares reductores, acidez total, contenido en polifenoles totales, intensidad de color, ácido málico y láctico o contenido en alcohol. Este hecho se debe probablemente a que la metodología empleada para evaluar esta composición no volátil es menos costosa tanto en tiempo como en dinero que los métodos sofisticados para el análisis del aroma. Para resolver esta paradoja entre los resultados de los trabajos científicos y las prácticas enológicas comunes parece muy importante entender la contribución real que tienen los parámetros enológicos medidos habitualmente con la percepción de calidad.

Por otro lado, los mapas de preferencias (preference mapping) se han convertido en una interesante herramienta capaz de describir las características que contribuyen al gusto de los consumidores o grupos de consumidores, así como para identificar que productos son los que más gustan [19, 20]. Esta herramienta se ha aplicado con éxito en la evaluación y comprensión del concepto de calidad bajo el nombre de mapas de calidad (o Quality mapping) [21]. Esta estrategia parece prometedora, ya que no se basa exclusivamente en hipótesis lineales, tales como la regresión lineal (MLR) o la regresión por mínimo cuadrados (PLS). Las herramientas que no se basan exclusivamente en hipótesis lineales son esenciales para comprender mejor las

relaciones entre los datos sensoriales y químicos ya que estas relaciones raramente son lineales [22].

En este contexto, el primer objetivo de este trabajo ha sido establecer relaciones entre los atributos sensoriales en boca que se perciben en el vino y la composición no volátil. Por ello, se han usado estrategias basadas en mapas de calidad (Quality mapping) para relacionar la composición química no volátil de los vinos tintos y la calidad juzgada por un panel de expertos.

2. MATERIAL Y METODOS

2.1. Vinos

Se seleccionaron dieciséis vinos tintos españoles de distintas denominaciones de origen, variedad y diferentes periodos de envejecimiento tanto en botella como en barrica para cubrir un amplio rango de composición química no volátil que generase diferentes propiedades sensoriales y diferente percepción de calidad. La lista detallada de los vinos, incluyendo añada, denominación de origen, periodo de envejecimiento y parámetros enológicos convencionales se muestran en la Tabla III-1.

2.2. Análisis de la composición de la matriz no volátil

2.2.1. Reactivos y estándares.

Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todos disolventes cromatográficos fueron de grado MS. El agua ultrapura se obtuvo de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia). El gel TSK Toyopearl HW-50F fue suministrado por Tosohaas (Montgomery-ville, PA, EE.UU.), y metanol, ácido fórmico, etanol, acetonitrilo y ácido sulfúrico por Scharlab. El ácido tánico se adquirió en Panreac. La ovoalbúmina (V-grade), ácido L-tartárico, catequina, epicatequina, ácido *t*-aconítico, ácido *c*-aconítico, miricetina, kaempferol, vainillina, éster etílico del ácido protocatéquico, ácido protocatéquico, ácido gálico, ácido cafeico, y quercetina fueron proporcionados por Sigma-Aldrich. La quercetina-3-*O*-glucósido, quercetina-3-*O*-galactósido, quercetina-3-*O*-glucurónido, kaempferol-3-*O*-glucósido, isorhamnetina-3-*O*-glucósido, miricetina-3-*O*-glucósido, miricetina, kaempferol, galato de epicatequina, galato de epigalocatequina, procianidinas B1 y B2, ácidos ferúlico y *p*-cumárico fueron suministrados por Extrasynthese. El ácido vanilínico y ácido trifluoroacético (TFA) fueron adquiridos en Fluka.

2.2.2. Parámetros enológicos convencionales.

Los parámetros enológicos convencionales de los vinos se determinaron de acuerdo con las prácticas oficiales de la OIV. El Índice de Polifenoles Totales (IPT) se estimó como la absorbancia a 280 nm [23]. Los ácidos málico y láctico y el glicerol se determinaron mediante métodos enzimáticos según los métodos oficiales de análisis de la AOAC [24].

Los análisis de azúcares reductores, contenido de etanol, pH, acidez total y acidez volátil se realizaron por Espectrometría de Infrarrojo con Transformada de Fourier (IRFT)

con un equipo WineScan™ FT 120 (FOSS®, Barcelona), que fue previamente calibrado con los métodos oficiales de la OIV.

2.2.3. Análisis de la composición no volátil por GPC-UPLC-MS.

Primeramente se procedió al fraccionamiento de los vinos utilizando el método descrito en apartado 2.3.2 del capítulo 2 de esta misma sección [25]. De acuerdo con el método, 2 mL de vino se fraccionaron por cromatografía preparativa: cromatografía de permeación en gel (GPC). Se recogieron dos fracciones y se llevaron a sequedad mediante vacío. Las fracciones 1 y 2 se redisolviéron en 2 mL de ácido fórmico/agua (5:95, v/v) y 7.5 mL de metanol, respectivamente. La fracción F1 fue posteriormente analizada por UPLC-MS. El análisis UPLC-MS se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos Waters Acquity Ultra Performance LC (Milford, MA, USA) acoplado a un detector de espectrometría de masas microTOF II (Bruker Daltonik, Alemania) equipado con una fuente de electrospray (ESI) Apollo II y controlado por el software Bruker Daltonics DataAnalysis. La separación se llevó a cabo usando una columna C18 BEH (100mm de longitud x 2.1mm de diámetro interno y 1.7 μm , Waters), termostaticada a 40 °C. El flujo de la fase móvil se marcó a 0.45 mL min^{-1} y el volumen de inyección fue de 7.5 μL . Las fases utilizadas fueron: (A) agua/ácido fórmico (0.1%) y (b) acetonitrilo/ácido fórmico (0.1%). El gradiente utilizado fue: 0 - 4 min, 99 - 92 % A; 4 - 11 min, 92 - 70% A; 11 - 13.5 min, 70 - 0% A; 13.5 - 14.5 min, 0 - 99% A. La fuente de electrospray (ESI) operó en modo negativo con un rango m/z de 150 - 1500. Las condiciones óptimas de la fuente fueron: voltaje, 3.5 kV, temperatura de la fuente, 180 °C; temperatura de solvatación, 200 °C, flujo del gas, 9 L min^{-1} ; el gas nebulizador a una presión de 3 bares y 25 °C. Los espectros fueron adquiridos a una velocidad de 2 scan/segundo. La identificación de compuestos se llevó a cabo mediante la comparación de sus tiempos de retención y los espectros de masas (MS) y MS-MS de patrones. Su cuantificación se realizó por triplicado usando un calibrado con patrones comerciales para cada compuesto. La cuantificación de compuestos no comerciales se realizó con las curvas de calibración y el factor de respuesta de un compuesto estructuralmente cercano como ácido *t*-cumárico para ácido *t*-cutárico. Las curvas de calibración se obtuvieron mediante la inyección de diferentes concentraciones de los estándares.

2.2.4. Determinación del contenido total en proantocianidinas (TPAs).

La determinación de las proantocianidinas totales se llevó a cabo mediante el ensayo de la vainillina que se realizó tal y como se describe en el apartado 2.3.3 del Capítulo 2 de esta misma Sección de acuerdo con el método descrito en la bibliografía

Tabla III-1. Características de los vinos incluyendo origen, añada, variedad, tiempo de envejecimiento en barrica, pH, acidez volátil (AV), acidez total (ATT), azúcares reductores (AR), ácido málico, ácido láctico, índice de polifenoles totales (IPT) y alcohol

| Código Vino | Denominación de Origen | Año | Variedad | Meses barrica | pH | AV ^a (g L ⁻¹) | ATT ^b (g L ⁻¹) | AR (g L ⁻¹) | Acido málico (g L ⁻¹) | Acido láctico (g L ⁻¹) | IPT ^c (u.a.) | Alcohol (v/v) |
|-------------|------------------------|------|---|---------------|------|--------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|-------------------------|---------------|
| BE_R10 | DOCa Rioja | 2010 | tempranillo, garracha | 0 | 3.61 | 0.25 | 5.09 | 1.52 | 0.18 | 1.86 | 45.4 | 13.9 |
| RB_R06 | DOCa Rioja | 2006 | tempranillo, garracha | 18 | 3.49 | 0.57 | 5.37 | 2.23 | 0.23 | 1.45 | 49.4 | 14.3 |
| NJ_R09 | DOCa Rioja | 2009 | tempranillo, garracha | 18 | 3.65 | 0.66 | 5.35 | 1.67 | 0.18 | 2.14 | 49.7 | 13.6 |
| MC_R09 | DOCa Rioja | 2009 | tempranillo, graciano, mazuelo | 12 | 3.64 | 0.52 | 4.92 | 2.09 | 0.21 | 2.11 | 52.3 | 13.7 |
| AR_A08 | DO Arlanza | 2008 | tempranillo | 12 | 3.73 | 0.63 | 5.57 | 1.98 | 0.24 | 2.79 | 53.0 | 13.6 |
| SO_C07 | DO Cariñena | 2007 | garracha, tempranillo, cabernet sauvignon | 18 | 3.53 | 0.75 | 5.66 | 3.81 | 0.18 | 1.21 | 54.9 | 13.8 |
| SC_R10 | DOCa Rioja | 2010 | tempranillo, garracha | 0 | 3.72 | 0.48 | 4.84 | 2.32 | 0.18 | 2.52 | 57.8 | 13.4 |
| CT_B07 | DO Borja | 2007 | garracha | 15 | 3.47 | 0.51 | 5.66 | 4.34 | 0.30 | 0.75 | 59.1 | 13.9 |
| CH_R10 | DOCa Rioja | 2010 | tempranillo, viura | 0 | 3.88 | 0.62 | 4.45 | 1.77 | 0.20 | 3.30 | 60.3 | 14.1 |
| BO_B10 | DO Borja | 2010 | garracha, syrah, tempranillo | 0 | 3.66 | 0.47 | 5.04 | 2.68 | 0.17 | 1.07 | 61.0 | 14.8 |
| CZ_D08 | DO Duero | 2008 | tempranillo | 18 | 3.65 | 0.57 | 5.33 | 1.71 | 0.35 | 2.47 | 62.0 | 13.4 |
| CD_C10 | DO Cariñena | 2010 | garracha, tempranillo, cabernet sauvignon | 0 | 3.63 | 0.53 | 5.30 | 2.57 | 0.24 | 0.90 | 66.4 | 13.5 |
| RM_R10 | DOCa Rioja | 2010 | graciano | 8 | 3.57 | 0.41 | 5.80 | 2.31 | 0.19 | 1.45 | 66.4 | 14.8 |
| GC_B10 | DO Borja | 2010 | garracha | 4 | 3.43 | 0.42 | 6.14 | 3.61 | 0.25 | 0.68 | 71.4 | 14.7 |
| AY_C05 | DO Cariñena | 2005 | merlot, tempranillo, cabernet sauvignon | 10 | 3.52 | 0.69 | 5.86 | 3.39 | 0.33 | 1.00 | 74.3 | 14.3 |
| MG_V05 | O Dominio de Valdepusa | 2005 | cabernet sauvignon | 12 | 3.65 | 0.56 | 4.91 | 4.35 | 0.29 | 0.77 | 83.4 | 15.2 |

^a: expresado en g L⁻¹ de ácido acético.

^b: expresado en g L⁻¹ de ácido tartárico.

^c: expresado en unidades de absorbancia (u.a.).

consultada [26] en la segunda fracción obtenida a partir de la GPC.

2.2.5. Análisis de proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs).

Las proantocianidinas precipitables con proteína (PPAs) se estimaron usando ovoalbúmina como agente de precipitación y disoluciones de ácido tánico como curva de calibración de acuerdo con un método descrito previamente [27]. Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente ($20 \pm 2^\circ \text{C}$) y por triplicado.

2.3. Análisis sensorial

2.3.1. Análisis descriptivo por un panel entrenado.

Un total de 52 estudiantes y miembros del personal de la Universidad de La Rioja fueron reclutados en base a su interés y su disponibilidad durante 9 meses (una sesión de 60 minutos por semana). No se les gratificó por su participación. Por razones de asistencia se seleccionaron 41 de los 52 panelistas (17 hombres y 24 mujeres con edades comprendidas entre 21 y 57 años de edad, media = 28).

Los panelistas recibieron un entrenamiento sensorial dividido en 8 sesiones. Este período de formación incluye dos fases: una de entrenamiento general y otra fase de entrenamiento específico del mismo tipo de vinos del estudio. Los vinos seleccionados para la fase de entrenamiento general se caracterizaban por presentar un sabor o un atributo muy marcado y fácilmente reconocible. En esta fase se utilizaron vinos blancos, tintos y rosados de diferentes denominaciones de origen y variedades. Durante la fase de entrenamiento específico los panelistas se familiarizaron con el tipo de muestras del estudio (vinos tintos con diferentes niveles de IPTs).

Durante una sesión de entrenamiento típica los panelistas se familiarizaron con las propiedades en boca (dulzor, acidez, amargor, astringencia, intensidad global y persistencia). Para ello, se les presentaron diferentes referencias representativas de sabor y astringencia. Así, se utilizaron disoluciones con diferentes concentraciones de azúcar de mesa ($0 - 12 \text{ g L}^{-1}$) para dulzor, ácido tartárico ($0 - 1.5 \text{ g L}^{-1}$) para la acidez, sulfato de quinina ($0 - 10 \text{ mg L}^{-1}$) para amargor, y de sulfato de aluminio y potasio ($0 - 5 \text{ g L}^{-1}$) para astringencia, con el fin de ayudar al reconocimiento y discriminación entre las diferentes sensaciones orales [9]. Posteriormente, el panel evaluó entre 3 y 4 vinos diferentes en dulzor, acidez, amargor y astringencia en una escala de 10 puntos (0 = "ausencia", 1 = "muy bajo" y 9 = "muy alto"). La intensidad global en boca y persistencia global se evaluaron en una escala de 9 puntos (1 = "muy bajo" y 9 = "muy alto") ya que para estos últimos conceptos el 0 no tiene sentido. La sesión culminaba

con un debate durante el cual el responsable del panel comparaba las puntuaciones de intensidad del sabor dadas por los panelistas para describir el vino. La hoja suministrada a los panelistas se muestra en el Anexo VII.

Los panelistas entrenados evaluaron los vinos siguiendo el procedimiento descrito por Sáenz-Navajas y col. [9]. Los panelistas asistieron a dos sesiones para la caracterización de las 16 muestras de vino. En cada sesión, se colocaron dos muestras por duplicado para controlar la reproducibilidad del panel. El número de muestras que se presentó en cada sesión fue de diez. Se sirvieron quince mililitros de vino en copas negras de tipo tulipa ISO (NORMA ISO 3591, 1977) etiquetadas con códigos de tres cifras y cubiertas con placas Petri de plástico. Las muestras fueron colocadas a cada panelista de manera diferente de acuerdo con una disposición al azar. Cada panelistas evaluó el dulzor, la acidez, el amargor y la astringencia, así como la persistencia y la intensidad global en las escalas mencionadas anteriormente de los 20 vinos (16 vinos + 4 réplicas) usando el protocolo de enjuague entre muestra y muestra (Anexo III) descrito en los Capítulos I y II de esta misma Sección [28].

Todos los vinos fueron servidos a temperatura ambiente y evaluados en cabinas individuales. Los panelistas no fueron informados sobre la naturaleza de las muestras a evaluar.

2.3.2. Evaluación de la calidad por expertos.

El panel de expertos estuvo compuesto por 21 enólogos de la D.O.Ca. Rioja, doce mujeres y nueve hombres con edades comprendidas entre 28 y 57 años (media = 35).

Cada participante completo una sesión (de unos 20 minutos) en cabinas individuales. Los expertos evaluaron la calidad percibida en boca de las 16 muestras de vino. Se les pidió el uso de pinzas nasales para evitar la interacción del aroma. Del mismo modo, para evitar interacciones con el color los 15 mL de muestra fueron servidos en copas negras de tipo tulipa ISO (NORMA ISO 3591, 1977) etiquetadas con códigos de tres cifras y cubiertas por placas Petri de plástico. Posteriormente, podían catar las muestras todas las veces que ellos consideraran y en cualquier orden. En este caso se usaron escalas de 15 cm no estructuradas, en cuyos extremos se colocaron las palabras "bajo" y "alto" a la izquierda y derecha de la misma, respectivamente. La hoja suministrada a cada juez se muestra en el Anexo VIII.

2.4. Análisis de datos

2.4.1. Análisis sensorial descriptivo.

Se realizó un PCA para cada uno de los seis atributos evaluados en boca con el fin de evaluar la consistencia y acuerdo entre los jueces. Los panelistas que se proyectaron dispersos en el PCA, se eliminaron del análisis de datos, ya que esta dispersión indica que existe un desacuerdo con el resto del panel a la hora de evaluar el atributo en cuestión.

Para la evaluación de la capacidad discriminante de los atributos se realizó un análisis de varianza de un factor (ANOVA) para cada atributo, en el que el vino era el factor fijo y los jueces medidas repetidas.

2.4.2. Relación entre la composición química y sensorial.

En primer lugar se emplearon gráficos de dispersión para evaluar visualmente posibles asociaciones lineales, exponenciales o de otro tipo entre los atributos sensoriales y las moléculas no volátiles con actividad sensorial conocida [29]. Los coeficientes de regresión (R^2) se calcularon con EXCELL y solo las regresiones con $R^2 > 0.25$ se tuvieron en cuenta en la discusión de los datos.

2.4.3. Análisis clúster basando en las puntuaciones de calidad.

Se realizó un análisis clúster jerárquico (HCA) con el método Ward a partir de la matriz de similitud con distancias euclídeas creada a partir de las puntuaciones de calidad dadas por los expertos. La matriz creada para el análisis HCA dispone a los expertos en filas y los vinos en columnas. Esta matriz fue primeramente normalizada antes de realizar el análisis.

2.4.4. Relación entre la composición química y evaluación de la calidad: mapa de calidad.

En primer lugar se realizó un PCA con los valores medios de las 22 variables químicas que se esperaban que fueran sensorialmente activas presentes en concentraciones superiores a su umbral sensorial. De acuerdo con la ley de Kaiser se mantuvieron las dimensiones con un valor propio mayor que uno. Posteriormente, se creó un mapa de calidad externo mediante la regresión del centro de gravedad de cada grupo derivado de la evaluación de la calidad en los PCs significativos obtenidos a partir de las variables químicas.

Las regresiones ajustadas a un modelo vectorial reciben el nombre de “cuanto más, mejor”, lo que significa que el vino de calidad ideal se encuentra en la zona más lejana de la flecha proyectada en el PCA. Para el modelo elíptico existe un punto ideal y otro anti-ideal de calidad, lo que significa que existe un nivel máximo y mínimo en las variables químicas para los vinos con un determinado estándar de calidad, contrariamente al modelo vectorial de “cuanto más, mejor”.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis del comportamiento del panel

Los PCA realizados con cada uno de los atributos evaluados revelaron que las proyecciones de los jueces se agrupaban en la misma parte del plano para la acidez, amargor, astringencia, intensidad global y persistencia, indicando que el panel tiene el mismo criterio en la interpretación de estos atributos, como ejemplo en la Figura III-1 se muestra el PCA para la acidez. Por el contrario, el PCA para el dulzor muestra a los jueces distribuidos por todo el plano, como se muestra en la Figura III-2. Este hecho puede tener dos explicaciones: (1) o bien los panelistas no interpretan de la misma manera el atributo dulzor o bien (2) las diferencias sensoriales para el dulzor entre los vinos son demasiado pequeñas para ser percibidas por la mayoría de los panelistas. Esta última hipótesis es consistente con el hecho de que las muestras estudiadas son todos vinos tintos secos con un contenido en azúcares reductores inferior a 5 g L^{-1} . Del mismo modo, no es probable que el glicerol (un compuesto que generalmente se asocia con la percepción del dulzor en los vinos) contribuya al sabor dulce en este conjunto de vinos ya que solo en el vino NJ_R09 presenta una concentración superior al umbral sensorial, que es de 7.5 g L^{-1} según la bibliografía existente [30]. Por todo ello, el atributo dulzor no se tuvo en cuenta en los análisis posteriores.

El ANOVA calculado para cada uno de los demás atributos sensoriales (acidez, amargor, astringencia, intensidad global y persistencia) mostró diferencias significativas ($P < 0.001$) entre los vinos en todos los atributos, lo que sugiere que estos atributos son útiles para caracterizar las diferencias sensoriales entre este conjunto de vinos.

3.2. Intensidad global y persistencia evaluados en boca

Se calcularon regresiones lineales simples entre los atributos evaluados en boca por el panel entrenado, mostrando que la intensidad global y la persistencia están significativamente correlacionados entre ellos ($R^2 = 0.81$; $P < 0.001$). Este hecho ya se había observado en otros conjuntos de vinos tintos estudiados en nuestro grupo de investigación [9, 31]. Además, ambos atributos están principalmente correlacionados con el sabor amargo ($R^2 = 0.33$ y 0.36 , respectivamente $P < 0.05$), a diferencia de lo observado en otros trabajos [9] donde estaban principalmente correlacionados con la astringencia. Estos resultados podrían deberse al hecho de que el panel entrenado del estudio anterior [9] no fue consistente en la evaluación de atributo amargor, por lo que no pudo tenerse en cuenta en el tratamiento de datos de dicho estudio.

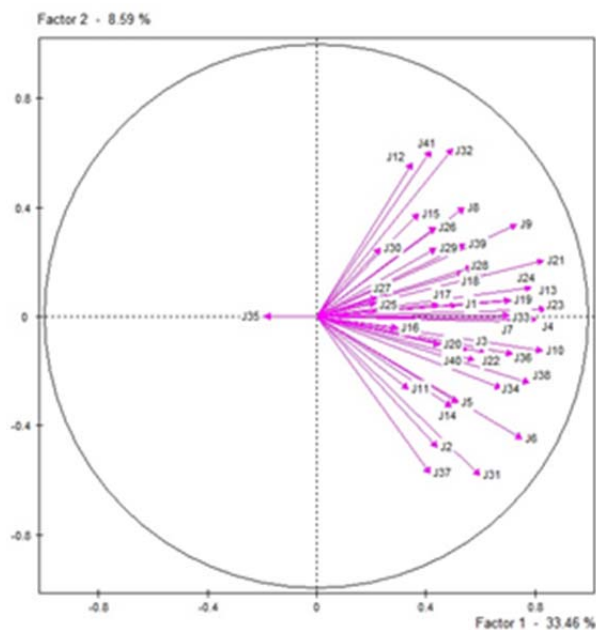


Figura III-1. Proyección de los jueces en el círculo de correlación para el atributo acidez.

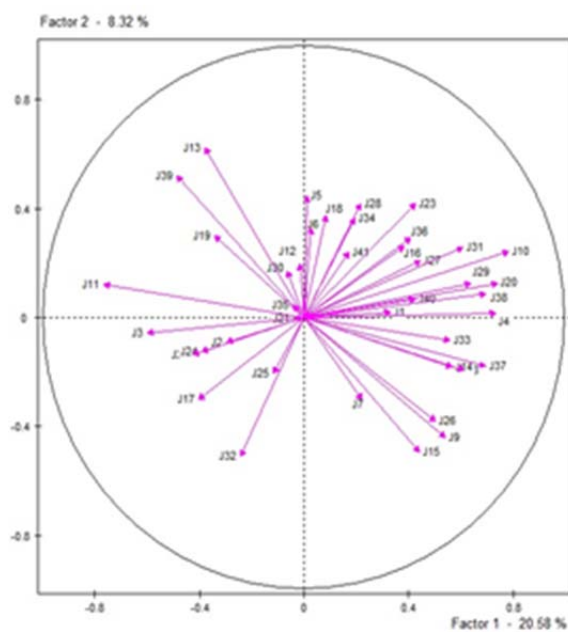


Figura III-2. Proyección de los jueces en el círculo de correlación para el atributo dulzor.

Este hecho no es sorprendente, ya que aproximadamente un 25% de la población humana hereda una característica genética, que los hace incapaces de detectar el sabor amargo [32]. Por lo tanto, los conceptos de persistencia e intensidad global se basaron principalmente en la astringencia percibida, a diferencia del grupo de jueces de este estudio, el cual si fue capaz de establecer diferencias en el atributo amargor entre los 16 vinos de estudio.

3.3. Actividad sensorial

Para evaluar la relación entre la composición química y las diferencias sensoriales percibidas por el panel entrenado se realizaron regresiones de grado dos con las variables químicas y las diferencias sensoriales mostradas por el panel.

3.3.1. Acidez.

Los resultados muestran que el sabor ácido está relacionado exponencialmente de manera significativa tanto con la concentración de ácido tartárico ($R^2 = 0.36$; $P < 0.05$) como con la de ácido succínico ($R^2 = 0.59$; $P < 0.01$). Estos resultados están de acuerdo con la literatura existente al respecto, en la que se observa que la estimación de la concentración del ácido tartárico a partir de la acidez total [25], así como la concentración de ácido succínico [33] son buenos predictores de la acidez percibida. Sin embargo, estos estudio relacionan la acidez percibida y estos compuestos con regresiones lineales, sin embargo nuestros resultados muestran que las predicciones mejoran considerablemente teniendo en cuenta una tendencia exponencial en lugar de una tendencia lineal. Este hecho es consistente con la ley de la psicofísica que establece relaciones exponenciales entre la concentración de compuestos volátiles y la intensidad sensorial generada por los mismos [22]. Como ejemplo, en la Figura III-3 se muestra la tendencia exponencial observada entre la acidez y la concentración de ácido succínico en 12 de los 16 vinos estudiados. La presencia de cuatro valores anómalos puede ser consecuencia de interacciones perceptivas y/o fisicoquímicas entre el ácido succínico y otros compuestos no volátiles o incluso entre compuestos volátiles, ya que los panelistas evaluaron los vinos en presencia del aroma. Estas interacciones sensoriales han sido documentadas tanto en vinos tintos reales [34] como en vinos reconstituidos [31] y también podrían explicar la ausencia de correlaciones entre las puntuaciones dadas para el sabor ácido y moléculas no volátiles con sabor ácido conocido y que están presentes en concentraciones por encima del umbral sensorial, tales como los ácidos málico y láctico o entre variables tales como el pH, acidez volátil y acidez total (Véase Tabla III-2). Otra posible explicación para este hecho, es que sus rangos de concentración no sean lo suficientemente amplios como para ser capaces de crear diferencias sensoriales entre las muestras.

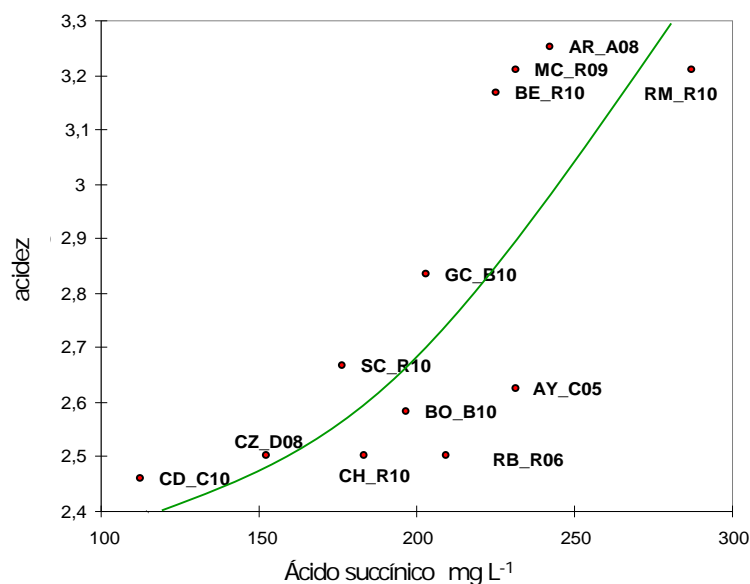


Figura III-3. Relación exponencial entre la acidez evaluado por el panel y la concentración de ácido succínico (expresada en mg L^{-1})

Tabla III-2. Umbrales sensoriales para los compuestos ácidos, rangos de concentración, media, diferencia entre la concentración máxima (máx) y mínima (mín), ecuación de regresión y coeficiente (R^2) en los vinos de estudio.

| | Umbral sensorial ^c | Rango de concentración | media | máx-min | ecuación ^d | R^2 |
|--|-------------------------------|------------------------|-------|---------|----------------------------------|-------|
| pH | | 3.4-3.9 | 3.6 | 0.5 | | |
| ATT (g L^{-1}) ^a | | 4.4.-6.1 | 5.3 | 1.7 | | |
| AV (g L^{-1}) ^b | | 0.3-0.7 | 0.5 | 0.5 | | |
| ácido tartárico (g L^{-1}) | 0.044 [28] | 0.8-3.9 | 0.9 | 0.5 | $2.74x^2-3.84x+3.81$ | 0.36 |
| ácido cítrico (g L^{-1}) | 0.035 [39] | 0.06-0.40 | 17 | 69 | | |
| ácido succínico (mg L^{-1}) | 0.47 [39] | 112-287 | 215 | 174 | $2 \cdot 10^{-5}x^2-0.002x+2.36$ | 0.59 |
| ácido málico (g L^{-1}) | 0.076 [39] | 0.2-0.4 | 0.2 | 0.2 | | |
| ácido láctico (g L^{-1}) | 1.4 [39] | 0.7-3.3 | 1.5 | 2.6 | | |
| ácido <i>c</i> -aconítico (mg L^{-1}) | 87 [28] | 2.5-3.9 | 3.1 | 1.4 | | |
| ácido <i>t</i> -aconítico (mg L^{-1}) | 87 [28] | 5.1-10.3 | 8.7 | 5.2 | | |

^a: acidez total expresada en ácido tartárico.

^b: acidez volátil expresada en ácido acético.

^c: calculado para los compuestos individuales en agua, referencia entre paréntesis.

^d: la variable independiente (x) corresponde con la concentración del compuesto correspondiente y la variable y dependiente es la puntuación dada por el panel para el sabor ácido.

3.3.2. Amargor.

Se han analizado 15 compuestos amargos, incluyendo monómeros y dímeros de flavanoles, flavonoles así como ésteres etílicos de los ácidos hidroxicinámicos, aunque ninguno de ellos debería contribuir al amargor del conjunto de vinos ya que todos ellos se encuentran muy por debajo de su umbral sensorial, como puede observarse en la Tabla III-3. Curiosamente, tanto el ácido succínico ($R^2 = 0.62$; $P < 0.01$) como en menor medida el contenido en etanol ($R^2 = 0.55$; $P < 0.01$) presentan relaciones significativas exponenciales y lineales respectivamente con el sabor amargo percibido

(Tabla III-3). El carácter amargo del ácido succínico es conocido [35], sin embargo, es la primera vez que se sugiere su relevancia en el amargor de los vinos. La vinculación entre el contenido en etanol y el amargor parece razonable, ya que ha sido demostrado que el contenido en etanol mejora la percepción del amargor a niveles típicos en el vino tanto en sistemas modelo [36] como en vinos reales [37].

Tabla III-3. . Umbrales sensoriales para los compuestos amargos, rangos de concentración, media, diferencia entre la concentración máxima (máx) y mínima (min), ecuación de regresión y coeficiente (R^2) en los vinos de estudio.

| | Umbral sensorial ^a | Rango de concentración | media | máx-min | ecuación ^b | R^2 |
|--|-------------------------------|------------------------|-------|---------|-------------------------------------|-------|
| Flavonoles | | | | | | |
| catequina | 290 [42] | 8.72-24.6 | 15.1 | 15.84 | | |
| epicatequina | 270 [42] | 2.64-22.5 | 6.4 | 19.82 | | |
| procianidina B1 | 231 [30] | 16.5-36.7 | 27.4 | 20.26 | | |
| procianidina B2 | 280 [30] | 2.92-23.8 | 8.4 | 20.91 | | |
| procianidina B3 | 289 30 | 0.86-1.81 | 1.4 | 0.95 | | |
| Flavonoles | | | | | | |
| miricetina | 10 [43] | 1.15-8.37 | 5.59 | 7.22 | | |
| quercetina | 10 [43] | 0.15-9.55 | 4.40 | 9.40 | | |
| kaempferol | 20 [43] | <0.03-1.25 | 0.38 | 1.22 | | |
| Ácidos fenólicos | | | | | | |
| éster etílico del ácido caféico | 229 [30] | 0.04-5.30 | 1.14 | 1.18 | | |
| éster etílico del ácido gálico | 438 [30] | 40.9-177 | 77.5 | 136 | | |
| éster etílico del ácido <i>p</i> -cumárico | 137 [30] | 0.10-1.76 | 0.50 | 1.67 | | |
| éster etílico del ácido vainílico | 125 [30] | nd | | | | |
| éster etílico del ácido ferúlico | 158 [30] | nd | | | | |
| éster etílico del ácido protocatéquico | 182 [30] | 0.05-1.25 | 0.20 | 1.20 | | |
| éster etílico del ácido siringico | 130 [30] | nd | | | | |
| Otros | | | | | | |
| alcohol (% v/v) | | 13.4-15.2 | 13.9 | 1.86 | 0.29x-1.2 | 0.55 |
| ácido succínico | | 112-287 | 215 | 174.73 | $3 \cdot 10^{-5}x^2 - 0.01x + 3.14$ | 0.62 |

^a: calculado para los compuestos individuales en agua, referencia entre paréntesis.

^b: la variable independiente (x) corresponde con la concentración del compuesto correspondiente y la variable dependiente y es la puntuación dada por el panel para el sabor amargo.

3.3.3. Astringencia.

Primeramente, se observó una tendencia lineal positiva altamente significativa ($R^2 = 0.71$; $P < 0.001$) entre el contenido de polifenoles totales (IPT) y la astringencia evaluada por el panel entrenado (Tabla III-4). Entre la composición polifenólica, tanto las proantocianidinas precipitables con proteína ($R^2 = 0.62$; $P < 0.01$), como las proantocianidinas totales ($R^2 = 0.47$; $P < 0.05$) (mayores que trímeros) presentaron tendencias exponenciales con la astringencia percibida. En cuanto a los flavanoles no polimerizados, tales como monómeros y dímeros, no se espera que tengan mucha importancia en la astringencia en este conjunto de vinos, ya que como puede

observarse en la Tabla III-4, todos ellos se encuentran por debajo de su umbral sensorial. Sin embargo, las procianidinas B1 ($R^2 = 0.63$; $P < 0.01$) y B3 ($R^2 = 0.60$; $P < 0.01$) muestran una correlación positiva con la astringencia. Esto podría ser una consecuencia indirecta derivada de la formación de los flavanoles más polimerizados (PPAs y TPAs), que tiene lugar a partir de sus monómeros y oligómeros. Esto sugiere que los vinos con mayor concentración en dímeros de flavanoles tales como las procianidinas B1 y B3, darían lugar a una mayor formación de material polimérico, el cual se ha demostrado ser el principal responsable de la astringencia sensorial de los vinos [38].

Por otro lado, los ácidos fenólicos caftárico y cutárico, así como el éster etílico del ácido gálico, los flavonoles quecetina-3-*O*-glucosido y la quercetina-3-*O*-galactósido, los ácidos *c*- y *t*-aconíticos se encontraron por encima de su umbral sensorial (Tabla III-4), sin embargo, no se observó ninguna relación con la astringencia percibida salvo para el ácido *t*-aconítico, el cual presentó una tendencia exponencial en este grupo de vinos ($R^2 = 0.35$; $P < 0.05$). La aportación del ácido *t*-aconítico a la astringencia se ha puesto de manifiesto en otros estudios anteriores [38, 39] y en el Capítulo II de esta misma Sección.

Además de la composición polifenólica, que es ampliamente reconocida como el principal responsable de la astringencia de los vinos, el contenido en etanol también se ha demostrado ser una variable importante relacionada con el aumento de la astringencia percibida en disoluciones modelo [36], sin embargo, en las muestras de vino reales este efecto no se ha encontrado [40], lo que estaría de acuerdo con los datos obtenidos en el presente estudio.

Tabla III-4. Umbral sensoriales para los compuestos astringentes, rangos de concentración, media, diferencia entre la concentración máxima (máx) y mínima (mín), ecuación de regresión y coeficiente (R^2) en los vinos de estudio.

| | Umbral sensorial ^c | Rango de concentración | media | máx-min | ecuación ^d | R^2 |
|---|-------------------------------|------------------------|-------|---------|--|-------|
| Flavanoles | | | | | | |
| catequina | 119 [40] | 8.72-24.6 | 15.1 | 15.8 | | |
| galato de catequina | 110 [40] | <0.03-0.33 | 0.0 | 0.30 | | |
| epicatequina | 270 [40] | 2.64-22.5 | 6.4 | 19.8 | | |
| galato de epicatequina | 110 [40] | <0.04-4.29 | 0.5 | 4.25 | | |
| epigalocatequina | 169 [40] | 0.31-2.18 | 0.9 | 1.87 | | |
| procianidina B1 | 139 [28] | 16.5-36.7 | 27.4 | 20.2 | 0.058x + 1.32 | 0.63 |
| procianidina B2 | 110 [28] | 2.92-23.8 | 8.4 | 20.9 | | |
| procianidina B3 | 139 [28] | 0.86-1.81 | 1.4 | 0.95 | 0.94x + 1.62 | 0.60 |
| IPTs | ? _¿ | 45.4-83.4 | 59.7 | 38.0 | 0.030x + 1.21 | 0.78 |
| PPAs | ? _¿ | 0.20-0.62 | 0.4 | 0.42 | 4.95x ² - 1.49x + 2.72 | 0.62 |
| TPAs | ? _¿ | 161-723 | 281 | 561 | -1*10 ⁻⁶ x ² + 0.003x + 2.21 | 0.47 |
| Ácidos fenólicos | | | | | | |
| ácido gálico | 45 [28] | 35.50-146.8 | 60.5 | 111 | | |
| ácido protocatéquico | 32 [28] | 1.32-16.6 | 2.5 | 15.3 | | |
| ácido caféico | 13 [28] | 3.28-13.7 | 5.4 | 10.4 | | |
| ácido caftárico | 5 [28] | 42.6-148 | 69.9 | 105.5 | | |
| ácido cumárico | 23 [28] | 1.09-4.42 | 2.1 | 3.33 | | |
| ácido cutárico | 25 [42] | 5.69-44.30 | 17.0 | 38.6 | | |
| ácido vainílico | 53 [28] | 1.45-11.5 | 4.9 | 10.1 | | |
| ácido ferúlico | 13 [28] | 0.72-3.75 | 1.3 | 3.03 | | |
| ácido siríngico | 52 [28] | 2.75-11.4 | 4.9 | 8.60 | | |
| Esteres etílicos de ácidos fenólicos | | | | | | |
| éster etílico del ácido protocatéquico | 9 [28] | <0.06-1.25 | 0.2 | 1.20 | | |
| éster etílico del ácido caféico | 69 [28] | 0.04-1.22 | 0.3 | 1.18 | | |
| éster etílico del ácido ferúlico | 15 [28] | nd | | | | |
| éster etílico del ácido gálico | 37 [28] | 40.9-177 | 77.5 | 136 | | |
| éster etílico del ácido vainílico | 25 [28] | nd | | | | |
| éster etílico del ácido cumárico | 27 [28] | 0.10-1.76 | 0.50 | 1.67 | | |
| éster etílico del ácido siríngico | 4 [28] | nd | | | | |
| Flavonoles | | | | | | |
| quercetin-3-O-galactósido | 0.2 [28] | <0.02-0.51 | 0.2 | 0.49 | | |
| quercetin-3-O-glucósido | 1.0 [28] | <0.02-2.43 | 0.1 | 2.41 | | |
| isoharmnetin-3-O-glucósido | 1.1 [28] | <0.03-0.75 | 0.0 | 0.72 | | |
| miricetina | 10 [41] | 1.15-8.37 | 5.6 | 7.22 | | |
| quercetina | 10 [41] | 0.15-9.55 | 4.4 | 9.40 | | |
| kaempferol | 20 [41] | <0.03-1.25 | 0.4 | 1.22 | | |
| Otros | | | | | | |
| alcohol % (v/v) | ? _¿ | 13.4-15.2 | 13.9 | 1.86 | | |
| ácido c-aconítico | 0.1 [28] | 2.50-3.89 | 3.1 | 1.39 | | |
| ácido t-aconítico | 0.1 [28] | 5.10-10.3 | 8.7 | 5.20 | 0.058x + 1.32 | 0.63 |

3.4. Evaluación de la calidad por el panel de expertos

El análisis clúster calculado con las puntuaciones de calidad individuales de los 21 expertos dio como resultado tres clústers principales tal y como se muestra en la Figura III-4. El primer clúster está constituido por 7 expertos y el segundo y el tercero por 6 y 8 expertos, respectivamente. El hecho de que la calidad evaluada por los expertos fuera exclusivamente en boca y con pinza en la nariz provocó una disparidad en la evaluación, provocando la aparición de estos tres grupos o clústers de jueces. Investigaciones anteriores, han demostrado que a la hora de emitir un juicio de calidad sobre el vino, los expertos dan más relevancia a los estímulos provocados por el aroma que a los provocados en boca [9]. Este hecho, pudo llevar a desarrollar criterios diferentes a la hora de evaluar la calidad exclusivamente con sensaciones en boca. Esto se ve apoyado por los resultados obtenidos en otros trabajos realizados con estos mismos vinos (no se muestran en la tesis), donde los mismos expertos evaluaron primeramente la calidad del aroma por vía exclusivamente ortonasal y a continuación la calidad global (aroma y boca). En estos dos últimos casos, los mismos expertos compartieron los criterios de calidad a diferencia de lo observado en la evaluación cuando la calidad fue realizada con pinza en la nariz. Estos resultados mostraron que en las condiciones en las que los jueces tenían acceso al aroma las puntuaciones de calidad eran homogéneas. Así los expertos comparten el mismo concepto de calidad y de hecho en la evaluación global, la calidad estuvo fuertemente correlacionada con la calidad basada exclusivamente en el aroma ortonasal ($R^2 = 0.60$; $P < 0.01$).

3.4.1. Correlación entre las variables químicas y la calidad evaluada.

Se cuantificaron las moléculas no volátiles con actividad sensorial conocida [29], y se eliminaron los compuestos que se encuentran por debajo de su umbral sensorial del nuevo análisis de datos (se considera que estos no han de tener un impacto sensorial significativo).

Las procianidinas B1 y B3 aun encontrándose por debajo de su umbral sensorial han sido consideradas, ya que presentaban correlaciones significativas con la astringencia, responsable en parte en la percepción de calidad de los vinos tintos [9]. Del mismo modo, se han incluido los azúcares reductores porque aunque se encuentran por debajo de su umbral sensorial para el dulzor, existen indicios para pensar que influyen en la percepción de calidad [25, 38]. Así pues, se calculó un PCA con los compuestos con concentraciones superiores a su umbral sensorial como: glicerol, ácidos tartárico, málico

y láctico, quercetina-*O*-3-glucósido, quercetina-3-*O*-galactosido, ácidos cutárico, caftárico y ácidos *c*- y *t*-aconíticos, éster etílico del ácido gálico así como las procianidinas B1 y B3 y los azúcares reductores.

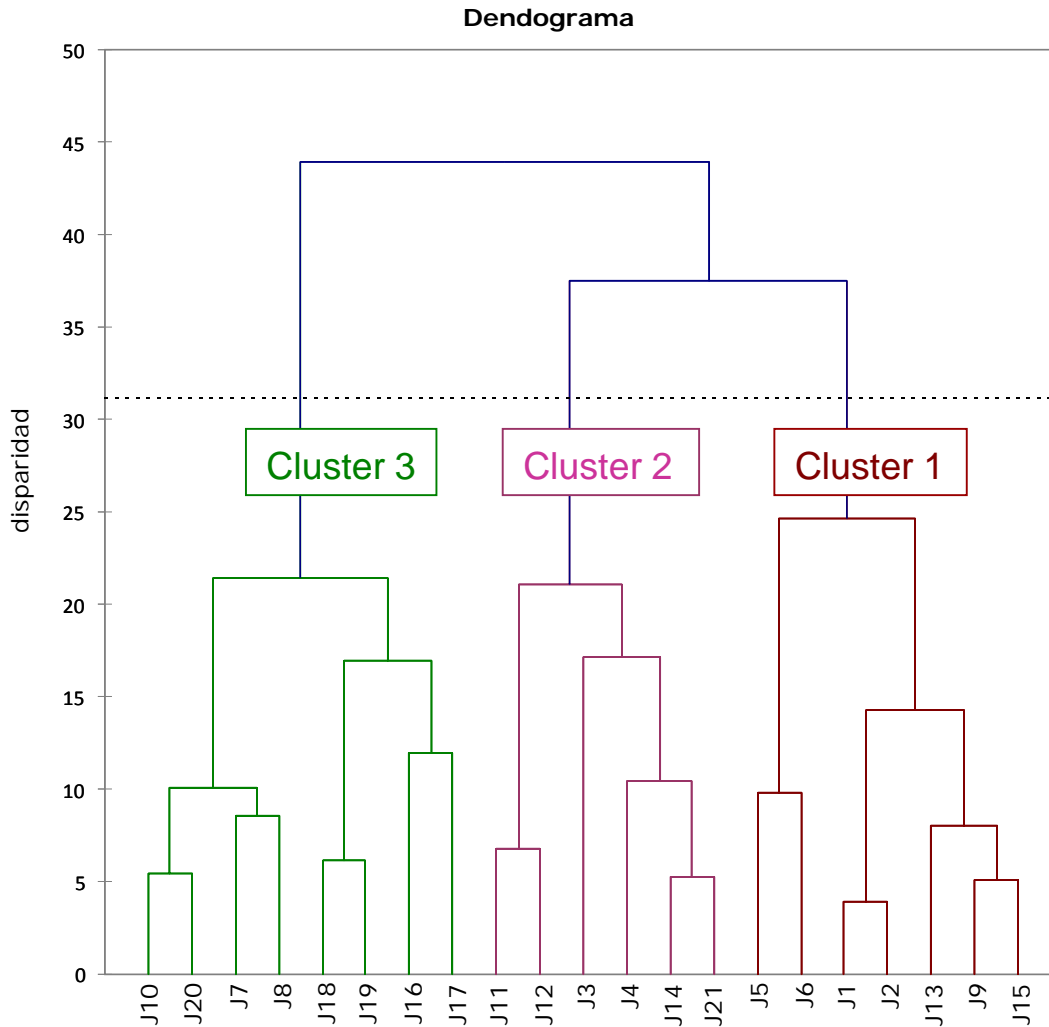


Figura III-4. Dendrograma obtenido a partir del análisis clúster de la evaluación de la calidad en boca de los vinos realizada por 21 expertos.

Además, también se han tenido en cuenta las variables que muestran correlaciones significativas tanto con el amargor, (grado alcohólico y ácido succínico) y con la astringencia (IPTs, PPAs, TPAs), así como los parámetros enológicos convencionales, que son ampliamente utilizados en el control de calidad de los vinos en las bodegas.

Con todo ello, se incluyeron 22 variables químicas en el PCA. De acuerdo con el criterio de Kaiser y el gráfico de sedimentación se consideraron las seis primeras componentes, las cuales representan más del 84% de la varianza original. En la Tabla III-5 se muestran las correlaciones entre los parámetros químicos y las seis primeras componentes.

Tabla III-5. Correlaciones entre los parámetros químicos y las seis primeras componentes del PCA. Las correlaciones significativas aparecen en negrita.

| | PC1 | PC2 | PC3 | PC4 | PC5 | PC6 |
|------------------------------------|---------------|---------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| IPTs | -0.448 | -0.508 | 0.531 | -0.242 | -0.043 | 0.336 |
| acidez volátil | 0.002 | -0.533 | -0.345 | -0.390 | 0.346 | -0.033 |
| azúcares reductores | -0.730 | -0.273 | 0.336 | -0.349 | -0.030 | -0.159 |
| grado alcohólico | -0.651 | 0.155 | 0.377 | -0.161 | -0.192 | 0.458 |
| ácido tartárico | -0.233 | 0.235 | 0.189 | 0.795 | 0.220 | 0.034 |
| ácido succínico | -0.534 | 0.416 | -0.340 | -0.057 | 0.118 | 0.603 |
| glicerol | -0.474 | 0.722 | -0.116 | -0.013 | -0.224 | 0.121 |
| PPAs | -0.181 | -0.428 | 0.220 | -0.210 | 0.520 | 0.492 |
| TPAs | 0.560 | -0.567 | 0.013 | -0.119 | -0.299 | -0.168 |
| procianidina B1 | 0.501 | -0.525 | 0.319 | 0.453 | 0.167 | 0.128 |
| procianidina B3 | 0.295 | -0.386 | 0.432 | 0.636 | 0.097 | 0.118 |
| ácido <i>t</i> -aconítico | 0.595 | 0.414 | 0.363 | -0.082 | 0.089 | 0.078 |
| ácidez total | -0.707 | -0.234 | -0.150 | 0.434 | -0.055 | -0.256 |
| pH | 0.806 | 0.056 | 0.060 | -0.247 | 0.072 | 0.411 |
| ácido málico | -0.353 | -0.701 | -0.256 | -0.058 | -0.384 | 0.186 |
| ácido láctico | 0.905 | -0.012 | -0.280 | -0.005 | 0.066 | 0.229 |
| ácido caftárico | -0.030 | -0.152 | 0.646 | -0.190 | -0.549 | -0.035 |
| ácido cutárico | 0.820 | -0.225 | -0.029 | -0.137 | -0.316 | 0.059 |
| ácido <i>c</i> -aconítico | 0.166 | 0.198 | 0.537 | -0.201 | 0.610 | -0.307 |
| quercetin-3- <i>O</i> -galactósido | 0.058 | 0.346 | 0.861 | 0.199 | -0.198 | 0.003 |
| quercetin-3- <i>O</i> -glucósido | -0.310 | -0.006 | 0.270 | -0.677 | 0.272 | -0.322 |
| éster etílico del ácido gálico | -0.630 | -0.545 | -0.099 | 0.392 | 0.189 | -0.007 |

Las puntuaciones de calidad de los tres clúster de expertos (centroides de cada grupo) se correlacionaron con las seis primeras componentes del análisis PCA realizado con los parámetros químicos. Las componentes 4, 5, y 6 no presentaron correlación ninguna con las puntuaciones de calidad, por lo que sólo se llevó a cabo el estudio de las tres primeras componentes, las cuales explican el 27.5%, 16.2% y 13.6%, respectivamente, de la varianza original. Las Figuras III-5 y III-6 muestran los mapas de calidad tanto para los 3 clústers de expertos como para los vinos, respectivamente. Estos mapas permiten identificar los vinos que son considerados por los expertos de mayor calidad, así como los parámetros químicos responsables de esta. La Figura III-5 muestra la proyección de los tres grupos de expertos obtenidos a partir del análisis clúster. La flecha que representa al clúster 1 (formado por un 33% del panel) indica que la calidad evaluada por los expertos de este grupo se ajusta a un modelo vectorial (relación lineal). Este modelo recibe el nombre de "cuanto más, mejor" y sugiere que para los expertos de este grupo el vino de calidad ideal es aquel que se encuentra tan lejos como sea posible hacia la flecha. Esto significa que las variables químicas

correlacionadas con este vector tienen que ser maximizadas para la obtención de vinos de alta calidad de acuerdo al criterio de los expertos del clúster 1. La matriz de correlación calculada entre las seis primeras componentes del PCA y las puntuaciones medias de calidad para este grupo de expertos muestra una correlación negativa y significativa entre las puntuaciones de calidad y la PC5 ($R^2 = -0.36$). Esto indica que las variables químicas con mayor peso en esta componente (PC5) son las que juegan un papel importante en la percepción de calidad del clúster 1. En este caso, las variables químicas: PPA y el ácido *c*-aconítico, que han sido relacionados ampliamente con la astringencia percibida [38], son las que están correlacionadas con la PC5 y por lo tanto con la calidad percibida por este grupo de expertos.

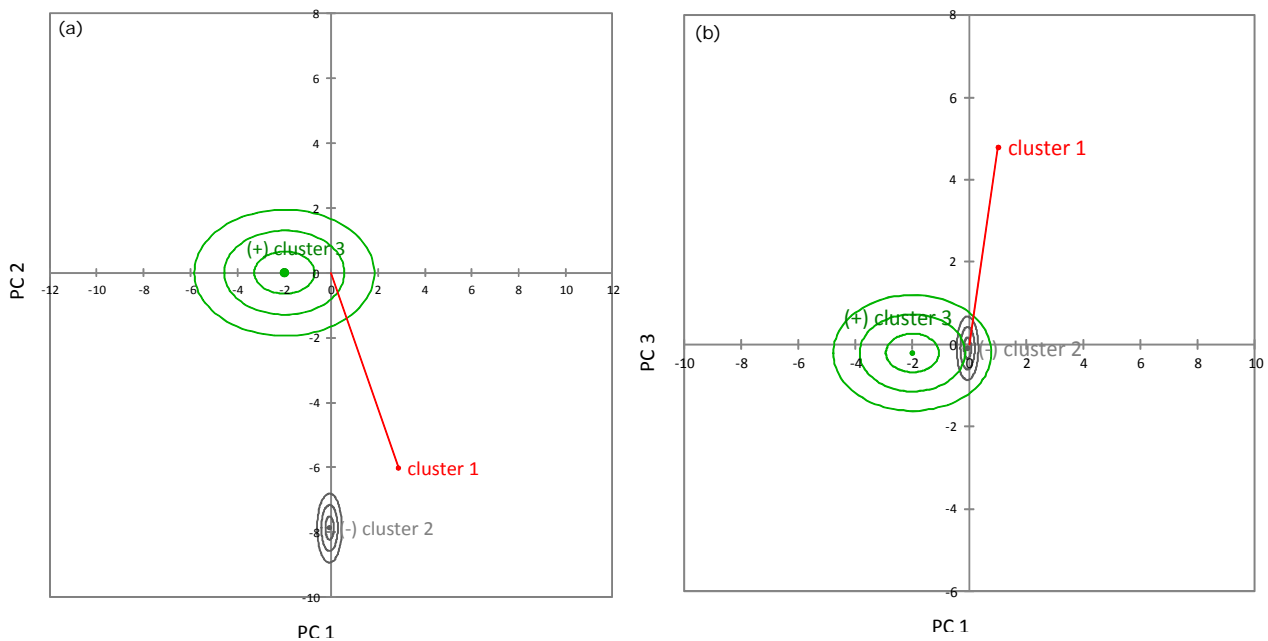


Figura III-5. Proyección de los tres clústers obtenidos con los mapas de calidad en (a) componentes 1 y 2 y (b) componentes 1 y 3. El vector del clúster 1 indica un modelo vectorial. Los signos (+) y (-) muestran el punto ideal y anti-ideal para los clústers 2 y 3, respectivamente.

Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos llevados a cabo con expertos españoles [9], australianos [7] y uruguayos [10], que muestran que la astringencia sensorial de los vinos se correlaciona positivamente con la percepción de calidad. Igualmente, se observa una correlación positiva entre el clúster 1 de expertos y la componente 3 (PC3) ($R^2 = 0.18$), la cual está positivamente correlacionada con el IPT, el ácido caftárico y la quercetin-3-*O*-galactósido. Teniendo en cuenta el coeficiente de correlación tan bajo entre la PC3 y las puntuaciones de calidad, parece que el papel de estos compuestos en la percepción de calidad es limitada.

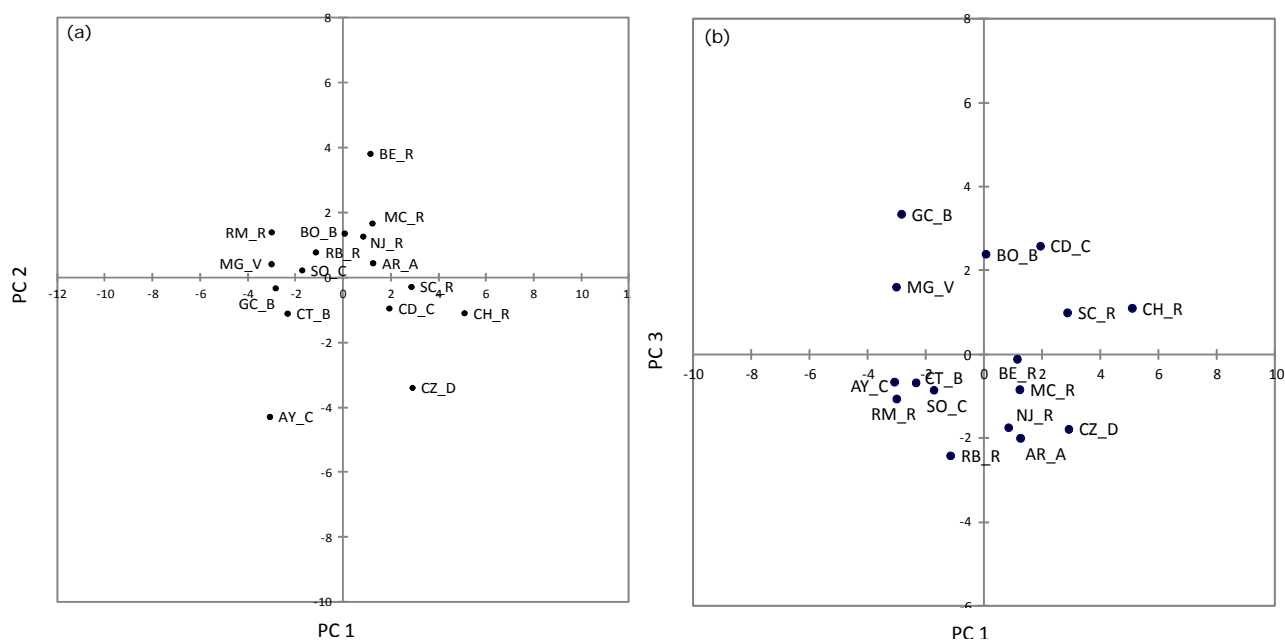


Figura III-6. Proyección de los vinos sobre (a) componentes 1 y 2 y (b) componentes 1 y 3.

La calidad percibida por el grupo de expertos que constituyen el clúster 2 (33% del panel) y el grupo 3 (34% del panel) da lugar a un modelo elíptico significativo ($P < 0.05$ en ambos casos). Este modelo se caracteriza por tener un punto anti-ideal (-) y uno ideal (+) de calidad, respectivamente. Esto significa que existe un nivel máximo o mínimo de respuesta química, contrariamente a lo que se observaba en el modelo vectorial: donde “más, es mejor”. Por lo tanto, los expertos pertenecientes al clúster 2 tienen un punto anti-ideal, en los valores negativos de la PC1 (Figura III-5a). Este vino (AY_C) de calidad anti-ideal se caracteriza por tener una alta concentración en azúcares reductores, grado alcohólico, acidez total y éster étilico del ácido gálico y baja en ácidos cutárico, láctico y *t*-aconítico y bajo pH. Además, el anti-ideal se encuentra en el origen en el mapa de los factores PC2 y PC3 (Figura III-5b), lo que indica que este vino tendría características intermedias en los parámetros químicos que caracterizan la PC2 y PC3. Esto significa que el vino de calidad anti-ideal tendría concentraciones medias en acidez volátil, glicerol, PPA, ácido málico, IPTs, ácido caftárico y quercetina-3-*O*-galactósido.

Para el clúster 3 el punto ideal se encuentra cerca de los vinos SO_C y CT_B (Figura III-5 y III-6). Curiosamente, ambos vinos son algunos de los vinos más envejecidos (cosecha 2007). La Tabla III-7 muestra la composición química de estos dos vinos de calidad cercana a la ideal (junto con los valores medios calculados sobre los 16 vinos, así como el máximo y mínimo). Ambos vinos tienen en común que presentan mayor concentración que la media en azúcares reductores y acidez total.

Tabla III-6. Composición química para los vinos más cercanos al punto ideal para el clúster 3 (SO_C y CT_B), así como, el máximo, la media y mínimo del conjunto de vinos de estudio.

| | CT_B07 | SO_C07 | máx | media | min |
|---|-------------|-------------|------|-------------|------|
| azúcares reductores (g L ⁻¹) | 4,34 | 3,81 | 4,35 | 2,65 | 1,52 |
| glicerol (g L ⁻¹) | 6,53 | 6,83 | 7,58 | 6,70 | 5,03 |
| grado alcohólico (% v/v) | 13,9 | 13,8 | 15,2 | 14,1 | 13,4 |
| pH | 3,47 | 3,53 | 3,88 | 3,61 | 3,43 |
| acidez total (g L ⁻¹) | 5,66 | 5,66 | 6,14 | 5,33 | 4,45 |
| acidez volátil (g L ⁻¹) | 0,51 | 0,75 | 0,75 | 0,54 | 0,25 |
| ácido málico (g L ⁻¹) | 0,30 | 0,18 | 0,35 | 0,23 | 0,17 |
| ácido láctico (g L ⁻¹) | 0,75 | 1,21 | 3,30 | 1,65 | 0,68 |
| IPTs (Abs) | 59,1 | 54,9 | 83,3 | 60,4 | 45,4 |
| TPAs (g L ⁻¹) | 304 | 162 | 723 | 308 | 161 |
| procianidina B1 (mg L ⁻¹) | 21,4 | 22,1 | 36,7 | 26,6 | 16,5 |
| ácido caftárico (mg L ⁻¹) | 126 | 70,8 | 148 | 82,2 | 42,6 |
| ácido cutárico (mg L ⁻¹) | 15,2 | 16,4 | 44,3 | 18,9 | 5,7 |
| Quercetin-3-O-galactósido (mg L ⁻¹) | 0,20 | 0,11 | 0,51 | 0,24 | 0,02 |

Por el contrario, estos vinos tienen valores menores que la media para grado alcohólico, pH, ácido láctico, IPTs, PPA, Procianidina B1, ácido cutárico y quercetin-3-O-galactósido.

4. CONCLUSIONES

Los resultados muestran que el panel de expertos que ha llevado a cabo este estudio tiene conceptos de calidad heterogéneos cuando evalúan exclusivamente la calidad en boca con pinza en la nariz. La segmentación de los expertos mediante el análisis clúster seguido de la construcción de mapas de calidad externa se presenta como una herramienta poderosa capaz de revelar los principales responsables químicos relacionados con la calidad.

En el estudio, se obtienen tres clústers de expertos que responden a diferentes criterios de calidad en boca. Curiosamente, los expertos se caracterizan mejor con un ajuste de un modelo elíptico (71% del panel) que con un modelo de ajuste vectorial (29% del panel). Los modelos elípticos significativos obtenidos para la mayoría de los expertos (dos grupos de tres) sugieren que existe un nivel máximo o mínimo de respuesta química, más que “cuanto más mejor” sugerido por el modelo vectorial utilizado tradicionalmente. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que las técnicas de mapas de calidad se utilizan para evaluar la percepción de calidad de los vinos por un panel de expertos, y se presenta como una herramienta estadística prometedora, capaz de combinar ambas disciplinas, sensorial y química.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Charters, S., & Pettigrew, S. (2006) Product involvement and the evaluation of wine quality. *Qualitative Market Research*, 9, 181-193.
- [2] Sáenz-Navajas, M. P., Ballester, J., Peyron, D., Valentin, D. (2014). Extrinsic attributes responsible for red wine quality perception: A cross-cultural study between France and Spain. *Food Quality and Preference*, 35, 70-85.
- [3] Ballester, J., Patris, B., Symoneaux, R., & Valentin, D. (2008) Conceptual vs. perceptual wine spaces: Does expertise matter? *Food Quality and Preference*, 19, 267-276.
- [4] Sáenz-Navajas, M. P., Ballester, J., Pêcher, C., Peyron, D., Valentin, D. (2013). Sensory drivers of intrinsic quality of red wines. Effect of culture and level of expertise. *Food Research International*, 54, 1506-1518.
- [5] Urdapilleta, I., Parr, W. V., Dacremont, C., & Green, J. (2011) Semantic and perceptive organisation of Sauvignon blanc wine characteristics Influence of expertise. *Food Quality and Preference*, 22, 119-128.
- [6] Parr, W. V., Mouret, M., Blackmore, S., Pelquest-Hunt, T., & Urdapilleta, I. (2011) Representation of complexity in wine: Influence of expertise. *Food Quality and Preference*, 22, 647-660.
- [7] Lattey, K. A., Bramley, B. R., & Francis, I. L. (2010) Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16, 189-202.
- [8] Aurifeille, J. M., Quester, P. G., Lockshin, L., & Spawton, T. (2002) Global vs international involvement-based segmentation - A cross-national exploratory study. *International Marketing Review*, 19, 369-386.
- [9] Sáenz-Navajas, M. P., Fernández-Zurbano, P., Martín-López, C., & Ferreira, V. (2011) Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 9-19.
- [10] Varela, P., & Gambaro, A. (2006) Sensory descriptive analysis of Uruguayan Tannat wine: Correlation to quality assessment. *Journal of Sensory Studies*, 21, 203-217.
- [11] Gawel, R., & Godden, P. W. (2008) Evaluation of the consistency of wine quality assessments from expert wine tasters. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14, 1-8.
- [12] Scaman, C. H., Dou, J., Cliff, M. A., Yuksel, D., & King, M. C. (2001) Evaluation of wine competition judge performance using principal component similarity analysis. *Journal of Sensory Studies*, 16, 287-300.
- [13] Marin, A. B., & Durham, C. A. (2007) Effects of wine bottle closure type on consumer purchase intent and price expectation. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 192-201.
- [14] Marin, A. B., Jorgensen, E. M., Kennedy, J. A., & Ferrier, J. (2007) Effects of bottle closure type on consumer perceptions of wine quality. *American Journal of Enology and Viticulture*, 58, 182-191.

- [15] Sáenz-Navajas, M. P., Gonzalez-Hernandez, M., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., & Ferreira, V. (2012) Orthonasal aroma characteristics of Spanish red wines from different price categories and their relationship to expert quality judgements. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18, 268-279.
- [16] Machado, B., Graça, A., Hirson, G., & Heymann, H. (2011) Revealing the secret preferences for top-rated dry red wines through sensometrics. 16th International Oenology Symposium, Bolzano, Italy, 145-149.
- [17] Ferreira, V., San Juan, F., Escudero, A., Cullere, L., Fernandez-Zurbano, P., Sáenz-Navajas, M. P., & Cacho, J. (2009) Modeling Quality of Premium Spanish Red Wines from Gas Chromatography-Olfactometry Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7490-7498.
- [18] Sáenz-Navajas, M. P., Echavarri, F., Ferreira, V., & Fernandez-Zurbano, P. (2011) Pigment composition and color parameters of commercial Spanish red wine samples: linkage to quality perception. *European Food Research and Technology*, 232, 877-887.
- [19] Schlich, P. (1995) Preference mapping: Relating consumer preferences to sensory or instrumental measurements. In *Bioflavour 95: Analysis - Precursor Studies - Biotechnology*, Etievant, P., Schreier, P., Eds. 1995, pp 135-150.
- [20] Schlich, P., & Mcewan, J. A. (1992) Preference Mapping a Statistical Tool for the Food-Industry. *Science Alimentaire*, 12, 339-355.
- [21] Delgado, C., & Guinard, J. X. (2011) How do consumer hedonic ratings for extra virgin olive oil relate to quality ratings by experts and descriptive analysis ratings? *Food Quality and Preference*, 22, 213-225.
- [22] Chambers, E., & Koppel, K. (2013) Associations of volatile compounds with sensory aroma and flavor: The Complex Nature of Flavor. *Molecules*, 18, 4887-4905.
- [23] Ribéreau-Gayon, P. (1970) Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique*, 52, 627-631.
- [24] AOAC, Method 993.05: L-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice. In *Official Methods of Analysis*, 2002.
- [25] Sáenz-Navajas, M. P., Fernandez-Zurbano, P., Tao, Y. S., Dizy, M., & Ferreira, V. (2010) Relationship between Nonvolatile Composition and Sensory Properties of Premium Spanish Red Wines and Their Correlation to Quality Perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12407-12416.
- [26] Sun, B. S., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267-4274.
- [27] Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., Rozes, N., Arola, L., & Zamora, F. (2004) New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 742-746.
- [28] Colonna, A. E., Adams, D. O., & Noble, A. C. (2004) 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.
- [29] Sáenz-Navajas, M. P., Fernández-Zurbano, P., & Ferreira, V. (2012) Contribution of Nonvolatile Composition to Wine Flavor. *Food Reviews International*, 28, 389-411.

- [30] Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008) Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9190-9199.
- [31] Biasoto, A. C. T., Catharino, R. R., Sanvido, G. B., Eberlin, M. N., & da Silva, M. A. A. P. (2010) Flavour characterization of red wines by descriptive analysis and ESI mass spectrometry. *Food Quality and Preference*, 21, 755-762.
- [32] Saenz-Navajas, M. P., Ferreira, V., Dizey, M., & Fernandez-Zurbano, P., (2010) Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 673, 151-159.
- [33] Sáenz-Navajas, M. P., Ferreira, V., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., & Valentin, D. (2010) An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry*, 121, 1139-1149.
- [34] Whiting, G. C. (1976) Organic-acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages - Review. *Journal of the Institute of Brewing*, 82, 84-92.
- [35] Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.-L., & Glories, Y. (2008) Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, 19, 286-291.
- [36] Noble, A. C. (1994) Bitterness in wine. *Physiology & Behavior*, 56, 1251-1255.
- [37] Sáenz-Navajas, M. P., Avizcuri, J. M., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2012) Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chemistry*, 134, 1484-1493.
- [38] Fischer, U., Boulton, R. B., & Noble, A. C. (1994) Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationships between saliva flow rate and temporal perception or gustatory stimuli. *Food Quality and Preference*, 5, 55-64.
- [39] Kim, U. K., & Drayna, D. (2005) Genetics of individual differences in bitter taste perception: lessons from the PTC gene. *Clinical Genetics*, 67, 275-280.
- [40] Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008) Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1376-1386.
- [41] Warmke, R., Belitz, H. D., & Grosch, W. (1996) Evaluation of taste compounds of Swiss cheese (Emmentaler). *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 203, 230-235.
- [42] Scharbert, S., Holzmann, N., & Hofmann, T. (2004) Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3498-3508.
- [43] Dadic, M., & Belleau, G. (1973) Polyphenols and beer flavor. *Proceeding of the American Society of Brewing Chemistry*, 4, 107-114.
- [44] Okamura, S., & Watanabe, M. (1981) Determination of phenolic cinnamates in white wine and their effect on wine quality. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 2063-2070.

Sección III

Estudio de la evolución sensorial y de la composición no volátil del vino tinto durante el envejecimiento en botella. Efecto de la concentración inicial de oxígeno.



SECCIÓN III. PRESENTACIÓN Y DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

1. INTRODUCCION

El vino es una bebida enormemente compleja tanto en su composición como en las respuestas sensoriales que produce [1, 2], las cuales cambian hasta que el vino es consumido. Casi resulta un tópico expresar que el vino es un ser vivo, si bien esta afirmación no es cierta desde el punto de vista biológico, si puede servir como analogía para expresar que el vino es un producto que, va a ir cambiando a lo largo del tiempo. Durante la “vida” de un vino existen varias operaciones y etapas encaminadas a mejorar las características de los vinos: trasiegos, clarificaciones, envejecimiento en barrica, coupages, envejecimiento en botella,... En general, es posible actuar y controlar casi todas estas operaciones y etapas, sin embargo, el envejecimiento en botella hoy en día aun resulta difícil de controlar y predecir sus efectos, ya que el enólogo, no dispone de herramientas objetivas que le permitan predecir la evolución de las propiedades sensoriales de los vinos embotellados. La mayor parte de las decisiones con respecto al envejecimiento están basadas en la tradición y experiencia, sin tener una base científica suficiente. No obstante, esta última etapa de conservación resulta crítica en el control de la calidad del vino [3]. En esta línea, los profesionales del vino consideran que vinos con alta intensidad de color, de mayor astringencia y mayor concentración de antocianos y polifenoles son los más adecuados para el envejecimiento [4].

La evolución de las propiedades sensoriales del vino durante el envejecimiento en botella ha demostrado ser dependiente de diferentes condiciones de conservación como el tiempo de envejecimiento [5], la temperatura [6], humedad [5], exposición del vino al oxígeno [7], así como factores intrínsecos al vino tales como la concentración de polifenoles [8].

La temperatura es uno de los parámetros que durante el almacenamiento desempeña un papel importante en la cinética de las reacciones de oxidación del vino [8] ya que la temperatura resulta ser muy significativa en la aceleración del envejecimiento de los vinos [9, 10]. Por otra parte, el tiempo de envejecimiento del vino, también resulta de vital importancia ya que tiempos más largos de envejecimiento conllevan mayores evoluciones y mayores cambios. Sin embargo, en ambos casos este efecto se puede ver ralentizado por una mayor concentración inicial de polifenoles, ya que ha sido demostrado que contenidos más altos en material polifenólico, antioxidantes del vino, hacen ralentizar estos procesos [8, 11]. Finalmente, la gestión del oxígeno

durante el envejecimiento en botella es otro factor que influye en el desarrollo de las propiedades químicas y sensoriales del vino. La disolución de oxígeno en un vino embotellado es generalmente muy baja y puede variar mucho dependiendo del tipo de cierre utilizado. Las diferencias entre un corcho u otro en cuanto a la permeabilidad al oxígeno es la fuente principal de las variaciones de una botella a otra. Diversos ensayos con cierres de corcho, cierres sintéticos o tapones de rosca han demostrado que tienen lugar cambios sensoriales y químicos durante el envejecimiento del vino y que están influenciados por el tipo de tapón, los cuales presentan diferencias en la velocidad o tasa de transferencia de oxígeno (OTR) [5, 11]. Así, la llegada al mercado de tapones alternativos a los tradicionales de corcho ha abierto la puerta a la posibilidad de gestionar las distintas demandas de oxígeno de los vinos a través de los cierres, mediante la selección específica de tapones con una OTR óptima.

Aunque estudios sobre el envejecimiento en botella del vino anotan: cambios en el color amarillo (absorbancia a 420 nm) y la tonalidad [5, 6], disminución en el contenido de polifenoles [11], disminución en los aromas a fruta fresca [12], disminución en la astringencia [11, 13], así como un aumento en el sabor amargo. [11], son pocos los trabajos que se han centrado en el estudio de la influencia de la exposición al oxígeno en la evolución sensorial de los vinos embotellados. Existen algunas publicaciones que se centran en la evolución del aroma [14, 15, 16], sin embargo, apenas un par de ellos estudian la evolución de los atributos en boca durante el envejecimiento en botella [18, 19]. Los resultados de los últimos trabajos al respecto [18, 19] mostraron que estos atributos no se ven afectados por las diferentes OTRs aplicadas, aunque parece que su efecto parece ganar importancia tras 10 meses de envejecimiento.

En cuanto a los cambios en la composición química debido al efecto del oxígeno, los pocos trabajos existentes al respecto hablan de un aumento de los tonos amarillos y de la intensidad de color con OTRs más altas [16, 18, 20], relacionado con una mayor pérdida de anhídrido sulfuroso, tanto libre como combinado [16, 18, 19, 20]. Este aumento en la intensidad de color también ha sido relacionado con una mayor formación de pigmentos poliméricos. Por otro lado, parece que a OTRs más altas existe una mayor degradación de antocianos libres y acilados y paralelamente una mayor formación de piranoantocianos [16, 20]. Sin embargo, el efecto sobre los demás compuestos polifenólicos no está claro, parece existir un aumento en la concentración de proantocianidinas precipitables con proteína que no se traduce en cambios sensoriales [19] y no existe un efecto claro sobre la concentración de proantocianidinas totales [19,

20]. Igualmente, OTRs mayores producen una mayor pérdida de polifenoles de bajo peso molecular, sobre todo flavonoles [20]. A pesar de estos trabajos, se sigue sabiendo muy poco acerca de la implicación de los cambios químicos en la modificación de las características sensoriales percibidas en los vinos durante su estancia en botella y mucho menos del efecto que tiene el oxígeno. Todos estos fenómenos observados y estudiados son de un gran interés porque sin duda definen las características químicas y sensoriales de los vinos así como su evolución y comportamiento. Para la industria del vino, sería muy importante contar con este tipo de conocimiento, ya que permitiría a las bodegas dirigirse a diferentes segmentos del mercado en función de los gustos y preferencias que estos tengan, sabiendo de antemano como van modularse los distintos atributos sensoriales durante el tiempo que el vino permanece en botella. [21]. Igualmente sería factible informar al consumidor sobre el momento óptimo de consumo del vino, es decir, poder conocer el momento de la máxima expresión de sus propiedades sensoriales.

Es por todo ello, que en esta sección de la memoria, se presenta la implicación de la exposición del vino al oxígeno durante su permanencia en botella relacionando los distintos cambios químicos producidos, principalmente sobre el material polifenólico, con los distintos cambios sensoriales observados, así como la composición inicial de los vinos. Para ello, se procedió a la evaluación sensorial y química de un conjunto de 16 vinos de distinta variedad, región, añada, tipo de vino y carga polifenólica, antes y después de un periodo de envejecimiento con concentraciones de oxígeno diferentes.

2. OBJETIVOS GENERALES

El interés de los tres capítulos presentados en esta sección se articula en torno a los siguientes objetivos genéricos y bajo la hipótesis de que es posible, mediante el conocimiento del contenido del vino en odorantes, precursores, material polifenólico y de las cinéticas de formación y degradación de los distintos componentes en distintas condiciones de envejecimiento, determinar cuál va a ser la evolución de las propiedades sensoriales de un vino. Y por lo tanto que es posible seleccionar aquellas condiciones de envejecimiento en las que se va a obtener el mejor perfil sensorial en un tiempo dado para un determinado vino:

- Determinar la evolución gustativa de distintos vinos tintos sometidos a un envejecimiento con distintas concentraciones de oxígeno.
- Conocer la evolución química de distintos vinos tintos sometidos a un envejecimiento con distintas concentraciones de oxígeno.
- Relacionar la evolución sensorial y química de los vinos almacenados en botella con diferentes dosis de oxígeno con las características sensoriales y químicas de los vinos iniciales.
- Relacionar los cambios gustativos con la variación de la composición química analizada y del color a partir de una composición química dada y unas determinadas condiciones de envejecimiento.

3. DESCRIPCIÓN DEL ENSAYO

3.1. Selección de los vinos.

El estudio se ha llevado a cabo con 16 vinos tintos españoles comerciales (jóvenes, crianzas y reservas) de seis denominaciones de origen diferentes: D.O.Ca. Rioja (7 muestras), D.O. Campo de Borja (3 muestras), D.O. Cariñena (3 muestras), D.O. Ribera del Duero (1 muestra), D.O. Arlanza (1 muestra) y D.O. Dominio de Valdepusa (1 muestra), elaborados con distintas variedades, distintos procesos de elaboración y diferentes formas y tiempos de envejecimiento. La lista detalla de los mismos así como los parámetros enológicos convencionales se muestran en la Tabla P-1. Los vinos fueron seleccionados para cubrir un amplio rango de IPT e intensidad de color (matriz no volátil suficientemente diferente para inducir diferencias entre ellos)

3.2. Elección de las dosis de O₂.

Las cantidades de oxígeno empleadas en el ensayo fueron escogidas en función de una exhaustiva revisión bibliográfica de trabajos en los cuales se evalúa la distinta permeabilidad que presentan ciertos sistemas de cierre utilizados en los vinos embotellados comerciales. En la Tabla P-2 se muestra el tipo de cierre, la permeabilidad que presenta dicho cierre, el tiempo durante el cual fue medida esta permeabilidad así como la referencia de donde ha sido obtenida la información.

Tabla P-2. Niveles de permeabilidad de oxígeno para sistemas de cierre reales, tiempo durante el cual se testo la permeabilidad y referencia de donde se ha obtenido.

| | OTR μL O ₂ /tapón / día | Tiempo | Referencia |
|----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------|------------|
| Tapón a rosca "ROTE" | 1.25 | Por encima de 22 meses | [23] |
| Tapón a rosca "ROTE" | 0.53 | Tras 36 meses de embotellado | [24] |
| Corcho técnico "Altec" | 1.07 | Tras 36 meses de embotellado | [24] |
| Corchó técnico | 0.19 ± 0.37 | De 2 a 12 meses | [25] |
| Corcho técnico | 1.87 ± 0.37 | De 2 a 12 meses | [25] |
| Corcho técnico "Twin top" | 0.37 ± 0.19 | De 2 a 12 meses | [25] |
| Corcho técnico | 0.10 – 0.97 | De 2 a 14 meses | [26] |
| Corcho natural | 4.50 – 9.38 | De 2 a 12 meses | [25] |
| Corcho natural | 0.10 – 2.90 | A los 24 meses | [26] |
| Corcho natural | 1.79 | Por encima de 22 meses | [23] |
| Corcho natural | 19.19 | Tras 36 meses de embotellado | [24] |
| "Supremecorq" sintético | 28.16 ± 6.40 | De 2 a 12 meses | [25] |
| "Supremecorq" sintético | 12.22 – 13.08 | De 2 a 24 meses | [26] |
| "Nomacorc" sintético | 15.96 ± 4.70 | De 2 a 12 meses | [25] |
| "Nomacorc" sintético | 8.37 – 9.65 | De 2 a 24 meses | [26] |
| Sintético (sin diafragma) | 32.17 – 40.75 | | [22] |
| Sintético (con doble) diafragma) | 16.09 – 18.23 | | [22] |

Estos estudios ayudaron a seleccionar la dosificación de oxígeno que se muestra en la Tabla P-3. Se presentan las distintas dosis de oxígeno suministradas en el estudio así como su correspondencia con la permeabilidad de los distintos sistemas de cierre reales utilizados para el embotellado de los vinos.

Tabla P-3. Dosis de oxígeno suministrado y equivalencia con la permeabilidad de sistemas de cierre reales.

| Nivel de O ₂ | μL O ₂ /día (en 750 mL) | mg L ⁻¹ /día | μL O ₂ total 6 meses (en 750 mL) | Permeabilidad del tapón |
|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------|---|----------------------------|
| Dosis 0 | 0 | 0 | 0 | |
| Dosis 1 | 3 | 1.1 | 536 | Buen corcho natural |
| Dosis 2 | 9 | 3.1 | 1607 | Tapón sintético aceptable |
| Dosis 3 | 30 | 10.6 | 5357 | Tapón sintético malo |
| Dosis 4 | 90 | 30.44 | 16071 | Pésimo corcho natural |

La "dosis 0" se utilizó como dosis control, tanto para estudiar el efecto que el oxígeno podía provocar en las muestras (comparación "dosis 0" con el resto de dosis aplicadas), como para evaluar el efecto que provoca el almacenamiento de las muestras a 25° C durante 6 meses en ausencia de oxígeno (comparación "dosis 0" con los vinos en el momento inicial). El nombre abreviado (código) que aparece en la Tabla P-1 hace referencia al nombre del vino, denominación y a la dosis de oxígeno aplicada. Este nombre será utilizado a lo largo de todos los capítulos de esta sección.

3.3. Llenado de los vinos y dosificación de O₂.

El llenado y dosificación de oxígeno se realizó en una cámara con atmósfera modificada Jamotex mod. P (BOX) (Dagneux, Francia), utilizando argón como gas inerte. Este sistema asegura una sobrepresión de trabajo con atmósfera controlada de menos de un 1 ppm de oxígeno.

Se llenaron siete muestras de cada tipo de vino en botellas de 1000 ml de color ámbar SURE/SEAL™ Z40628-7 suministrados por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), excepto en uno de los vinos en el que solo se llenaron 5 botellas. Cinco de estas botellas correspondían a muestras con diferentes dosis de oxígeno y dos de ellas se utilizaron como réplicas, las cuales posteriormente se emplearían en las pruebas triangulares, tal como se describe en el apartado 3.4. Las botellas se llenaron tras la agitación del vino para eliminar el posible oxígeno residual que pudieran contener y se cerraron mediante un septón de silicona y con cierre de chapa tipo "cerveza". La eliminación del oxígeno residual se comprobó mediante la medida del oxígeno disuelto

Tabla P-1. Características de los vinos incluyendo origen, añada, variedad, tiempo de envejecimiento en barrica, pH, acidez volátil (AV), acidez total (ATT), azúcares reductores (AR), ácido láctico, grado alcohólico (GA°), alcohol, índice de polifenoles totales (IPT), intensidad de color (IC) y tonalidad (T).

| Vino | Código | Denominación de origen | Cosecha | Variedad | Meses en barrica | pH | AV (g L ⁻¹) | ATT (g L ⁻¹) | AR (g L ⁻¹) | Ácido láctico (g L ⁻¹) | GA° (v/v) | IPT (UA) | IC (UA) | T |
|---------------------------|--------|---------------------------|---------|--|------------------|------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------------------|-----------|----------|---------|------|
| Martínez Lacuesta | MC_R09 | D.O.Ca. Rioja | 2009 | Tempranillo, Graciano y Mazuelo | 12 | 3.64 | 0.52 | 4.92 | 2.09 | 2.21 | 13.7 | 52.3 | 8.8 | 0.80 |
| Beturia | BE_R10 | D.O.Ca. Rioja | 2010 | Tempranillo y Garnacha | 0 | 3.61 | 0.25 | 5.09 | 1.52 | 2.17 | 13.9 | 45.4 | 8.0 | 0.71 |
| Rioja B | RB_R06 | D.O.Ca. Rioja | 2006 | Tempranillo y Garnacha | 18 | 3.49 | 0.57 | 5.37 | 2.23 | 1.54 | 14.3 | 49.4 | 8.6 | 0.92 |
| Chirimiendo | CH_R10 | D.O.Ca. Rioja | 2010 | 90% Tempranillo y 10% Viura | 0 | 3.88 | 0.62 | 4.45 | 1.77 | 3.66 | 14.0 | 60.3 | 13.2 | 0.77 |
| San Cebrin | SC_R10 | D.O.Ca. Rioja | 2010 | Tempranillo y Garnacha | 0 | 3.72 | 0.48 | 4.84 | 2.32 | 2.54 | 13.3 | 57.8 | 11.0 | 0.69 |
| Real de Nájera | RN_R09 | D.O.Ca. Rioja | 2009 | Tempranillo y Garnacha | 18 | 3.65 | 0.66 | 5.35 | 1.67 | 2.39 | 13.6 | 49.6 | 7.7 | 0.82 |
| Arianza | AR_A08 | D.O. Arlanza | 2008 | Tempranillo | 12 | 3.73 | 0.63 | 5.57 | 1.98 | 3.28 | 13.5 | 53.0 | 8.7 | 0.79 |
| Río Madre | RM_R10 | D.O.Ca. Rioja | 2010 | Graciano | 8 | 3.57 | 0.41 | 5.80 | 2.31 | 1.17 | 14.7 | 66.4 | 18.7 | 0.71 |
| Garnacha Centenaria | GC_B10 | D.O. Campo de Borja | 2010 | Garnacha | 4 | 3.43 | 0.42 | 6.14 | 3.61 | 1.03 | 14.7 | 71.4 | 14.0 | 0.64 |
| Marqués de Griñón | MG_V05 | D.O. Dominio de Valdepeña | 2005 | Cabernet Sauvignon | 12 | 3.65 | 0.56 | 4.91 | 4.35 | 0.87 | 15.2 | 83.3 | 19.2 | 0.79 |
| Señorio de la Obra | SO_C07 | D.O. Cariñena | 2007 | Garnacha, Tempranillo y Cabernet Sauvignon | 18 | 3.53 | 0.75 | 5.66 | 3.81 | 1.82 | 13.7 | 54.8 | 7.2 | 0.85 |
| Ayles | AY_C05 | D.O. Cariñena | 2005 | Merlot, Tempranillo y Cabernet Sauvignon | 10 | 3.52 | 0.69 | 5.86 | 3.39 | 0.15 | 14.3 | 74.3 | 10.7 | 0.94 |
| Castillo Ducau | CD_C10 | D.O. Cariñena | 2010 | Garnacha, Tempranillo y Cabernet Sauvignon | 0 | 3.63 | 0.53 | 5.30 | 2.57 | 1.62 | 13.5 | 66.4 | 14.8 | 0.66 |
| Coto de Hayas | CT_B07 | D.O. Campo de Borja | 2007 | Garnacha | 15 | 3.47 | 0.51 | 5.66 | 4.34 | 0.89 | 13.8 | 59.0 | 9.1 | 0.77 |
| Borsao Selección Especial | BO_B10 | D.O. Campo de Borja | 2010 | 70% Garnacha, 20% Syrah, 10% Tempranillo | 0 | 3.66 | 0.47 | 5.04 | 2.68 | 1.28 | 14.7 | 61.0 | 12.4 | 0.66 |
| Condado de Haza | CZ_D08 | D.O. Ribera del Duero | 2008 | Tempranillo | 18 | 3.65 | 0.57 | 5.33 | 1.71 | 2.46 | 13.3 | 62.0 | 9.6 | 0.76 |

ATT: Expresada en g L⁻¹ de ácido tartárico; AV: expresada en g L⁻¹ de ácido acético

con un sensor óptico de oxígeno METTLER TOLEDO Seven Go Pro dissolved oxygen SG9 (L´Hospitalet de Llobregat, España). Una vez cerradas las botellas se dosificaron las 5 dosis de oxígeno diferentes para provocar diferentes consumos de oxígeno. La dosificación de oxígeno se realizó manteniendo los frascos boca abajo para forzar al oxígeno a pasar a través del vino y que se disuelva en él. Las dosis se aplicaron con jeringas para gases de la serie Hamilton suministradas por Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), esto permite disponer del mismo vino con diferentes niveles de oxígeno.

Una vez dosificado el oxígeno los botes se cierran con un cierre de rosca adicional que contaba con otro septum de silicona. Por último, las ciento diez botellas resultantes fueron doblemente envasadas al vacío con la envasadora a vacío doméstica GARHE FS300 en bolsas de plástico Polyskin X de poliéster y polipropileno suministradas por la casa Amcor (Granollers, Barcelona) con permeabilidad al oxígeno conocida y se almacenaron durante 6 meses a 25 °C.

El llenado de las botellas se realizó de manera escalonada durante 5 semanas con el objetivo de realizar la evaluación sensorial de los vinos al final del experimento con vinos que tuviesen exactamente el mismo periodo de envejecimiento. El hecho de que en uno de los vinos solo llenaran cinco botes fue debido a que en el momento en el que se procedió al llenado de los dos primeros botes (réplicas para los triangulares) el vino en cuestión no había sido suministrado todavía.

3.4. Test triangular. Selección de muestras con diferencias sensoriales.

3.4.1. Objetivo y procedimiento de la prueba triangular.

El objetivo del análisis triangular fue detectar y seleccionar exclusivamente aquellas muestras en las que la dosis de oxígeno había generado diferencias sensoriales, así como reducir el número de muestras que el panel tenía que evaluar (80 al final del experimento). Las pruebas triangulares se realizaron entre las dosis 1 y 3 (1.1 mg L^{-1} y 10.6 mg L^{-1}).

Estas pruebas permiten saber si existen o no diferencias entre dos muestras, sin embargo no aportan información para expresar o describir sensaciones. En las pruebas triangulares se presentan tres muestras, una de ellas diferentes, y se pregunta cuál es la diferente (probabilidad de acertar al azar $1/3$) [27]. Las pruebas triangulares se han utilizado mucho en la industria alimentaria ya que se presenta como la prueba más fiable debido a su mayor poder estadístico respecto al dúo-trío. El uso de este método es

particularmente útil en situaciones donde los efectos de un tratamiento no pueden ser caracterizados simplemente por uno o dos atributos [28]. La evaluación mediante este tipo de pruebas no requiere un periodo de entrenamiento previo, únicamente que los jueces estén familiarizados con el tipo de muestras, vino en este caso.

Por ello, 40 estudiantes de enología de la Universidad de la Rioja evaluaron en una única sesión entre 6 y 7 triadas de muestras en 2 grupos de 20 personas. En cada una de las triadas se les presentaron las tres copas de vino (dos contenían la misma muestra). Los vinos fueron servidos 30 minutos antes de la sesión en copas negra de tipo tulipa (15 mL, 20° C) codificadas por un número de tres cifras y cubiertas por una placa Petri. Los jueces realizaron la evaluación en cabinas individuales y a cada uno de ellos se le presentaron las muestras en un orden diferente con el fin de minimizar sesgos como resultado del orden de presentación [29]. A los participantes se les pidió que seleccionaran de manera forzosa (prueba triangular de elección forzada) la muestra que para ellos fuese sensorialmente diferente, para ello podían oler y probar las muestras. Además, se les pidió que indicaran la característica por la cual o las cuales encontraban que el vino seleccionado era diferente. El protocolo utilizado se muestra en el Anexo IX.

Entre triada y triada (tras cada test triangular) se impuso una pausa de 2 minutos durante la que los jueces debían enjuagarse según el protocolo de enjuague descrito en el capítulo I de la sección II de esta tesis [31] (ver ANEXO III). Finalizada la prueba, se contabilizaron las respuestas correctas y se compararon con los valores tabulados para evaluar la presencia de diferencias sensorialmente significativas entre las muestras [32].

3.4.2. Resultados de la prueba triangular.

En la Tabla P-4, se muestran los resultados obtenidos de las pruebas triangulares. Puede concluirse que a nivel sensorial los jueces fueron capaces de discriminar entre las dosis 1 y 3 de oxígeno en 10 de los 15 vinos, siendo 5 vinos en los que los panelistas no fueron capaces de percibir diferencias significativas. Este hecho, permite asumir que la dosis 2 (intermedia entre las dosis 1 y 3 evaluadas en estas pruebas triangulares) no presenta diferencias sensoriales de las dosis 1 y 3. De acuerdo estos resultados se decidió realizar el análisis químico y sensorial descriptivo solo a una de las 3 muestras, ya que aunque la dosis de oxígeno pueda estar generando diferencias químicas, estas no son suficientes como para inducir cambios sensoriales significativamente diferentes.

En el caso del vino MG_V05, y a la vista de los resultados obtenidos en los demás vinos, se optó por la evaluación de las cinco muestras al igual que en los vinos donde el test había sido significativo.

Tabla P-4. Resultados del test triangular. Significatividad alcanzada, número de respuestas correctas y número de muestras a evaluar en el análisis descriptivo.

| vinos | Sig 90% | Sig 95% | Sig 99% | Sig 99,9% | respuestas | Muestras a evaluar |
|--------|---------|---------|---------|-----------|------------|--------------------|
| MC_R09 | si | si | si | no | 13 | 5 |
| BE_R10 | si | si | si | no | 13 | 5 |
| RB_R06 | no | no | no | no | 8 | 3 |
| CH_R10 | no | no | no | no | 5 | 3 |
| SC_R10 | si | si | si | si | 15 | 5 |
| RN_R09 | si | si | si | si | 15 | 5 |
| AR_A07 | no | no | no | no | 9 | 3 |
| RM_R10 | si | si | no | no | 11 | 5 |
| GC_B10 | no | no | no | no | 9 | 3 |
| SO_C07 | si | si | si | si | 18 | 5 |
| AY_C05 | si | si | si | si | 15 | 5 |
| CD_C10 | si | si | no | no | 12 | 5 |
| CT_B07 | si | no | no | no | 10 | 3 |
| BO_B10 | si | si | si | si | 15 | 5 |
| CZ_D07 | si | si | si | si | 15 | 5 |

4. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Etaio, I., Elortondo, F. J. P., Albisu, M., Gaston, E., & Schilch, P. (2009). Sensory attribute evolution in bottled young red wines from Rioja Alavesa: *European Research and Technology*, 228, 695-705.
- [2] Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., & Waters, E. J. (2008). The influence of interactions between major white components on the aroma flavor and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19, 596-607.
- [3] Fedrizzi, B., Zapparoli, G., Finato, F., Tosi, E., Turri, A., Azzolini, M., & Versini, G. (2011). Model aging and oxidation effects on varietal, fermentative, and sulfur compounds in a dry botrytized red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 1804-1813.
- [4] Jaffré, J., Valentin, D., Dacremont, C., & Peyron, D. (2009). Burgundy red wines: Representation of potencial for aging. *Food Quality and Preference*, 20, 505-513.
- [5] Skouroumounis, G. K., Kwiatkowski, M. J., Francis, I. L., Oakey, H., Capone, D. I., Duncan, B., Sefton, M. A., & Waters, E. J. (2005). The impact of closure type and storage conditions on the composition, colour and flavour properties of a Riesling and a wooded Chardonnay wine during five years' storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 11, 369–377.
- [6] Hopfer, H., Buffon, P. A., Ebeler, S. E., & Heymann, H. (2013). The Combined effects of storage temperature and packaging on the sensory, chemical, and physical properties of a Cabernet Sauvignon wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3320-3334.
- [7] Caille, S., Samson, A., Wirth, J., Dieval, J. B., Vidal, S., & Cheynier, V. (2010). Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling. *Analytica Chimica Acta*, 660, 35-42.
- [8] Czibulya, Z., Kollar, L., Nikfardjam, M. P., & Kunsagi-Mate, S. (2012). The effect of temperature on the color of red wines. *Journal of Food Science*, 77, 880-885.
- [9] Fernandez-Zurbano, P., Ferreira, V., Pena, C., Escudero, A., Serrano, F., & Cacho, J. F. (1995). Prediction of oxidative browning in white wines as a function of their chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2813-2817.
- [10] Dallas, C., Reis, P. H., Ricardo da Silva, J. M., & Laureano, O. (2003). Influence of acetaldehyde, pH, and temperature on transformation of procyanidins in model wine solutions. *American Journal of Enology and Viticulture*. 54, 119-124.
- [11] Gómez Gallego, M. A., Gómez García Carpintero, E., Sánchez Palomo, E., González Viñas, M. A., & Hermosín Gutiérrez, I. (2013). Evolution of the phenolic content, chromatic characteristics and sensory properties during bottle storage of red single-cultivar wines from Castilla La Mancha region. *Food Research International*, 51, 554-563.

- [12] He, J., Zhou, Q., Peck, J., Soles, R., & Qian, M. C. (2013). The effect of wine closures on volatile sulfur and other compounds during post-bottle ageing. *Flavour and Fragrance Journal*, 28, 118-128.
- [13] McRae, J. M., Damberg, R. G., Kassara, S., Parker, M., Jeffery, D. W., Herderich, M. J., & Smith, P. A. (2012). Phenolic compositions of 50 and 30 year sequences of Australian red wines: The impact of wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10093-10102.
- [14] Silva, A., Lambri, M., & De Faveri, M. D. (2003). Evaluation of the performances of synthetic and cork stoppers up to 24 months post-bottling. *European Food Research and Technology*, 216, 529-534.
- [15] Hopfer, H., Buffon, P. A., Ebeler, S. E., & Heymann, H. (2013). The Combined effects of storage temperature and packaging on the sensory, chemical, and physical properties of a Cabernet Sauvignon wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3320-3334.
- [16] Wirth, J., Caillé, S., Souquet, J. M., Samson, A., Dieval, J. B., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2012). Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rosé wines. *Food Chemistry*, 132, 1861-1871.
- [17] Godden, P., Francis, L., Field, J., Gishen, M., Coulter, A., Valente, P., Hoj, P., & Robinson, E. (2001). Wine bottle closures: physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine 1. Performance up to 20 months post-bottling. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 62-105.
- [18] Caille, S., Samson, A., Wirth, J., Dieval, J.-B., Vidal, S., & Cheynier, V. (2010). Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling. *Analytica Chimica Acta*, 660, 35-42.
- [19] Gambuti, A., Rinaldi, A., Ugliano, M., & Moio, L. (2013). Evolution of phenolic compounds and astringency during aging of red wine: effect of oxygen exposure before and after bottling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1618-1627.
- [20] Wirth, J., Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Dieval, J. B., Aagaard, O., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2010). The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines. *Food Chemistry*, 123, 107-116.
- [21] O'Brien, V., Francis, I. L., & Osidacz, P. (2009). Packaging choices affect consumer enjoyment of wines. *Wine Industry Journal*, 24, 48-54.
- [22] Silva, A., Lambri, M., & De Faveri, M. D. (2003). Evaluation of the performances of synthetic and cork stoppers up to 24 months post-bottling. *European Food Research and Technology*, 216, 529-534.
- [23] Godden, P., Lattey, K., Francis, L., Gishen, M., Cowey, G., Holdstock, M., Robienson, E., Waters, E., Skouroumounis, G., Sefton, M. A., Capone, D., Kwiatkowski, M., Field, J., Coulter, A.,

- D´Costa, N., & Bramley, B. (2005). Towards offering wine to the consumer in optimal condition the wine, the closures and other packaging variables: A review of awri research examining the changes that occur in wine after bottling. *The Australian and New Zealand Wine Industry Journal*. 20, 20-30.
- [24] Keenan, C. P., Gozukara, M. Y., Christie, G. B. Y., & Heyes, D. N. (1999). Oxygen permeability of macrocrystalline paraffin wax relevance to wax coatings on natural corks used as wine bottle closures. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 5, 66-70.
- [25] Lopes, P., Saucier, C. & Glories, Y. (2005). Nondestructive colorimetric method to determine the oxygen diffusion rate through closures used in winemaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 6967-6973.
- [26] Lopes, P., Saucier, C., Teissedre, P.L., & Glories, Y. (2006). Impact of storage position on oxygen ingress through different closures into wine bottles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 6741-6746.
- [27] AENOR 1997, Recopilación de Normas UNE. Análisis sensorial, Tomo 1 – Alimentación, prueba triangular, 82-91.
- [28] Meilgaard, M. M., Civille, G. V., & Carr, T. (2007). Overall difference test: does a sensory difference exist between samples? *Sensory Evaluation Techniques*. 4th ed. CRC Press, New York, 63-104.
- [29] Etaio, I., Elortondo, F. J. P., Albisu, M., Gaston, E., Ojeda, M., & Schlich, P. (2008). Development of a quantitative sensory method for the description of young red wines from Rioja Alavesa. *Journal of Sensory Studies*, 23, 631-655.
- [30] Colonna, A.E., Adams, D.O., & Noble, A.C. (2004). Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 26-31.
- [31]. Roessler, E.B., Warren, J., Guymon, J.F. (1948). Significance in triangular taste tests. *Food Research* 13, 503-505.

SECCIÓN III. CAPÍTULO I

Evolución de las propiedades sensoriales de vinos tintos después del embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno.

1. INTRODUCCIÓN

El vino es una bebida muy compleja que evoluciona a lo largo de tiempo tanto desde el punto de vista fisicoquímico, como desde el punto de vista sensorial. En general, los vinos tintos de calidad requieren un período de envejecimiento en barrica y otro en botella antes de alcanzar sus propiedades sensoriales óptimas [1]. En comparación con éstos, los vinos tintos jóvenes se caracterizan por tener una vida útil más corta y su evolución en la botella durante el primer año es muy importante, ya que determina sus propiedades sensoriales y por consiguiente la mayor o menor aceptación del producto por parte del consumidor [2].

La evolución de las propiedades sensoriales del vino durante el envejecimiento en botella ha demostrado ser dependiente de diferentes factores tales como la temperatura [3] o la exposición del vino a diferentes concentraciones de oxígeno [4]. Mientras el vino se encuentra en la bodega, el proceso de conservación en botella está más o menos bajo control, ya que normalmente existe un control de la temperatura, cantidad de luz y humedad del ambiente, así como del tipo de tapón utilizado. Sin embargo, cuando el vino sale de la bodega, el proceso de conservación está fuera de control, tanto durante el transporte, como en el almacenamiento. En un estudio donde se monitorizó la temperatura de exposición del vino a lo largo de una cadena de distribución en EEUU, Buzker y col. [5] concluyeron que estas exposiciones durante el transporte equivalían a un envejecimiento adicional del vino de entre 1 y 18 meses. Esta fluctuación entre vinos en el tiempo de envejecimiento adicional ha sido atribuida a distintos niveles de polifenoles presentes en los vinos. Así, se ha observado que este proceso de envejecimiento puede ver ralentizado con contenidos más altos en dichos compuestos [6]. En esta línea, existen trabajos donde el envejecimiento del vino embotellado a 40 °C evoluciona dando atributos aromáticos como verduras cocida, tostados o frutos secos, en vinos de las variedades en Cabernet Sauvignon [3] y Chardonnay [7] después de seis y tres meses de envejecimiento, respectivamente [3]. Del mismo modo, vinos tintos de las variedades Merlot y Cabernet Sauvignon [8] parecen desarrollar tales descriptores aromáticos incluso después de tres semanas de almacenamiento a 40 °C. Además, la aparición de dichos atributos de oxidación en un vino de Cabernet Sauvignon

[3], da lugar a la disminución en la intensidad de los aromas de fruta fresca, bayas, cereza, cítricos o florales.

Por otra parte, junto con la temperatura y el tiempo de envejecimiento, la disposición de oxígeno durante el envejecimiento en botella es un factor importante capaz de influir en el desarrollo de las propiedades sensoriales del vino. La concentración de oxígeno en la botella se puede ajustar mediante el uso de diferentes dispositivos de cierre o tipos de envases, aunque la fuente más importante de oxígeno es la que se suministra en el proceso de embotellado [9]. El uso de bag-in-box ha demostrado dar lugar a vinos con matices más intensos de verduras cocidas, frutos secos o terrosos y menos intensos en fruta roja, verduras frescas, pimienta negra o matices florales que las botellas de vidrio [3, 7] debido a la mayor permeabilidad al oxígeno de los bag-in-box. No obstante, la mayor parte de los trabajos encaminados a estudiar la evolución de las propiedades sensoriales de los vinos en presencia de diferentes cantidades de oxígeno se ha llevado a cabo utilizando distintos cierres capaces de generar diferentes OTR (tasa de transferencia de oxígeno) en vino blanco [7, 10], rosado [11, 12] o tinto [4, 13, 14]. En los vinos blancos, se observa que los cierres con mayores OTRs son propensos a generar gamas de aromas oxidados, como frutas cocidas, notas tostadas, miel y aromas similares al pegamento [10, 15], mientras que menores OTRs producen un incremento en aromas a cítricos, fruta fresca o aromas reductores como col o sílex/pedernal. En rosados y tintos, mayores OTRs (0.3 vs 9.5 mg L⁻¹ de oxígeno) tienden a generar vinos con una mayor intensidad de color y tonalidad, así como vinos con más aromas a fruta roja o caramelo, pero menos intensidad de las notas animales [4, 12]. Sin embargo, el impacto del oxígeno en las propiedades sensoriales en boca parece ser limitada. Un aumento en la exposición total de oxígeno es capaz de disminuir la astringencia en un vino con bajo contenido de polifenoles, mientras que no se ha observado efecto en un vino con un contenido más elevado de polifenoles, lo que demuestra que el efecto de la exposición al oxígeno depende de la composición del vino [13]. Este hecho pone de manifiesto la importancia del contenido en polifenoles en la evolución de las propiedades sensoriales de los vinos embotellados, y está apoyado por estudios llevados a cabo con disoluciones sintéticas que muestran que ciertos compuestos son capaces de controlar el oxígeno disuelto disponible en fenómenos oxidativos [16].

A pesar de ser conscientes de la importancia tanto de la etapa de envejecimiento en la botella como la composición inicial del vino en la evolución de sus propiedades sensoriales, hasta el momento los estudios que han abordado esta cuestión se han

llevado a cabo con un número limitado de muestras, a menudo con uno [3, 7, 10, 11], dos [12, 13] o a lo sumo cuatro [4] vinos, con una baja variabilidad en la composición inicial de las muestras de vino lo que limita de una manera muy importante la generalización de los resultados y la posibilidad de observar patrones de comportamiento. Por lo tanto, en el presente trabajo se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de la evolución de las propiedades sensoriales (6 meses a 25° C) de un número relativamente grande de vinos tintos con una importante variabilidad en su composición polifenólica, embotellados con distintos niveles iniciales de oxígeno. Los principales objetivos del estudio fueron evaluar las diferencias sensoriales vinculados a: (1) el efecto del tiempo de envejecimiento en condiciones controladas en 16 muestras con diferentes contenidos de polifenoles y (2) el efecto de la presencia de diferentes concentraciones iniciales de oxígeno en la etapa de envejecimiento.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Vinos

Se evaluaron los 16 vinos tintos españoles listados en la Tabla P-1 de la presentación de esta Sección, así como los resultantes del ensayo de envejecimiento (envejecimiento a 25 °C durante 6 meses). En el caso de los vinos en los que no se observaron diferencias significativas en los test triangulares (Tabla P-4), se evaluó exclusivamente una de las dosis intermedias (1, 2, 3).

2.2. Análisis sensorial descriptivo

2.2.1. Entrenamiento del panel.

Un total de 52 voluntarios, entre los que se encontraban estudiantes, miembros del personal de la Universidad de La Rioja y profesionales de diversos sectores, fueron reclutados en base a su motivación y disponibilidad, para asistir a una sesión por semana a lo largo de un periodo de 7 meses. De entre los 52 panelistas se seleccionaron 40 (17 hombres y 23 mujeres de entre 21 y 57 años, con una edad media de 30 años). La selección de panelistas se llevó a cabo en primer lugar descartando aquellos que habían tenido un porcentaje de faltas de asistencia superior al 20% durante los 7 meses, mediante el cálculo del índice de reproducibilidad (R_i) propuesto por Campo y col. [17] tal y como se indica más adelante y observando el acuerdo entre los jueces mediante la agrupación de los mismos en el plano factorial obtenido del PCA (análisis de componentes principales) realizado para cada atributo.

El periodo de entrenamiento comprendió tres fases: una fase de entrenamiento general y otras dos de entrenamiento específico del tipo concreto de producto. Las sesiones de entrenamiento específico se dividieron a su vez en dos. Una de 4 sesiones antes de la evaluación inicial de los vinos y otra de 5 sesiones (a modo de recordatorio) antes de la evaluación de los vinos tras el periodo de envejecimiento. Durante los 6 meses del ensayo los panelistas entrenados participaron en otra serie de ensayos del grupo de investigación, permaneciendo entrenados durante todo el periodo.

Los panelistas, en una primera fase asistieron a 13 sesiones de entrenamiento sensorial (cada sesión tenía una duración aproximada de una hora) durante un periodo de dos meses, durante el cual trabajaron en subgrupos de máximo 10 personas dirigidos por el mismo líder y siguiendo las mismas directrices para evitar diferencias en el entrenamiento entre los distintos subgrupos. Durante el entrenamiento se les

proporcionó una lista con 113 términos aromáticos obtenidos de la bibliografía [17] y se les presentaron estándares de referencia representativos de cada aroma, así como distintos estándares de sabor y astringencia. A lo largo de las sesiones los panelistas fueron eliminando o incluyendo términos de la lista de descriptores iniciales de aroma. La lista definitiva se muestra en el Anexo X. Los estándares fueron o bien odorantes comerciales suministrados por Sentosphère (Paris, Francia), "Le Nez du Vin" (Jean Lenoir, Provence, Francia) y Firmenich (Ginebra, Suiza) o productos naturales (frutas, zumos, especias, verduras, etc.) preparados al comienzo de cada sesión tal y como se indica en el Anexo XI. Para el entrenamiento del sabor y la astringencia, se prepararon disoluciones con distintas concentraciones de azúcar de mesa ($0 - 12 \text{ g L}^{-1}$) para el dulzor, ácido tartárico ($0 - 1.5 \text{ g L}^{-1}$) para la acidez, sulfato de quinina ($0 - 10 \text{ mg L}^{-1}$) para el amargor y sulfato de potasio y aluminio ($0 - 5 \text{ g L}^{-1}$) para la astringencia. Durante el entrenamiento, estas disoluciones ayudaron a los panelistas a reconocer y discriminar entre las diferentes sensaciones orales.

En una sesión típica de entrenamiento general, primeramente los panelistas tuvieron que reconocer con ayuda de la lista anteriormente citada entre 10 y 12 referencias aromáticas. Tras esto, evaluaron de dos a cuatro vinos diferentes y describieron sus propiedades aromáticas eligiendo un máximo de cinco descriptores de la lista. Además, debían ordenar y puntuar de menor a mayor concentración dos series de disoluciones por sesión que contenían concentraciones crecientes de los distintos atributos, dulzor, acidez, amargor y astringencia. Igualmente durante esta fase el panel se acostumbró al uso de una escala de diez puntos (0 = ausencia, 1 = "muy bajo" y 9 = "muy fuerte") para evaluar los atributos. Finalmente, los panelistas debían identificar en los vinos el sabor o sensación predominante. Los vinos seleccionados para esta fase del entrenamiento presentaban atributos aromáticos, de sabor y astringencia fácilmente reconocibles y fueron vinos de diversos orígenes y variedades. Al término de la sesión, se discutieron las propiedades de los vinos, de modo que el líder del panel comparaba los descriptores aromáticos y las sensaciones predominantes dadas a los vinos por los miembros de la sesión. El formato utilizado durante esta fase se muestra en el Anexo XII.

Las 2 fases de entrenamiento específico se articularon en cuatro y cinco sesiones respectivamente, durante las cuales los panelistas se familiarizaron con las muestras del estudio: vinos tintos con diferente nivel de oxidación, tiempo de envejecimiento en botella y concentración polifenólica. Durante esta fase, al igual que en la fase de

entrenamiento general, se les presentaron a los panelistas entre 10 y 12 referencias aromáticas. Paralelamente, durante esta fase el panel se acostumbró al uso de una escala de diez puntos (0 = ausencia, 1 = "muy bajo" y 9 = "muy fuerte") para evaluar los atributos. En el caso de la intensidad aromática e intensidad global la escala se estructuró en 9 puntos (1 = "muy bajo" y 9 = "muy fuerte") al igual que la persistencia (1 = "muy corta" y 9 = "muy larga") ya que para estos atributos el "0" no tiene ningún sentido. A continuación, los panelistas debían describir las propiedades aromáticas de vinos, similares a los del estudio, además de puntuar el dulzor, acidez, amargor, astringencia, persistencia, intensidad global e intensidad aromática en escalas nombradas anteriormente.

En una sesión típica de entrenamiento específico, primeramente los panelistas tuvieron que reconocer con ayuda de la lista anteriormente citada entre 10 y 12 referencias aromáticas. Tras esto, evaluaron de dos a cuatro vinos diferentes y describieron sus propiedades aromáticas eligiendo un máximo de cinco descriptores de la lista además de evaluar la intensidad aromática. Además, debían ordenar y puntuar de menor a mayor concentración dos series de disoluciones por sesión que contenían concentraciones crecientes de los distintos atributos, dulzor, acidez, amargor y astringencia. Finalmente, los panelistas debían describir los vinos en boca con ayuda de las escalas anteriormente citadas. Los vinos seleccionados para esta fase del entrenamiento presentaban atributos aromáticos, de sabor y astringencia similares a los vinos del estudio. Al término de la sesión, se discutieron las propiedades de los vinos, de modo que el líder del panel comparaba los descriptores aromáticos y las puntuaciones dadas a los vinos por los miembros de la sesión. El formato utilizado durante estas sesiones se muestra en el Anexo XIII.

2.2.2. Evaluación de los vinos.

Para los vinos en los que no se observaron diferencias significativas en los test triangulares (Tabla 0-4), se describió exclusivamente una de las dosis intermedias (1, 2, 3). De manera que los panelistas entrenados describieron un total de 86 vinos. Los panelistas entrenados describieron los vinos en cabinas individuales evaluando como máximo 10 vinos por sesión. En ningún momento fueron informados del tipo de muestras que estaban describiendo. Los vinos fueron servidos 30 minutos antes de cada sesión en copas negras de tipo tulipa ISO (1977) (15 mL) codificadas por un número de tres cifras y cubiertas por una placa Petri. Los panelistas siguieron el protocolo que se presenta en el Anexo XIV, de modo que primero tenían que oler orthonasalmente el vino,

anotar la intensidad aromática y seguidamente describir su aroma utilizando la técnica de elección entre atributos, debiendo elegir un máximo de 5 términos de la lista anteriormente citada (Anexo X). A continuación, debían introducirse el vino en la boca y puntuar las intensidades del dulzor, acidez, amargor, astringencia, intensidad global y persistencia de acuerdo a las escalas descritas anteriormente. Entre muestra y muestra los panelistas debían enjuagarse la boca de acuerdo con el protocolo descrito en el capítulo I de la Sección II propuesto por Colonna y col. [18] (ver Anexo III).

2.3. Análisis de datos

2.3.1. Análisis del comportamiento del panel.

Con el fin de evaluar el comportamiento del panel en cuanto a la descripción del aroma, se calculó un índice de reproducibilidad individual (R_i) tal y como propone Campo y col. [17]:

$$R_i = \frac{\sum [2 * des_{com} (des_{rep1} + des_{rep2})]}{n}$$

Donde des_{com} es el número de términos comunes dados por el panelista en las dos réplicas de un mismo vino, des_{rep1} y des_{rep2} son el número de términos dados por el panelista en la primera y segunda repetición respectivamente y n es el número de vinos. Las respuestas de los sujetos que presentaron $R_i < 0.2$ no fueron considerados en el análisis de datos.

Igualmente, con el fin de evaluar el comportamiento del panel en cuanto a los atributos evaluados en boca e intensidad aromática se calculó un PCA (análisis de componentes principales) para cada uno de los atributos. Para ello, se preparó una matriz de contingencia para cada atributo, en la que los jueces (41) se colocaron en columnas y los vinos (82) en filas. A partir de las proyecciones de los jueces en el plano del PCA se evaluó el acuerdo (proyecciones de los jueces agrupadas) o desacuerdo entre los jueces (proyecciones de los jueces dispersas). Para cada atributo, los datos de los jueces que se proyectaron dispersos no fueron considerados en el análisis de datos.

En base a la asistencia continuada de los panelistas (> 80% asistencia), del coeficiente R_i y los PCAs, los datos de 40 panelistas se tuvieron en cuenta en el tratamiento de datos.

2.3.2. Cálculo de la frecuencia de citación (FC) de los descriptores aromáticos y creación de términos combinados.

De acuerdo con Sáenz-Navajas y col. [19], se escogieron los términos individuales que presentaban las FC superiores a la esperada por el azar de acuerdo a la distribución de chi-cuadrado. Así, treinta y cuatro términos (del total de 113) presentaban frecuencias de citación (FC) superiores a las esperadas por el azar. Entre ellos, los términos individuales que pertenecen a la misma categoría sensorial se combinaron con el fin de obtener atributos más globales que alcanzasen FC más altas y rangos más amplios. Finalmente, un total de 10 términos combinados presentaron una distribución significativa de chi-cuadrado: frutas negras, moras), frutas rojas (frutas rojas, fresas, cerezas), frutas pasas (frutas pasas, ciruelas), madera (madera, madera fresca, humo), tostado (pan tostado, café, caramelo), especias (especias, regaliz, pimienta negra, vainilla), verduras (vegetal, verduras, oliva, patata cocida), herbal (tabaco fresco, tomillo, mentol-fresco), animal (animal, cuero) y láctico (láctico, mantequilla).

En el Anexo XV se muestra el cálculo y las distribuciones de los distintos términos combinados.

2.3.3. Análisis multivariante con los datos descriptivos.

DESCRIPCIÓN DEL AROMA

Se creó una tabla de contingencia (los vinos en filas y los descriptores en columnas) con la frecuencia de citación de los términos significativos y se analizó mediante un análisis de correspondencias (AC). Las dimensiones con un valor propio mayor que la media (ley de Kaiser) se seleccionaron para el cálculo del espacio del AC.

El análisis clúster jerárquico (HCA) con el criterio de Ward se calculó finalmente con las coordenadas factoriales de los vinos en los espacios definidos por el AC de los 16 vinos comerciales al inicio del ensayo. Los clústers identificados a partir del diagrama de árbol se consolidaron por agregación en torno a sus centros móviles. Los términos que mejor caracterizaron cada clúster se identificaron mediante el cálculo del parámetro valor test [20]. La significación se obtuvo cuando el valor test fue ≥ 1.96 , lo que corresponde a un límite de error del 5%. La jerarquización de los términos de acuerdo a este criterio proporciona una caracterización rápida de cada clúster [21].

Para estudiar el efecto del envejecimiento global (media de los 16 vinos) y para los vinos pertenecientes a cada clúster (media de los vinos de cada clúster) se realizó la media de las FC de cada atributo antes y después del envejecimiento (media de todas

las dosis de oxígeno). La significación de estas diferencias fue evaluada con ayuda del valor test.

DESCRIPCIÓN DE LOS ATRIBUTOS EVALUADOS EN BOCA

Con el fin de evaluar las diferencias provocadas por el envejecimiento se calculó un ANOVA de dos vías con las medias proporcionadas por los jueces antes y después del envejecimiento (media de todas las dosis de oxígeno) para cada uno de los atributos evaluados en boca (amargor, astringencia, intensidad global y persistencia).

Todos los análisis se realizaron con el programa SPAD versión 5.5 (CISIA CESRESTA, Montreuil , Francia) y el software SPSS, versión 19.0 (Illinois, USA).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Comportamiento del panel entrenado

La reproducibilidad del panel en la descripción del aroma orthonasal se examinó usando la proyección de los vinos presentados por duplicado en un mapa de dos dimensiones obtenido a partir del análisis de correspondencias. En cuanto a la reproducibilidad individual, el valor máximo del índice R_i (que varía de 0 a 1) fue de 0.93, lo que equivale a un 93% de términos comunes entre las dos repeticiones para un sujeto. El valor mínimo fue de 0.20 (media = 0.58). Finalmente, se consideraron las repuestas de todos los jueces, ya que todos ellos presentaban un $R_i > 0.20$, Campo y col. [17].

Por otro lado, el PCA para cada atributo reveló que las proyecciones de los jueces se agrupaban juntas en el plano factorial para los atributos amargor, astringencia, intensidad aromática, intensidad global y persistencia. Estos resultados demuestran que los panelistas interpretaron estos atributos de la misma manera, confirmando la consistencia del panel. Sin embargo, para los atributos dulzor y acidez, los jueces se proyectaron dispersos en el plano factorial, lo que puede indicar dos cosas: (1) que no existen diferencias entre los vinos estudiados para estos atributos, lo que puede resultar lógico para el atributo dulzor ya que se trata de vinos secos todos ellos con menos de 5 g L⁻¹ de azúcares residuales, o (2) que no existe acuerdo entre los jueces en la evaluación de los atributos y que el panel necesitaría un mayor entrenamiento para ambos. Esta opción parece ser la más factible para el atributo acidez, ya que la concentración de acidez total de los vinos oscila desde 4.45 hasta 6.14 g L⁻¹ (expresada en g L⁻¹ de ácido tartárico), lo que debería ser suficiente para inducir diferencias en este atributo. Estas diferencias en la interpretación de los atributos ya han sido descritas y pueden ser debidas a múltiples factores fisiológicos y psicológicos en la percepción del estímulo [22]. En todo caso, se decidió no considerar estos atributos en el análisis de datos posterior.

3.2. Caracterización de los vinos iniciales (antes del envejecimiento)

3.2.1. Atributos aromáticos evaluados ortonasalmente.

De acuerdo con el ANOVA de un factor con medidas repetidas (jueces considerados como repetición) el efecto vino fue significativo para el atributo intensidad aromática ($F = 3.23$; $P < 0.001$). Esto indica que las 16 muestras presentan intensidades aromáticas significativamente diferentes.

En el análisis de correspondencias (AC) realizado sobre las frecuencias de citación de los términos combinados se retuvieron las tres primeras componentes que explican el 77% de la varianza original (ley de Kaiser). La proyección de los vinos y los términos en los planos del AC se observan en las Figuras I-1 (PC1 y PC2) y I-2 (PC1 y PC3). El primer factor, explicó el 34% de la varianza original y está principalmente definido por los atributos verdura (21%), tostado (17%), herbal (16%), madera (12%) y animal (11%). La segunda dimensión, que explica el 29% de la varianza original enfrenta a los atributos frutas rojas (24%) y verdura (19%) a los atributos madera (24%) y tostado (16%). La tercera dimensión, que explica el 14% de la varianza original enfrenta los atributos animal (38%) y herbal (21%) al atributo especias (22%).

El análisis clúster (Figura I-3) reveló que la partición más natural fue la de cuatro clústers con dos grupos de 3 vinos y otros dos de 5 vinos. Para cada clúster, el vino más cercano al centro de gravedad se identificó como el ejemplo más típico de la agrupación y por lo tanto, con sus características sensoriales. Estas muestras son GC_B10 (clúster 1), SO_C07 (clúster 2), BO_B10 (clúster 3) y RB_R06 (clúster 4).

Los términos que mejor caracterizaron los clústers se muestran en la Tabla I-1.

Tabla I-1. Clústers generados a partir del HCA para los atributos aromáticos, descriptores que contribuyen a la construcción de cada uno ($P < 0.05$) y los vinos pertenecientes a cada clúster.

| clúster | vino | atributos positivos |
|---------|--|-----------------------------|
| 1 | MG_V05, CT_B07, GC_B10 | madera, especias |
| 2 | AY_C05, SO_C07 , CZ_D08 | Verdura, animal |
| 3 | BE_R10, CH_R10, CD_C10, BO_B10 , SC_R10 | frutas rojas, frutos negros |
| 4 | AR_A08, RB_R06 , MC_R09, RM_R10, NJ_R09 | herbal, tostado |

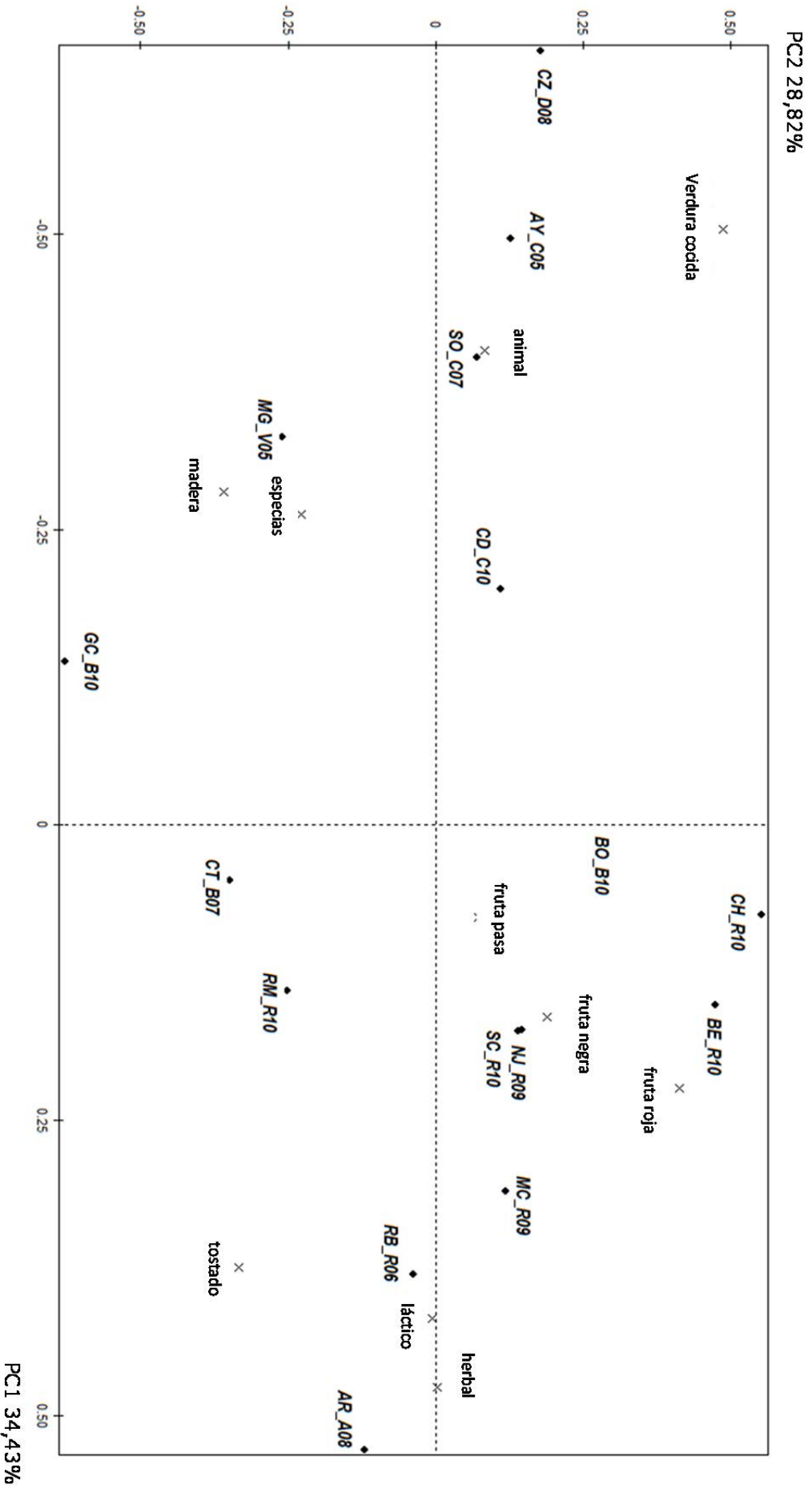


Figura I-1. Proyección de los descriptores aromáticos y los 16 vinos iniciales en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del análisis de correspondencias (AC).

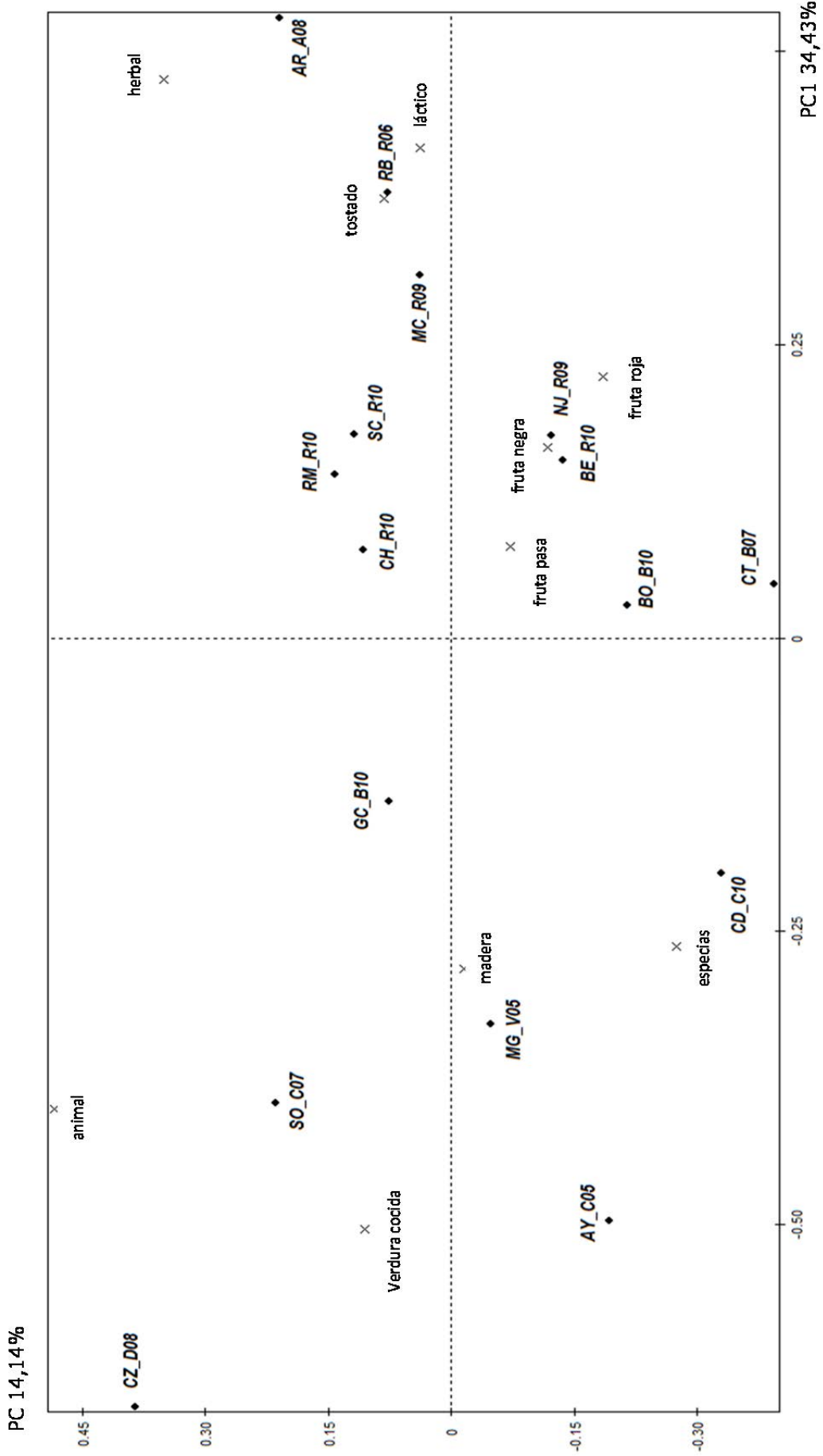


Figura I-2. Proyección de los descriptores aromáticos y los 16 vinos iniciales en el plano bidimensional (PC1 y PC3) obtenido del análisis de correspondencias (AC).

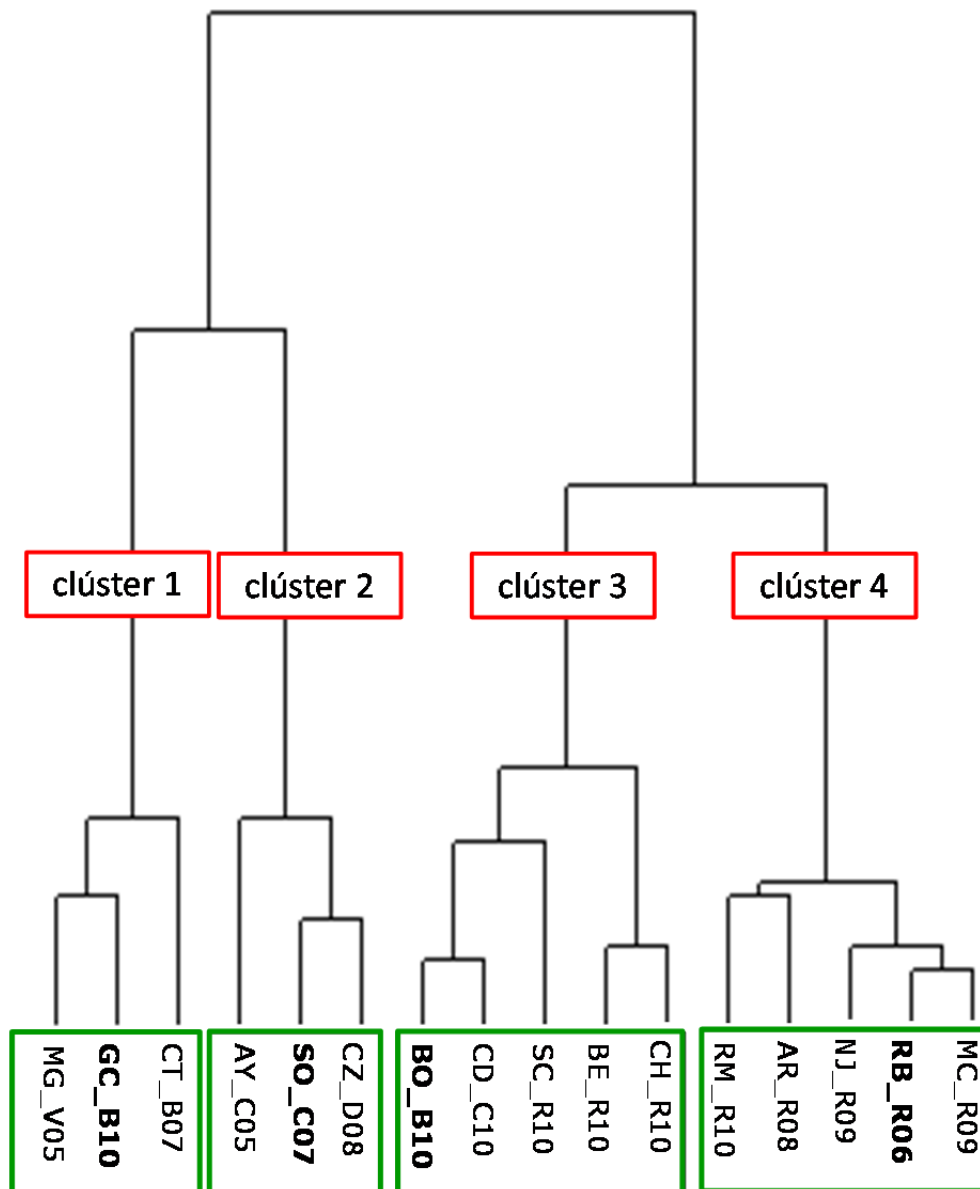


Figura I-3. Diagrama de árbol y clústeres obtenidos a partir del análisis clúster (HCA).

La Figura I-1 muestra que la primera componente enfrenta el clúster 2 (caracterizado por los atributos verduras cocidas y animal) y el clúster 4 (caracterizado por atributos como herbal y tostados). Esta componente parece estar relacionada en parte con la oxidación del vino, así los vinos más oxidados se proyectan en la parte izquierda de los planos (Figuras I-1 y 2) y justo en el lado opuesto se encuentran los vinos con menores niveles de oxidación. La segunda componente enfrenta los clúster 1 y 3, y por lo tanto, los vinos con mayores notas a madera (clúster 1) y los vinos sin crianza en madera, vinos más jóvenes y con mayores notas a frutas rojas (clúster 3). Resulta interesante anotar que los vinos de los clústers 1 y 2 tienen IPTs por encima de 54, han sido envejecidos en madera de roble y tienen una relación IPT/IC por encima de 4.4.

3.2.2. Atributos evaluados en boca.

De acuerdo con el ANOVA de un factor con medidas repetidas (jueces considerados como repetición) el efecto vino fue significativo para el amargor ($F = 3.97$; $P < 0.001$), astringencia ($F = 6.40$; $P < 0.001$), intensidad global ($F = 3.44$; $P < 0.001$) y persistencia ($F = 2.31$; $P < 0.003$).

De acuerdo a la ley de Kaiser, se conservaron las dos primeras dimensiones del PCA que acumulan un 85% de la varianza original. La primera CP está principalmente correlacionada con la persistencia (97%), intensidad global (82%) y el amargor (83%) y la segunda componente con la astringencia sensorial (91%). La matriz de correlación mostró que la intensidad global y la persistencia están positivamente correlacionadas entre sí ($R^2 = 0.81$; $P < 0.001$), hecho descrito ampliamente en la bibliografía [23, 24]. Además ambos atributos están a su vez positivamente correlacionadas con el amargor de los vinos ($R^2 = 0.33$ y 0.36 ; $P < 0.05$ respectivamente). Este hecho parece ser contrario a los resultados encontrados por Sáenz-Navajas y col. [23] donde se observó que la persistencia e intensidad global estaban principalmente correlacionadas con la astringencia de los vinos. Este hecho, puede explicarse por qué, en dicho ensayo el atributo amargor no se pudo tener en cuenta debido a la falta de consistencia entre los miembros del panel. Esto no parece ser sorprendente, ya que aproximadamente el 25% de la población humana hereda un rasgo que los hace incapaces de detectar el amargor [25].

Ambos resultados, tanto el obtenido en este ensayo, como el obtenido por Saézn-Navajas y col. [23], están de acuerdo con lo encontrado por Sáenz-Navajas y col. [24] donde se confirmó que la intensidad global y la persistencia de los vinos blancos esta fundamentalmente relacionadas con el aroma del vino, mientras que en los vinos tintos éste juega sólo un papel secundario, estando la intensidad global y la persistencia causadas principalmente por moléculas no volátiles. Peynaud [26] igualmente apoya esta idea, ya que afirmó que lo que distingue a un gran vino de otro que no lo es, es su persistencia, especialmente en el caso de los vinos tintos. Este atributo, está correlacionado fundamentalmente con la composición fenólica, la cual a su vez, esta correlacionada con el amargor [27-32] y la astringencia [27, 29, 31, 33-35].

Dejando aparte los términos intensidad global y persistencia, que son atributos multidimensionales y relacionados con el amargor en este grupo de vinos, en la Tabla I-2 se muestran las puntuaciones medias de los vinos tanto para el amargor como para la astringencia. Ambas propiedades en boca no se correlacionan significativamente entre sí

($F = 0.70$; $P = 0.42$), lo que sugiere que son variables sensoriales independientes. Las puntuaciones de amargor van desde 4.05 hasta 5.78 (diferencia = 1.73) y se correlacionan positivamente con el contenido de alcohol del vino ($R^2 = 0.55$; $P < 0.01$). Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en la bibliografía [18, 36]. Finalmente, las puntuaciones de astringencia van desde 3.78 hasta 6.12 (diferencia = 2.43) y presentan una correlación lineal positiva y significativa ($R^2 = 0.78$; $P < 0.001$) con el contenido de polifenoles totales (medidos por el IPT). Por lo tanto, diferencias en IPT se traducen en diferencias en la astringencia sensorial en este conjunto de vinos.

Tabla I-2. Puntuaciones sensoriales medias (\pm desviación estándar relativa) de amargor y astringencia proporcionada por el panel entrenado para los 16 vinos estudiados.

| vino | amargor | astringencia |
|--------|-----------------|-----------------|
| MC_R09 | 4.93 \pm 0.31 | 4.73 \pm 0.34 |
| BE_R10 | 4.22 \pm 0.30 | 4.49 \pm 0.33 |
| RB_R06 | 4.76 \pm 0.29 | 4.44 \pm 0.33 |
| CH_R10 | 4.61 \pm 0.36 | 5.05 \pm 0.36 |
| SC_R10 | 4.32 \pm 0.28 | 5.29 \pm 0.29 |
| NJ_R09 | 4.51 \pm 0.23 | 4.56 \pm 0.29 |
| AR_A08 | 5.10 \pm 0.26 | 4.88 \pm 0.36 |
| RM_R10 | 5.39 \pm 0.33 | 3.78 \pm 0.32 |
| GC_B10 | 4.46 \pm 0.31 | 5.17 \pm 0.30 |
| MG_V05 | 5.96 \pm 0.30 | 6.12 \pm 0.30 |
| SO_C07 | 4.51 \pm 0.28 | 4.22 \pm 0.27 |
| AY_C05 | 5.24 \pm 0.31 | 6.12 \pm 0.33 |
| CD_C10 | 4.37 \pm 0.32 | 5.49 \pm 0.33 |
| CT_B07 | 4.05 \pm 0.27 | 4.76 \pm 0.28 |
| BO_R10 | 4.49 \pm 0.32 | 4.12 \pm 0.24 |
| CZ_D08 | 4.34 \pm 0.35 | 5.73 \pm 0.28 |

3.3. Evolución de las propiedades sensoriales tras el envejecimiento en botella

3.3.1. Evolución del aroma ortonasal.

El efecto del envejecimiento se evaluó mediante la comparación de la evolución de las propiedades sensoriales de los 16 vinos en el momento del inicio del estudio y después de haber sido envejecidos 6 meses a 25 °C y con distintas dosis de oxígeno iniciales.

A grandes rasgos y tomando todas las muestras en conjunto se puede observar un aumento significativo en varios atributos durante el envejecimiento. Estos resultados se muestran en la Tabla I-3. Se puede observar un aumento significativo en el atributo

especias (5.8), verduras cocidas (4.3), madera (2.2), láctico (2.0), frutas negras (1.8) y frutos secos (1.6), sin embargo, existen comportamientos diferentes en función de las propiedades sensoriales iniciales de los vinos y por lo tanto del clúster al que pertenecen.

EVOLUCIÓN SENSORIAL DEL CLÚSTER 1 (madera, especias)

La evolución sensorial de los tres vinos pertenecientes al clúster 1 (GC_B10, MG_V05, CT_B07) se muestran en la Figura I-4. Igualmente, los incrementos o disminuciones en la FC de los atributos aromáticos para el clúster se muestran en la Tabla I-3. Las muestras de este clúster, caracterizadas inicialmente por los atributos madera y especias, experimentan sustanciales cambios sensoriales durante el envejecimiento, también se observan cambios producidos por las diferentes dosis de oxígeno suministradas inicialmente. Como se puede observar en la Figura I-4, todos los vinos tras los 6 meses de envejecimiento sufren un desplazamiento hacia la derecha respecto al vino original, mostrando en todos los casos un aumento en la primera dimensión del AC independientemente de la dosis de oxígeno suministrada. Esto significa que tras el periodo de envejecimiento, las muestras son descritas con menores notas a madera (-6.7 en la media de la FC para el clúster) y considerablemente más ricas en fruta negra (6.3), fruta roja (4.3), frutos secos (3.6), verduras cocidas (5.9), herbal (3.0) y láctico (1.6) (Tabla I-3).

Es destacable que la disminución de las notas de madera está en contra del comportamiento general y hasta ahora sólo se ha observado en los vinos de este clúster. Igualmente y en contra del comportamiento general no hay ningún aumento en las notas a especias de clúster. Curiosamente, la disminución de aroma a madera se relaciona positivamente con el contenido polifenólico de los vinos. Así, vinos con mayores valores de IPT (GC_B10 y MG_V05) experimentan disminuciones mayores en este atributo. El efecto contrario se observa para el atributo frutas pasas, para el que los mayores aumentos en este atributo se vinculan al vino con menor IPT. El resto de los cambios experimentados en el aroma no parecen estar relacionados con el contenido de polifenoles de los vinos.

Tabla 1-3. Diferencias medias en la absorbancia a 420 nm y en la frecuencia de citación (FC) de los atributos aromáticos tras el periodo de envejecimiento para los 16 vinos (global) y para cada cluster (1-4). Significación marcado en negrita (* P < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.001) obtenido de la prueba t de Student.

| | Abs 420 | fruta negra | fruta roja | fruta pasa | madera | tostado | animal | láctico | herbal | verdura cocida | especias |
|-----------|---------|----------------|---------------|---------------|---------|---------|--------|---------|---------|-------------------|----------|
| global | 0.31*** | 1.8*** | 0.3 | 1.6*** | 2.2** | 0.7 | 0.2 | 2.00*** | -0.1 | 4.4*** | 5.8*** |
| cluster 1 | -0.04 | 6.3*** | 4.3*** | 3.6* | -6.7*** | 0.1 | -0.6 | 1.5* | 3.0* | 5.9*** | 0.3 |
| cluster 2 | 0.51*** | 3.9*** | 2.4* | -0.3 | -0.5 | 5.1*** | -2.1 | 2.5*** | 1.9* | -2.4*** | 2.9** |
| cluster 3 | 0.34** | -0.8 | -2.0* | 1.9** | 5.1** | 0.9 | 1.7* | 1.9** | 1.9* | 7.0*** | 5.5** |
| cluster 4 | 0.32*** | 0.9 | -0.7 | 1.7* | 5.6*** | -2.4 | 0.6 | 2.2** | -5.3*** | 5.5*** | 11.1*** |

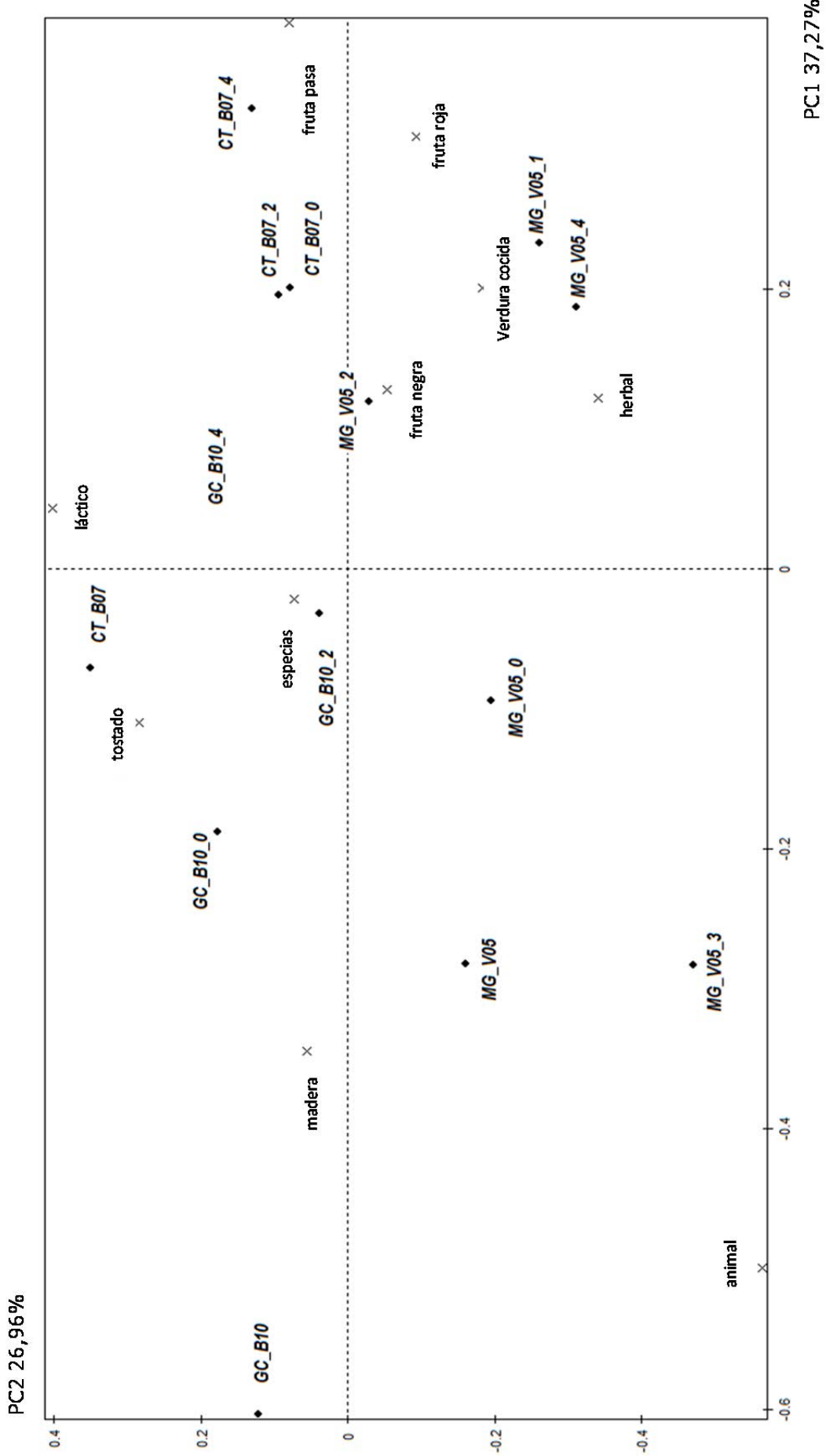


Figura I-4. Proyección de los descriptores aromáticos de los vinos del cluster 1 en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del análisis de correspondencias (AC).

Los efectos producidos por las distintas dosis de oxígeno suministradas en las muestras al inicio del envejecimiento son menos importantes en términos relativos, pero también parecen resultar importantes. Dejando a un lado la muestra MG_V05_3, la cual desarrolló un precipitado que pudo afectar a sus características aromáticas, los tres vinos que recibieron cantidades mínimas de oxígeno (MG_V05_0, GC_B10_0, CT_B07_0) se sitúan a la izquierda del plano (Figura I-4) con respecto a sus correspondientes muestras con dosis más altas (MG_V05_4, GC_B10_4, CT_B07_4). Los efectos no son comparables a los experimentados por el efecto del envejecimiento sin oxígeno y además, el efecto exacto del nivel de oxígeno depende del vino (Figura I-2). Por ejemplo, el vino GC_B10 muestra un cambio gradual traducido en cambios sensoriales de izquierda (dosis 0) a derecha (dosis 4), sin embargo, para el vino CT_B07 el cambio sólo es evidente en los niveles más altos de oxígeno (CT_B07_4), mientras que para la muestra MG_V05 se observa el fenómeno contrario.

EVOLUCIÓN SENSORIAL DEL CLÚSTER 2 (verdura cocida, animal)

La evolución sensorial de los tres vinos pertenecientes al clúster 2 (CZ_D08, AY_C05, SO_C07) se muestran en la Figura I-5. Los incrementos o disminuciones en la FC de los atributos aromáticos para el clúster se muestran en la Tabla I-3. En el momento inicial, estas muestras se caracterizaban principalmente por los atributos vegetales cocidos y animal. Los cambios producidos por el periodo de envejecimiento son de nuevo muy importantes, pero no todos ellos son comunes para los tres vinos. El cambio más evidente y más sorprendente es la desaparición del carácter animal de las muestras SO_C07 que pasa de 12 citas a 4.5, sin embargo, el carácter animal de la muestra CZ_D08, que era similar en el momento inicial a SO_C07, permaneció inalterada.

En cuanto a las desviaciones de los cambios generales (Tabla I-3), el resultado más sorprendente es la disminución para los vinos de este clúster de la nota a vegetales cocidos (-2.4 citas en promedio), que es destacable en las tres muestras del clúster, aunque de nuevo es más clara en la muestra SO_C07 (-4.0). Este cambio es específico de las muestras de este clúster, ya que en todas las demás estas notas aumentan. Igualmente, también son los únicos vinos para los que las notas a frutas pasas no sufren un aumento. Otro cambio relevante y también específico de las muestras de este clúster, es el aumento de las notas tostadas (promedio = 5.1).

Finalmente, existen otros cambios menos intensos pero similares a los observados en el clúster 1, tales como aumentos en fruta negra (3.9) y frutas rojas (2.4), láctico

(2.5) y herbal (1.9). La FC para las notas a especias también aumenta (2.9) en este clúster.

En comparación, los cambios relacionados con el efecto oxígeno (dosis 0, 1, 2, 3 y 4) son mucho más sutiles y difíciles de identificar que los causados por el tiempo de envejecimiento sin oxígeno (inicial-dosis 0), además de no presentar una tendencia clara, como puede observarse en la Figura I-5.

EVOLUCIÓN SENSORIAL DEL CLÚSTER 3 (frutas rojas, frutas negras)

La evolución sensorial de los 5 vinos pertenecientes al clúster 3 (CD_C10 , BO_B10 , CH_R10 , SC_R10 , BE_R10) se muestran en la Figura I-6. Los incrementos o disminuciones en la FC de los atributos aromáticos para el clúster se muestran en la Tabla I-3. En el momento inicial, estas muestras, que corresponden con los vinos más jóvenes, se caracterizaban principalmente por los atributos frutas rojas y negras y por la ausencia de atributos de madera.

Los cambios más importantes sufridos por los vinos pertenecientes a este clúster (comportamiento menos claro para el vino CD_C10 debido a que en el momento inicial este vino se encontraba reducido) se pueden observar en la evolución que presentan las muestras en la primera componente (desplazamiento hacia la derecha) del AC de la Figura I-6. Este desplazamiento implica un aumento en la FC de los atributos verduras cocidas (7.0), madera (5.1) y especias (5.5) en detrimento del atributo a frutas rojas (-2.0). Esta es precisamente, la diferencia específica del vino CD_C10 y la razón principal por la que aparece en la parte derecha del plano, mostrando un gran aumento del atributo frutas rojas (5).

Otros cambios menores observados por los vinos de este clúster, pero que igualmente resultan interesantes son los ligeros aumentos observados en los atributos fruta pasa (1.9), láctico (1.9) y herbal (1.9). Curiosamente, el vino BE_R10, que presenta el IPT más bajo de los vinos de este clúster, muestra el mayor incremento en la FC del atributo frutos secos (aumento de 2 a 8 unidades). Esta relación entre el menor IPT y los mayores aumentos de las notas a fruta pasa ha sido ya observado para los vinos del clúster 1.

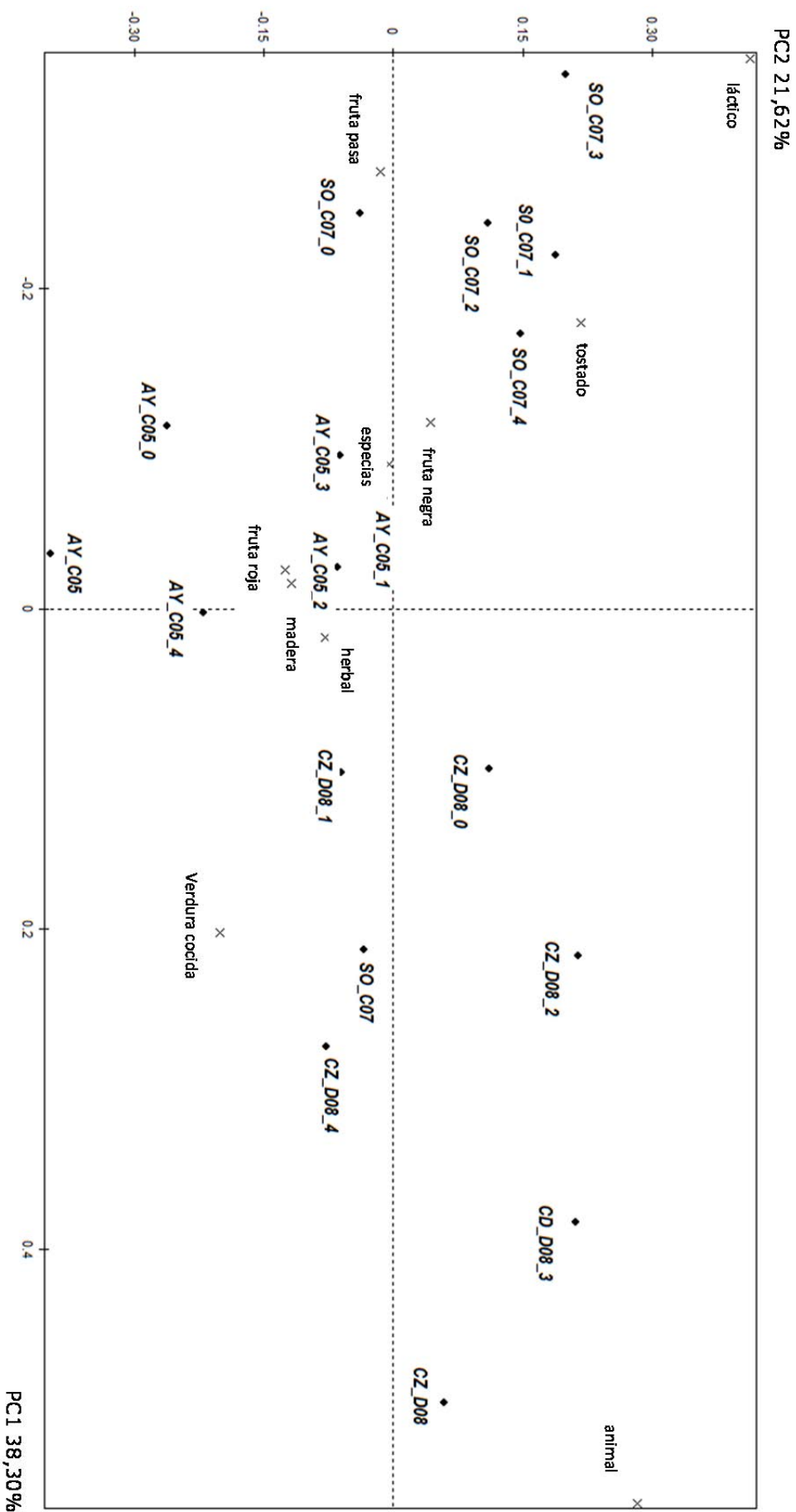


Figura 1-5. Proyección de los descriptores aromáticos de los vinos del cluster 2 en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del análisis de correspondencias (AC).

Al igual que ocurrió en el clúster 2, el patrón del efecto de las distintas dosis de oxígeno ha sido bastante errático. Sólo en dos de las muestras (CD_C10 y CH_R10) hay un claro incremento del atributo verduras cocidas con el nivel inicial de oxígeno, seguido por una clara disminución en las notas de frutas rojas.

EVOLUCIÓN SENSORIAL DEL CLÚSTER 4 (herbal, tostado)

La evolución sensorial de los 5 vinos pertenecientes al clúster 4 (AR_A08, RB_R06, MC_R09, RM_R10, NJ_R09) se muestra en la Figura I-7. Los incrementos o disminuciones en la FC de los atributos aromáticos para el clúster se muestran en la Tabla I-3. En el momento inicial, estos vinos se caracterizaban principalmente por los atributos herbal (atributo formado por la combinación de tabaco fresco, tomillo, mentol-fresco) y notas tostadas. Los vinos de este clúster son los vinos que presentan los cambios más importantes durante el proceso de envejecimiento. De nuevo, presentan grandes desplazamientos hacia la derecha en la componente 1, mostrando grandes aumentos en los atributos especias, así como aumentos más moderados en las notas a verduras cocidas (5.5), madera (5.6), láctico (2.2) y fruta pasa (1.7), y un descenso en las notas herbales (-5.3). La evolución más diferente entre estos 5 vinos corresponde con el vino RM_R10, el cual no sufre un aumento de las notas a madera, mientras que las notas a verduras cocidas y frutas pasas aumentan fuertemente (7.5 y 5.6 respectivamente).

De nuevo, el efecto de las distintas dosis de oxígeno es menos claro, aunque se observa una disminución significativa de las notas a fruta roja con el nivel de oxígeno suministrado inicialmente ($P < 0.05$). Observando el desplazamiento en el plano, los resultados muestran que en general los niveles mayores de oxígeno hacen que las muestras se desplacen hacia arriba en la componente 2 (y a la derecha en la componente 1), lo que sugiere leves incrementos en las notas a verduras cocidas y ligeras disminuciones en las notas lácticas.

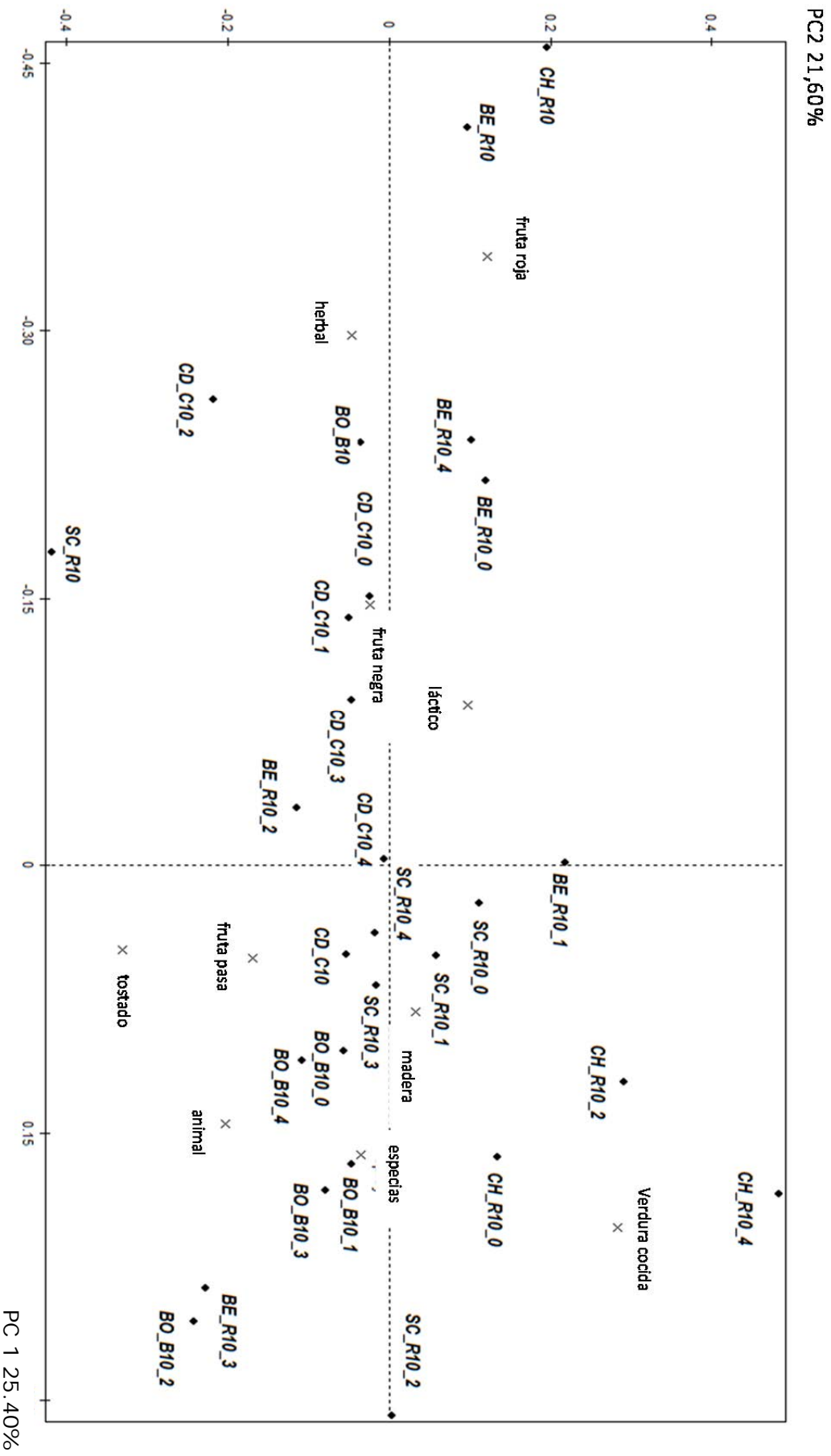


Figura I-6. Proyección de los descriptores aromáticos de los vinos del cluster 3 en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del análisis de correspondencias (AC).

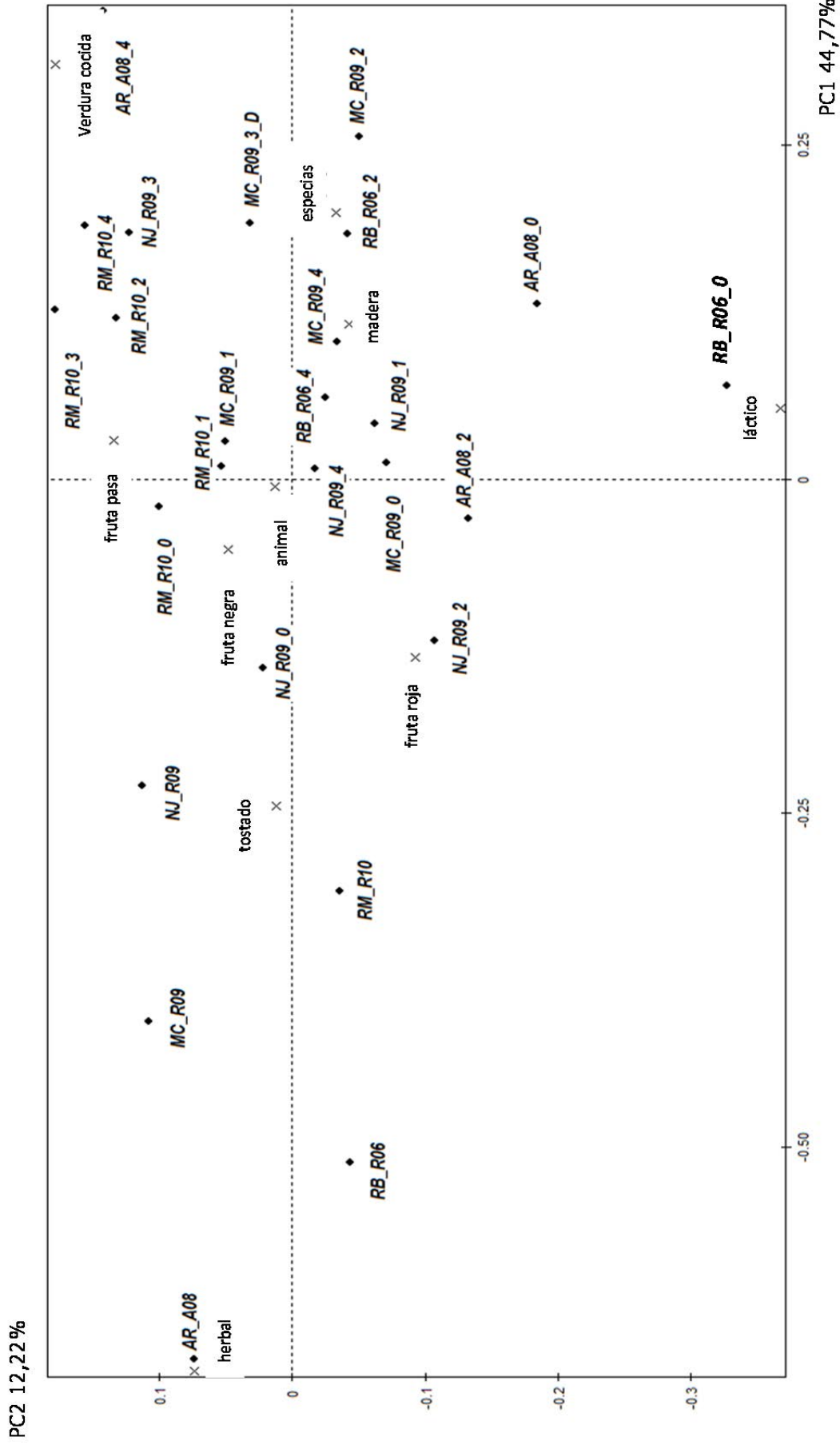


Figura I-7. Proyección de los descriptores aromáticos de los vinos del clúster 4 en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del análisis de correspondencias (AC).

Los resultados muestran que existe un patrón general en la evolución en las propiedades aromáticas evaluadas orthonasalmente durante el envejecimiento en botella. Este patrón común en la mayoría de los vinos se caracteriza principalmente por ligeros aumentos en las notas a frutas rojas, frutas pasas, madera, láctico y fuertes aumentos en las notas de verduras cocidas y especias. Sin embargo, también se han observado desviaciones en este patrón general las cuales están relacionadas con las propiedades sensoriales iniciales de los vinos. Algunos de estas desviaciones parecen también estar relacionadas con la composición total de polifenoles del vino. Por ejemplo, los vinos caracterizados inicialmente por notas a madera y especias (clúster 1), debido al envejecimiento en bodega de estos vinos, sufren una evolución en botella hacia menores niveles de estas notas y por el contrario muestran fuertes aumentos de las notas a frutas negras y rojas además de observarse también un aumento de las notas herbales.

Este patrón en la evolución de este tipo de vinos es conocido y buscado de forma general por los enólogos, ya que se sabe que durante la crianza del vino en botella las notas a madera procedentes de la bodega tienden a ensamblarse mucho mejor con el aroma del vino.

Por otro lado, vinos que inicialmente muestran altos niveles en las notas a animal y a verdura cocida (clúster 2) como consecuencia de envejecimientos excesivamente largos en bodega o por contaminación con *Brettanomyces*, sufren una evolución en botella bastante diferente. Esta evolución se caracteriza por una ligera reducción de las notas a verduras cocidas, nulos aumentos de las notas a pasas y madera y por fuertes incrementos en las notas a tostado.

Por el contrario, vinos caracterizados inicialmente por notas a frutas rojas y negros y por bajos niveles de las notas relacionadas con el envejecimiento (madera, animal, verdura cocida), evolucionan en botella aumentando fuertemente sus notas a madera y verduras cocidas y con una gran disminución en sus notas frutales.

Finalmente, vinos con crianza en madera pero que no muestran muchas notas a madera pero si presentan notas herbales y tostadas (clúster 4), sufren una evolución durante el envejecimiento en botella que se caracteriza por fuertes aumentos de las notas a especia y madera en detrimento de las notas herbales y tostadas.

Como se puede observar, todas estas peculiaridades fuera del patrón general de evolución están relacionadas con la disminución de notas que en un primer momento se

encontraban en muy alta concentración y aumentos de otros que al principio solo se encontraban de manera residual.

Por otro lado, también es destacable que el período de crianza en botella está lejos de ser estático, sino que es un proceso dinámico y que, al menos en parte, se parece a un equilibrio químico lento. En un equilibrio químico todos los compuestos o reactivos que están en exceso sufren disminuciones en sus concentraciones debido a la ley de conservación de masa y como consecuencia se observan aumentos en los productos que se encontraban por debajo.

Sin embargo, la verdad es que se está muy lejos de tener una idea clara acerca de los distintos equilibrios que tienen lugar con todos estos compuestos aromáticos. De hecho, estos equilibrios podrían ser equilibrios químicos puros como los procesos de adición de anhídrido sulfuroso o hidrólisis de ésteres y ácidos, pero también podrían ser equilibrios físico-químicos como las interacciones metal-ligando o complejos de adsorción sobre material macromolecular que no afectan a la naturaleza química de las moléculas pero sí a su disponibilidad y participación en la fase vapor, como se ha demostrado recientemente [37]. Sin embargo, también podría ser una cuestión de percepción psicofísica, ya que si un aroma domina la mezcla y un segundo sufre un aumento de la intensidad (como consecuencia de un proceso independiente, tal como la hidrólisis de un precursor glicosídico), la intensidad del primero disminuirá cuando el segundo se acerca a la región de co-dominancia [38, 39]. Este hecho, podría explicar en gran medida los resultados obtenidos con los distintos vinos.

Los resultados también muestran que el papel que juega el oxígeno en la evolución de las características sensoriales tras el embotellado en este tipo de vinos es solo residual en comparación con el ejercido por el tiempo de envejecimiento. Sin embargo, se debe tener en cuenta que los vinos utilizados en el presente ensayo son todos ellos vinos tintos, los cuales cuentan todos con un contenido relativamente alto en polifenoles totales, lo que puede llevar a que el oxígeno se haya consumido totalmente en unos días.

3.3.2. Evolución de los atributos en boca.

Tomando todas las muestras en conjunto, el proceso de envejecimiento en botella no ha tenido un impacto general en el amargor de los vinos, ya que no se observan diferencias significativas entre las puntuaciones antes y después del envejecimiento, como puede observarse en la Tabla I-4.

Tabla I-4. Puntuaciones medias (\pm DSR) para el amargor de los 16 vinos (global) y para cada vino que presentan diferencias significativas. Las puntuaciones más altas para el amargor dentro de un mismo vino aparecen marcadas en negrita.

| | inicial | final | F | P |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|------------|
| Global | 5.03 \pm 0.30 | 5.03 \pm 0.27 | 0.001 | ns |
| SC_R10 | 4.32 \pm 0.28 | 4.79\pm0.28 | 5.72 | 0.018** |
| RM_R10 | 5.39\pm0.33 | 4.78 \pm 0.28 | 9.07 | 0.003*** |
| CD_C10 | 4.37 \pm 0.32 | 4.80\pm0.25 | 4.13 | 0.043** |
| BO_R10 | 4.50 \pm 0.32 | 4.92\pm0.27 | 3.77 | 0.054* |
| MC_R09 | 4.93\pm0.31 | 4.48 \pm 0.25 | 4.17 | 0.042* |
| AR_A08 | 5.10\pm0.26 | 4.20 \pm 0.25 | 16.36 | < 0.001*** |
| MG_V05 | 5.96\pm0.30 | 5.19 \pm 0.31 | 12.64 | < 0.001*** |
| CT_B07 | 4.05 \pm 0.27 | 4.59\pm0.27 | 6.013 | 0.016** |
| CZ_D08 | 4.34 \pm 0.35 | 4.73\pm0.28 | 3.438 | 0.065* |

* P < 0.05; ** P < 0.01

Sin embargo, a nivel individual si se observan pequeñas diferencias significativas. Estas diferencias se atribuyen al hecho de que los cambios en el amargor parecen ser vino dependientes así, existen 5 vinos en los que se observa un aumento significativo de este atributo (SC_R10, CD_C10, BO_B10, CT_B07, CZ_D08) y por el contrario, existen otros 4 vinos en los que se observa un descenso de dicho atributo (RM_R10, MC_R09, AR_A08, MG_V05).

Por otro lado y en contra del comportamiento esperado, se observa un aumento significativo global de la astringencia para este conjunto de vinos (P < 0.01) (Tabla I-5). Esta tendencia general se debe al aumento significativo de este atributo exclusivamente en 4 de los vinos: RM_R10, BO_B10, RB_R06 y SO_C07 (Tabla I-5). Cabe destacar, que estas muestras son las que presentaban la astringencia más baja en el momento inicial, antes del envejecimiento (Tabla I-2).

Tabla I-5. Puntuaciones medias (\pm DSR) para la astringencia de los 16 vinos (global) y para cada vino que presentan diferencias significativas. Las puntuaciones más altas para la astringencia dentro de un mismo vino aparecen marcadas en negrita.

| | inicial | final | F | P |
|---------------|-----------------|---------------------------------|-------|----------|
| Global | 5.35 \pm 0.32 | 5.54\pm0.26 | 6.75 | 0.009* |
| RM_R10 | 3.78 \pm 0.32 | 4.72\pm0.26 | 14.65 | <0.001** |
| BO_R10 | 4.12 \pm 0.24 | 4.63\pm0.24 | 7.01 | 0.009* |
| RB_R06 | 4.44 \pm 0.33 | 5.20\pm0.25 | 7.60 | 0.007* |
| SO_C07 | 4.22 \pm 0.27 | 4.88\pm0.22 | 9.23 | 0.003* |

* P < 0.05; ** P < 0.01

En cuanto a la intensidad global evaluada en boca, se observa de manera general una disminución significativa (P < 0.01) (Tabla I-6). Esta disminución viene explicada por una disminución significativa en tres de los vinos (GC_B10, MG_V05, AY_C05). Curiosamente, estas muestras son las que presentan el valor más alto de polifenoles totales (IPT de 71.4 a 83.4).

Tabla I-6. Puntuaciones medias (\pm desviación estándar relativa) para la intensidad global de los 16 vinos (global) y para cada vino que presentan diferencias significativas. Las puntuaciones más altas para la intensidad global dentro de un mismo vino aparecen marcadas en negrita.

| | inicial | final | F | P |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|---------|
| Global | 5.24\pm0.24 | 5.09 \pm 0.20 | 8.02 | 0.005** |
| SC_R10 | 4.42 \pm 0.21 | 4.78\pm0.20 | 4.240 | 0.041* |
| GC_B10 | 5.78\pm0.23 | 5.22 \pm 0.18 | 8.027 | 0.005** |
| MG_V05 | 5.52\pm0.27 | 5.11 \pm 0.22 | 4.435 | 0.037* |
| AY_C05 | 5.59\pm0.23 | 5.08 \pm 0.21 | 7.388 | 0.007** |

* P < 0.05; ** P < 0.01

Por otra parte, se observa una tendencia global (P < 0.1, Tabla I-7) de disminución de la persistencia, lo cual, es significativo exclusivamente en dos de las muestras de vino (AR_A08 , AY_C05).

Tabla I-7. Puntuaciones medias (\pm DSR) para la persistencia de los 16 vinos (global) y para cada vino que presentan diferencias significativas. Las puntuaciones más altas para la persistencia dentro de un mismo vino aparecen marcadas en negrita.

| | inicial | final | F | P |
|---------------|---------------------------------|-----------------|------|---------|
| Global | 5.24\pm0.26 | 5.09 \pm 0.21 | 3.79 | 0.052* |
| AR_A07 | 5.34\pm0.28 | 4.89 \pm 0.19 | 4.14 | 0.044** |
| AY_C05 | 5.88\pm0.25 | 5.45 \pm 0.19 | 4.92 | 0.028** |

* P < 0.05; ** P < 0.01

En cuanto al efecto de las distintas dosis de oxígeno en los atributos evaluados en boca sólo se observan diferencias significativas en la percepción de la astringencia en tres de los vinos. Estos vinos son CD_C10 (F = 3.27; P = 0.013) , MC_R09 (F = 2.96; P = 0.021) y BO_B10 (F = 2.87; P = 0.025).

Estos resultados muestran que a diferencia de lo que ocurre con el aroma, no existe un patrón general en la evolución de los atributos evaluados en boca. En el caso del sabor amargo, se ha observado un aumento o disminución en el 56% de las muestras. Sin embargo, no se observa ningún efecto en este atributo debido a las dosis de oxígeno.

Por otro lado, y contrariamente a lo que hubiéramos esperado, se han observado discretos aumentos en la astringencia de los vinos menos astringentes y ningún cambio en los demás vinos. Además, en el caso de esta sensación parece que el oxígeno si afecta aunque de manera muy limitada a este atributo.

Tanto amargor y astringencia son sensaciones las cuales han sido vinculadas principalmente a la composición fenólica [27-34], lo que conlleva que la evolución de la composición polifenólica durante la maduración del vino puede traducirse en modificaciones en la percepción de estos atributos. Por un lado, la formación de derivados de flavanoles con puentes de etilo durante el envejecimiento del vino o la formación de agliconas de flavonoles (especialmente miricetina o quercetina) [27, 40] podría conducir a los aumentos observados en el amargor de los vinos. Por otra parte, también está ampliamente descrito en la bibliografía la polimerización de las proantocianidinas durante el envejecimiento del vino, lo que podría resultar en una disminución en el amargor. Sin embargo, hasta el momento la correlación de los diferentes grupos de compuestos fenólicos con la astringencia sensorial y el amargor está lejos de ser clara. Por lo tanto, la función sensorial desempeñada por estos compuestos no es predecible y el incremento en la astringencia experimentada por los vinos menos astringentes no se puede explicar en este momento.

4. CONCLUSIONES

Existe un patrón general en la evolución de las propiedades aromáticas evaluadas ortonasalmente. Este patrón implica ligeros aumentos en fruta roja, fruta pasa, madera, láctico y fuertes aumentos de notas de verduras cocidas y especias.

Se ha encontrado que las desviaciones aromáticas al patrón general están relacionadas por un lado con la composición polifenólica de los vinos iniciales. Así, los vinos con una baja concentración de polifenoles (IPT) son los que mayores aumentos en notas frutales presentan. Además, existe una relación positiva significativa entre la disminución del aroma a madera y el contenido polifenólico de los vinos. Por otra parte, la desviación al patrón general también está relacionada con las características sensoriales de los vinos iniciales. En este caso, todas las desviaciones están relacionadas con la disminución de notas que en un primer momento contaban con una alta citación y aumentos de otras que al principio solo se encontraban de manera residual (clúster 1: descenso de las notas a madera; clúster 2: descenso de las notas a verdura cocida y aumento de las notas tostadas; clúster 3: aumento de las notas herbales y a fruto seco; clúster 4: descenso de las notas herbales y aumento de las especias).

En general, se esperaba que la aplicación de las distintas dosis de oxígeno hubiera tenido más efecto. En algunos de los casos (clúster 1 y 4) el oxígeno ha acentuado los procesos observados en el envejecimiento sin oxígeno, sin embargo, en otros casos (clúster 2 y 3) el oxígeno hace presentar comportamientos especiales y sin una tendencia clara.

El efecto del envejecimiento en el amargor es vino dependiente (aumentando en unos vinos y disminuyendo en otros), mientras que se ha observado una disminución general (en un número limitado de vinos) tanto de la intensidad global como de la persistencia evaluada en boca. Respecto a la astringencia, se han observado cambios discretos especialmente en los vinos que de partida eran menos astringentes. Sin embargo, la dosificación inicial de las diferentes cantidades de oxígeno ha tenido un impacto limitado en las propiedades sensoriales en boca de los vinos estudiados.

En general, se esperaba que la aplicación de las distintas dosis de oxígeno hubiera tenido más efecto (tanto en las propiedades en boca como en el aroma ortonasal). Este hecho podría estar relacionado con la forma de aplicación del oxígeno, ya que se aplicó la totalidad del oxígeno en el momento inicial en lugar de ir dosificándolo a lo largo del envejecimiento a través del cierre como en condiciones normales.

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., & Teissedre, P.L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, 126, 1971-1977.
- [2] Etaio, I., Pérez Elortondo, F. J., Albisu, M., Gaston, E., & Schlich, P. (2009). Sensory attribute evolution in bottled young red wines from Rioja Alavesa. *European Food Research and Technology*, 228, 695-705.
- [3] Hopfer, H., Buffon, P. A., Ebeler, S. E., & Heymann, H. (2013). The combined effects of storage temperature and packaging on the sensory, chemical, and physical properties of a Cabernet Sauvignon wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3320-3334.
- [4] Caille, S., Samson, A., Wirth, J., Dieval, J.B., Vidal, S., & Cheynier, V. (2010). Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling. *Analytica Chimica Acta*, 660, 35-42.
- [5] Butzke, C. E., Vogt, E. E., & Chacon-Rodriguez, L. (2012) Effects of heat exposure on wine quality during transport and storage. *Journal of Wine Research*, 23, 15-25.
- [6] Czibulya, Z., Kollar, L., Nikfardjam, M. P., & Kunsagi-Mate, S. (2012). The effect of temperature on the color of red wines. *Journal of Food Science*, 77, 880-885.
- [7] Hopfer, H., Ebeler, S. E., & Heymann, H. (2012). The combined effects of storage temperature and packaging type on the sensory and chemical properties of Chardonnay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10743-10754.
- [8] Robinson, A. L., Mueller, M., Heymann, H., Ebeler, S. E., Boss, P. K., Solomon, P. S., & Trengove, R. D. (2010). Effect of simulated shipping conditions on sensory attributes and volatile composition of commercial white and red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 61, 337-347.
- [9] Lopes, P., Silva, M. A., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne, V., Saucier, C., Darriet, P., Teissedre, P. L., & Dubourdieu, D. (2009). Impact of oxygen dissolved at bottling and transmitted through closures on the composition and sensory properties of a Sauvignon blanc wine during bottle storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10261-10270.
- [10] Godden, P., Francis, L., Field, J., Gishen, M., Coulter, A., Valente, P., Hoj, P., & Robinson, E. (2001). Wine bottle closures: physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine - 1. Performance up to 20 months post-bottling. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 62-105.

- [11] Guaita, M., Petrozziello, M., Motta, S., Bonello, F., Cravero, M. C., Marulli, C., & Bosso, A. (2013). Effect of the closure type on the evolution of the physical-chemical and sensory characteristics of a montepulciano d'Abruzzo rose wine. *Journal of Food Science*, 78, 160-169.
- [12] Wirth, J., Caille, S., Souquet, J. M., Samson, A., Dieval, J. B., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2012). Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rose wines. *Food Chemistry*, 132, 1861-1871.
- [13] Gambuti, A., Rinaldi, A., Ugliano, M., & Moio, L. (2013). Evolution of phenolic compounds and astringency during aging of red wine: effect of oxygen exposure before and after bottling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1618-1627.
- [14] Puertolas, E., Saldana, G., Condon, S., Alvarez, I., & Raso, J. (2010). Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*, 119, 1063-1070.
- [15] O'Brien, V., Francis, I. L., & Osidacz, P. (2009). Packaging choices affect consumer enjoyment of wines. *Wine Industry Journal*, 24, 48-54.
- [16] Chinnici, F., Sonni, F., Natali, N., & Riponi, C. (2013). Oxidative evolution of (+)-catechin in model white wine solutions containing sulfur dioxide, ascorbic acid or gallotannins. *Food Research International*, 51, 59-65.
- [17] Campo, E., Do, B. V., Ferreira, V., & Valentin, D. (2008). Aroma properties of young Spanish monovarietal white wines: a study using sorting task, list of terms and frequency of citation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14, 104-115.
- [18] Colonna, A. E., Adams, D. O., & Noble, A. C. (2004). Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10, 26-31.
- [19] Sáenz-Navajas, M.P., González-Hernández, M., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., & Ferreira, V. (2012). Orthonasal aroma characteristics of spanish red wines from different price categories and their relationship to expert quality judgements. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18, 268-279.
- [20] Morineau, A., Lebart, L., & Piron, M. *Statistique exploratoire multidimensionnelle*. Dunod: Paris, 1995.
- [21] Morineau, A. (1984). Note sur la caractérisation statistique d'une classe par les valeurs-test. *Bulletin Technique Centre Statistique Informatique Appliquées*, 2, 20-27.
- [22] Etaio, I., Elortondo, F. J. P., Albisu, M.; Gaston, E., Ojeda, M., & Schilch, P. (2008). Development of a quantitative sensory method for the description of young red wines from Rioja Alavesa. *Journal of Sensory Studies*, 23, 631-655.

- [23] Sáenz-Navajas, M.P., Martín-López, C., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2011). Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 9-19.
- [24] Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). An assessment of the effects of wine volátiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry*, 58, 5574-5585.
- [25] Kim, U. K., & Drayna, D. (2005). Genetics of individual differences in bitter taste perception: lessons from the PTC gene. *Clinical Genetics*, 67, 275-280.
- [26] Peynaud. *The taste of wine*. John Wiley and Sons: New York, 1996.
- [27] Preys, S., Mazerolles, G., Courcoux, P., Samson, A., Fischer, U., Hanafi, A., Bertrand, D., & Cheynier, V. (2006). Relationship between polyphenolic composition and some sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*, 563, 126-136.
- [28] Vaia, R., & McDaniel, M. (1996). Sensory effects of quercetin in a model wine and a Chardonnay. In *Second Rose Marie Pangborn Memorial Symposium*, Noble, A. C., Ed. *Food Quality and Preference*, 7, 339-340.
- [29] Brossaud, F., Cheynier, V., & Noble, A. C. (2001). Bitterness and astringency of grape and wine polyphenols. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 33-39.
- [30] Cliff, M. A., King, M. C., & Schlosser, J. (2007). Anthocyanin, phenolic composition, colour measurement and sensory analysis of BC commercial red wines. *Food Research International*, 40, 92-100.
- [31] Peleg, H., Gacon, K., Schlich, & Noble, A. C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimmers, and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1123-1128.
- [32] Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008). Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9190-9199.
- [33] Monteleone, E. Condelli, N., Dinnella, C., & Bertuccioli, M. (2004). Prediction of perceived astringency induced by phenolic compounds. *Food Quality and Preference*, 15, 761-769.
- [34] Lattey, K. A., Bramley, B. R., Francis, I. L., Herderich, M. J., & Pretorius, S. (2007). Wine quality and consumer preferences: Understanding consumer needs. *Australian and New Zealand Wine Industry Journal*, 22, 33-39.
- [35] Vidal, S., Francis, L., Williams, P., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). The mouth-feel properties of polysaccharides and anthocyanins in a wine like medium. *Food Chemistry*, 85, 519-525.

- [36] Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P. L., & Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, 19 (3), 286-291.
- [37] Zapata, J., Lopez, R., Herrero, P., & Ferreira, V. (2012). Multiple automated headspace in-tube extraction for the accurate analysis of relevant wine aroma compounds and for the estimation of their relative liquid-gas transfer rates. *Journal of Chromatography A*, 1266, 1-9.
- [38] Ferreira, V. (2012a). Revisiting psychophysical work on the quantitative and qualitative odour properties of simple odour mixtures: a flavour chemistry view. Part 1: intensity and detectability. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 124-140.
- [39] Ferreira, V. (2012b). Revisiting psychophysical work on the quantitative and qualitative odour properties of simple odour mixtures: a flavour chemistry view. Part 2: qualitative aspects. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27, 201-215
- [40] Saenz-Navajas, M. P., Fernandez-Zurbano, P., & Tena, M. T. (2009). Study of hydroxycinnamic acids and malvidin 3-monoglucoside derivatives using capillary zone electrophoresis and ultra-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 115, 766-774.

SECCIÓN III. CAPÍTULO II

Evolución de la composición no volátil de los vinos tintos durante la etapa de embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno.

1. INTRODUCCION

El vino es una bebida muy compleja que evoluciona tanto desde el punto de vista físico-químico como desde el punto de vista sensorial. Normalmente los vinos tintos requieren un periodo de envejecimiento o afinamiento en botella antes de ser consumidos. Generalmente, se considera que la capacidad de un vino para envejecer es un criterio de calidad, especialmente en los vinos de crianza [1]. En el caso de los vinos jóvenes, los cuales tienen una vida más corta, su evolución durante el primer año y particularmente durante su estancia en botella es muy importante [2].

Está ampliamente aceptado que el vino durante su estancia en botella pasa por tres fases: maduración, plenitud y declive. Dubourdieu [3], analizó comparativamente la evolución de los vinos bordeleses llegando a la conclusión que se refleja en la Figura II-1.

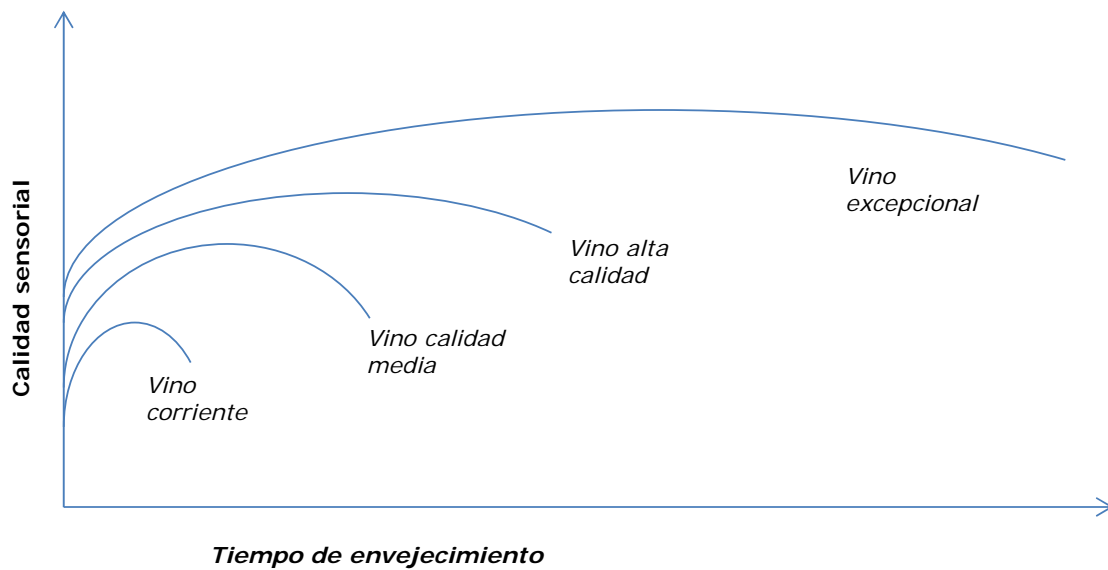


Figura II-1. Evolución de la calidad sensorial del vino. Adaptado de Dubourdieu, [3].

Así, vinos corrientes mejoran muy poco en botella y rápidamente entran en fase de declive. Los vinos considerados como de calidad media serían aquellos que mejorarían algo durante un cierto tiempo. Los vinos de calidad alta después de una fase de maduración más o menos larga, mantendrían la fase de plenitud largo tiempo y la fase de declive sería lenta. Finalmente, los vinos calificados como excepcionales, de muy alta

calidad, serían vinos muy longevos que conservarían la fase de plenitud durante décadas. Igualmente su declive sería muy largo y paulatino.

La capacidad de los vinos para envejecer está íntimamente ligada a la composición no volátil, ya que los cambios producidos en características como el color, astringencia, amargor, acidez y dulzor están sin duda definidos por la composición no volátil de los vinos. Entre la composición no volátil, la composición polifenólica juega un papel muy importante. La presencia de estos compuestos en los vinos está fuertemente influenciada por factores como: la variedad, tipo de viticultura, el estado de maduración de las uvas, proceso de elaboración (principalmente durante el proceso de maceración), conservación y crianza [4]. Durante el envejecimiento en botella los compuestos polifenólicos participan en numerosas y complejas reacciones químicas. Muchas de estas reacciones se ven favorecidas por determinadas condiciones de envejecimiento como la temperatura, el tiempo [5] o la presencia de oxígeno. Por ello, el manejo de estas condiciones representa un gran desafío para los enólogos. Una gestión inadecuada de estos parámetros conduce a cambios químicos irreversibles que provocan defectos sensoriales, traduciéndose en una pérdida de calidad. Actualmente, modelizar el grado de exposición al oxígeno que dará lugar a la expresión sensorial óptima de un determinado vino continúa siendo un reto.

El vino tinto puede tolerar más de treinta saturaciones de O_2 ($180 \text{ ml } O_2 \text{ L}^{-1}$) antes de mostrar caracteres de oxidación [6]. Esta gran resistencia a la oxidación se debe principalmente al material polifenólico, ya que teniendo en cuenta la gran diferencia entre la tendencia a la oxidación del vino tinto y blanco, no existe otro grupo de compuestos en el vino tinto capaces de consumir toda esta cantidad de oxígeno [7]. Durante el proceso de vinificación, existen numerosas etapas (prensado, filtrado, trasiegos...) donde se suministra al vino oxígeno de forma incontrolada [8]. En esta línea, existen trabajos donde se ha estudiado el efecto de este gran consumo de oxígeno en un tanque simulando las condiciones de envejecimiento en barrica [9, 10] (micro-oxigenación). Sin embargo, durante el envejecimiento en botella la exposición al oxígeno es generalmente muy baja (nano oxigenación). La exposición al oxígeno durante esta etapa puede variar mucho dependiendo en gran medida del tipo de cierre utilizado [11, 12]. Las diferencias entre un tapón u otro son la fuente principal de las variaciones en la permeabilidad al oxígeno entre botellas. Diversos ensayos con distintos cierres: corcho, sintéticos, de rosca... han demostrado que dan lugar a diferentes cambios sensoriales y químicos durante el envejecimiento del vino. Estas variaciones se deben principalmente

a la diferencia en la velocidad de permeabilidad al oxígeno o tasa de transferencia de oxígeno (OTR) [13-15]. De hecho, existen varios estudios donde se pone de manifiesto la influencia de las distintas OTR en la evolución tanto de los vinos blancos como tintos [16-21]. Concretamente en vinos tintos, Wirth y col. [19] concluyeron que durante el envejecimiento los compuestos polifenólicos más afectados por las distintas OTRs son los antocianos, existiendo también una disminución de las proantocianidinas y de ácidos hidroxicinámicos pero independiente de la OTR. Por otro lado, Gambuti y col. [21] concluyeron que los cambios experimentados en el material polifenólico a causa de las distintas OTRs dependen en gran medida de la concentración inicial del vino en estos compuestos, aunque también existen otro tipo de parámetros intrínsecos al vino que tienen gran influencia en esta evolución, como el pH o el grado alcohólico.

A la vista de que los estudios existentes se han llevado a cabo con un número limitado de vinos, con variedades muy concretas y partiendo siempre de vinos jóvenes, y teniendo en cuenta la importancia de la composición polifenólica en la calidad del vino tinto, el objetivo principal de este Capítulo ha sido evaluar el efecto del envejecimiento en botella en presencia de distintos niveles de oxígeno sobre la composición no volátil, especialmente sobre la composición polifenólica de 16 vinos tintos de distinta variedad, origen, añada y distinto contenido polifenólico (IPT).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Vinos.

El estudio se ha llevado a cabo con los 16 vinos tintos españoles listados en la Tabla P-1 de la presentación de esta Sección, así como los 80 vinos resultantes (16 vinos x 5 dosis de oxígeno) del ensayo de envejecimiento. En el caso de los vinos en los que no se observaron diferencias sensoriales significativas entre las dosis intermedias de oxígeno aplicadas (dosis 1-3) (test triangulares de la Tabla P-4), se analizaron exclusivamente una de estas dosis (1, 2, 3).

2.2. Análisis químicos.

2.2.1. Reactivos.

Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico. Todos los disolventes cromatográficos fueron de grado MS. Se obtuvo agua ultrapura de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia). El gel TSK Toyopearl HW-50F fue suministrado por Tosoh Bioscience (Stuttgart, Alemania) y el metanol, ácido fórmico, etanol, acetonitrilo y ácido sulfúrico por Scharlab (Barcelona, España). Ovoalbúmina (V-grade), ácido *L*-tartárico, catequina, epicatequina, ácido *t*-aconítico, ácido *c*-aconítico, miricetina, kaempferol, vainillina, éster etílico del ácido protocatéuico, ácido protocatéuico, ácido gálico, ácido caféico, y quercetina fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (San Luis, M.O., EEUU). Quercetin-3-*O*-glucósido, quercetin-3-*O*-galactósido, quercetin-3-*O*-glucurónido, kaempferol-3-*O*-glucósido, isorhamnetin-3-*O*-glucósido, miricetin-3-*O*-glucósido, miricetina, kaempferol, galato de epicatequina, galato de epigallocatequina, procianidinas B1 y B2, ácidos ferúlico y *p*-cumárico fueron suministrados de Extrasynthèse (Genay, Francia). El ácido vanilínico fue adquirido en Fluka.

2.2.2. Análisis de parámetros convencionales en vinos.

Los análisis de azúcares reductores, contenido de etanol, pH, acidez total y acidez volátil se realizaron por Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR) con un equipo WineScanTM FT 120 (FOSS[®], Barcelona), que fue previamente calibrado con los métodos oficiales de la OIV [22]. El análisis de la concentración de anhídrido sulfuroso (libre y combinado) se realizó de acuerdo a los métodos oficiales de la OIV [22]. Los ácidos *L*-málico y láctico y la concentración de glicerol se determinaron por métodos enzimáticos conforme a los métodos oficiales de análisis de la AOAC [23]. El

Índice de Polifenoles Totales (IPT) se estimó como la absorbancia a 280 nm, la Intensidad de Color (IC) se calculó como la suma de la absorbancia a 420, 520 y 620 nm y el matiz o tonalidad (T) se expresó como la tasa de A420/A520 (absorbancia a 420 nm/absorbancia a 520 nm) [24].

2.2.3. Análisis de proantocianidinas precipitables con proteínas (PPAs) en vinos.

Las proantocianidinas precipitables con proteína (PPAs) se estimaron mediante la metodología descrita en el capítulo 2.3.5 del Capítulo 2 de la Sección II de acuerdo al método descrito en la bibliografía [25].

2.2.4. Determinación del índice de etanol en vinos.

El índice de etanol estima el porcentaje de taninos unidos a polisacáridos. El método llevado a cabo para su estimación es el mismo que se describe en otros trabajos [26].

2.2.5. Fraccionamiento de los polifenoles del vino mediante cromatografía de permeación en gel (GPC)-SPE.

El fraccionamiento de los vinos se realizó mediante la metodología descrita en el apartado 2.3.2 del Capítulo 2 de la Sección 2 de esta memoria. De manera que se obtuvieron dos fracciones: Fracción 1 (F1) y Fracción 2 (F2). La F1 contenía los compuestos polifenólicos de bajo peso molecular (< trómeros) y la F2 los de mayor PM (\geq trómeros)

La Fracción 2 (F2) se evaporó parcialmente mediante vacío hasta conseguir un volumen de unos 7 mL aproximadamente, con el fin de asegurar la total evaporación del metanol de la muestra.

Con el objetivo de eliminar el agua residual (resulta ser un interferente en determinados análisis) sin una precipitación irreversible de las proantocianidinas de alto peso molecular se llevó a cabo el proceso de extracción en fase sólida (SPE). Para ello, se utilizó un dispositivo Visiprep SPE a vacío con manorreductor con capacidad para procesar 12 tubos simultáneamente suministrado por Supelco (Bellefonte, PA, EEUU). Los cartuchos empleados fueron suministrados por Scharlau (Barcelona, España) de la clase Bond Elut LRC-C18 int, de 500 mg. En primer lugar se realizó el acondicionamiento de la fase que se realizó pasando 20 mL de metanol y seguidamente 40 mL de agua ultrapura Milli Q. Una vez acondicionada la fase se introdujeron las muestras (F2 evaporada) y se sometieron a un proceso de secado durante 20 min. Una vez secas se

eluyeron con 9 mL de metanol, se enrasaron a 10 mL y se conservaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

2.2.6. Análisis de compuestos de bajo peso molecular por UPLC-MS en la F1.

El análisis cromatográfico de compuestos fenólicos de bajo peso molecular se llevó a cabo en la F1 obtenida de la GPC mediante la metodología descrita en el apartado 2.2.3 del Capítulo 3 de la Sección 2 de esta memoria. Los estándares utilizados para la cuantificación por UPLC-MS de los polifenoles, así como los iones moleculares empelados para la cuantificación e identificación respectivamente se muestran en la Tabla II-1.

2.2.7. Análisis de ácidos orgánicos mediante UPLC-MS en la F1.

El análisis de los ácidos orgánicos se realizó mediante UPLC con el equipo descrito en el apartado 2.2.3 del Capítulo 3 de la Sección 2 de esta memoria.

En primer lugar las fracciones (F1) se diluyeron 1/10 con agua ultrapura y fueron decoloradas con carbón activo con el fin de eliminar interferencias. Una vez decoloradas, se filtraron con filtros de 0.22 µm y se inyectaron directamente en el sistema UPLC con una columna de fase reversa BEH C18, de tamaño de partícula 1.7 µm, 2.1 mm de diámetro interno y 100 mm (Waters, Milford, MA, USA), la cual se mantuvo termostata a una temperatura de 40 °C. El flujo de la fase móvil fue 0.45 mL min⁻¹. El volumen de inyección fue 7.5 µL. La elución se llevó a cabo con un régimen isocrático durante 5 minutos y usando como eluyente agua/ácido fórmico (0.1%). La cuantificación fue realizada con los estándares correspondientes y expresada en g L⁻¹ de cada uno de ellos.

2.2.8. Determinación del contenido en proantocianidinas (TPAs) poliméricas mediante el índice de la vainillina en la F2.

La determinación de las proantocianidinas totales se llevó a cabo mediante el ensayo de la vainillina que se realizó tal y como se describe en el apartado 2.3.3 del Capítulo 2 de la Sección 2 de esta memoria de acuerdo con el método descrito en la bibliografía consultada [27]. Esta determinación se realizó en la segunda fracción obtenida a partir de la GPC-SPE.

2.2.9. Determinación del grado medio de polimerización de la F2.

La determinación de la composición, concentración y grado medio de polimerización de las proantocianidinas se llevó a cabo mediante la reacción de despolimerización

Tabla II-1. Estándares utilizados para la cuantificación de los polifenoles analizados por UPLC-MS.

| Tiempo retención (min) | Estándar | [M-H] ⁻ (m/z) | Fragmentos (m/z) | Formula molecular |
|--------------------------------|--|--------------------------|------------------|---|
| ácidos y estilbenos | | | | |
| 0.97 | ácido <i>c</i> -aconítico | 173.00 | 129 | C ₆ H ₅ O ₆ |
| 1.15 | ácido <i>t</i> -aconítico | 193.00 | 129 | C ₆ H ₅ O ₆ |
| 1.40 | ácido <i>t</i> -gálico | 169.01 | 125 | C ₇ H ₅ O ₅ |
| 2.12 | ácido protocatéquico | 153.01 | 109 | C ₇ H ₅ O ₄ |
| 3.62 | ácido vanílico | 167.03 | 152 | C ₉ H ₉ O ₅ |
| 4.23 | ácido siríngico | 197.04 | 182 | C ₉ H ₁₀ O ₅ |
| 5.96 | éster etílico del ácido gálico | 197.04 | 169 | C ₉ H ₁₀ O ₅ |
| 6.92 | ácido elágico | 300.99 | 229 | C ₁₄ H ₆ O ₈ |
| 8.30 | éster etílico del ácido protocatéquico | 181.04 | 153 | C ₉ H ₉ O ₄ |
| 8.69 | <i>c</i> -resveratrol | 227.07 | 143 | C ₁₄ H ₁₁ O ₃ |
| 10.13 | <i>t</i> -resveratrol | 227.07 | 143 | C ₁₄ H ₁₁ O ₃ |
| ácidos hidroxicinámicos | | | | |
| 2.32 | ácido <i>c</i> -caftárico | 311.04 | 179 | C ₁₃ H ₁₂ O ₉ |
| 2.36 | ácido <i>t</i> -caftárico | 311.02 | 179 | C ₁₃ H ₁₂ O ₉ |
| 3.08 | ácido <i>p</i> -cutárico | 295.04 | 119 | C ₁₃ H ₁₂ O ₈ |
| 3.67 | ácido <i>t</i> -caféico | 179.03 | 135 | C ₉ H ₇ O ₄ |
| 3.84 | ácido <i>t</i> -ferúlico | 193.04 | 178 | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ |
| 5.51 | ácido <i>c-p</i> -cumárico | 163.03 | 119 | C ₉ H ₇ O ₃ |
| 6.28 | ácido <i>t-p</i> -cumárico | 163.03 | 119 | C ₉ H ₇ O ₃ |
| 11.86 | éster etílico del ácido caféico | 207.21 | 179 | C ₁₁ H ₁₂ O ₄ |
| flavonoles | | | | |
| 2.01 | procianidina C1-trimero | 865.16 | 289 | C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈ |
| 2.73 | procianidina B1 | 577.13 | 289 | C ₃₀ H ₂₃ O ₁₂ |
| 2.78 | epigalocatequina | 305.06 | 203 | C ₁₅ H ₁₃ O ₇ |
| 3.15 | catequina | 289.07 | 203 | C ₁₅ H ₁₃ O ₆ |
| 3.19 | procianidina C2-trimero | 865.16 | 289 | C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈ |
| 4.15 | procianidina B2 | 577.13 | 451 | C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ |
| 4.97 | epicatequina | 289.07 | 203 | C ₁₅ H ₁₃ O ₆ |
| 5.02 | galato de epicatequina | 457.07 | 289 | C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁ |
| 6.11 | procianidina B3 | 577.13 | 289 | C ₃₀ H ₂₅ O ₁₂ |
| 7.09 | galato de catequina | 441.07 | 289 | C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀ |
| 7.22 | galato de epigalocatequina | 441.07 | 305 | C ₂₂ H ₁₈ O ₁₀ |
| 7.47 | procianidina A2 | 575.11 | 289 | C ₃₀ H ₂₃ O ₁₂ |
| flavonoles | | | | |
| 5.23 | miricetina-3- <i>O</i> -glucósido | 449.11 | 317 | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ |
| 7.25 | quercetin-3- <i>O</i> -rutinósido | 609.13 | 300 | C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ |
| 7.28 | quercetin-3- <i>O</i> -galactósido | 463.08 | 300 | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ |
| 7.36 | quercetin-3- <i>O</i> -glucurónido | 477.06 | 301 | C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃ |
| 7.44 | quercetin-3- <i>O</i> -glucósido | 463.08 | 301 | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ |
| 8.08 | kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido | 447.08 | 287 | C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ |
| 8.22 | siringentin-3- <i>O</i> -glucósido | 507.10 | 347 | C ₂₃ H ₂₃ O ₁₃ |
| 8.27 | isoharmnetin-3- <i>O</i> -glucósido | 477.09 | 315 | C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂ |
| 8.30 | siringentin-3- <i>O</i> -galactósido | 507.10 | 347 | C ₂₃ H ₂₄ O ₁₃ |
| 8.33 | miricetina | 317.02 | 151 | C ₁₅ H ₉ O ₈ |
| 9.74 | quercetina | 301.03 | 151 | C ₁₅ H ₉ O ₇ |
| 11.15 | kaempferol | 285.03 | 117 | C ₁₅ H ₉ O ₆ |
| 11.51 | isorhamnetina | 315.04 | 107 | C ₁₆ H ₁₁ O ₇ |

catalizada en medio ácido y en presencia de tolueno- α -tiol de acuerdo al método propuesto por Labarbe y col. [28], incluyendo algunas modificaciones [29]. Para ello, Se mezclaron 100 μ L de la fracción proantocianica (F2) con el reactivo tiolítico, (5 % v/v) de tolueno- α -tiol en metanol acidificado con HCl (0.2 N) en una proporción (1:1). La mezcla se agitó y calentó en un baño de agua a 60 °C durante 10 min. Las unidades monoméricas terminales y de extensión fueron analizadas mediante UPLC-MS, adaptando el método de HPLC descrito previamente por Monagas y col. [30].

Las unidades monoméricas terminales y de extensión se analizaron mediante el equipo UPLC descrito en el apartado 2.2.3 del Capítulo 3 de la Sección 2 de esta memoria. Igualmente, la separación y cuantificación se llevó a cabo mediante el método descrito en el apartado 2.2.3 del Capítulo 3 de la Sección 2 de esta memoria. El grado medio de polimerización (mDP) se calculó como el cociente molar de las unidades totales con respecto a las unidades terminales. Todas las muestras se analizaron por duplicado.

2.3. Análisis estadístico.

Todos los análisis estadísticos se han realizado usando el paquete estadístico SPSS, versión 19 para Windows. El efecto del envejecimiento y oxígeno se evaluó mediante el análisis de ANOVA de un factor. Los niveles de significación se establecieron en el 95% ($P < 0.05$).

El análisis de componentes principales (PCA) y el análisis clúster jerárquico (HCA) se realizó con el programa SPAD, versión 5.5 (Montreal, Francia).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización química de los vinos antes del envejecimiento.

La gran diversidad de orígenes, añadas, variedades y elaboraciones de los vinos seleccionados permite tener una muestra muy heterogénea. Esto puede observarse en los resultados que se muestran en las Tablas P-1 y II-2. Resulta interesante anotar que, sorprendentemente y en contra de lo observado en la bibliografía [29, 31], el IPT en este grupo de vinos no estaba correlacionado con el contenido TPAs ($F = 0.34$, $P = 0.56$). Sin embargo, sí se ha encontrado correlación con las PPAAs ($F = 7.80$; $P = 0.014$), las cuales a su vez, se encuentran correlacionadas con las TPAs ($F = 5.25$; $P = 0.037$). Por otro lado, el IPT se encuentra positivamente correlacionado con los azúcares reductores y el grado alcohólico ($F = 9.19$, 7.24 ; $P = 0.008$, 0.017 , respectivamente). Estas correlaciones resultan esperables, ya que el alcohol es un potente disolvente de los polifenoles y la mayor extracción de polifenoles durante la maceración se produce con niveles altos de etanol [32]. Además, vendimias más maduras y con mayor concentración de polifenoles implican por lo general mayor grado alcohólico probable. Por otro lado, la correlación con los azúcares reductores puede explicarse porque los vinos con mayor grado alcohólico suelen ser también los que mayor concentración de azúcares reductores contienen. El etanol resulta tóxico para la levadura y un mayor grado alcohólico hace que el medio resulte aún más hostil haciendo más difícil el agotamiento de los azúcares.

Por otra parte, se han observado correlaciones negativas entre el ácido láctico, el ácido fumárico, el ácido tartárico, el ácido cítrico y el IPT ($F = 5.42$, 5.29 , 4.29 , 3.21 ; $P = 0.035$, 0.047 , 0.057 y 0.089 , respectivamente), indicando que vinos con mayor concentración de ácidos (generalmente procedentes de vendimias menos maduras) tienen una menor cantidad de polifenoles (IPT). En esta línea e indicando lo mismo, también se ha observado una correlación significativa negativa entre la concentración de ácido succínico y las TPAs ($F = 12.21$; $P > 0.001$). El ácido succínico es un ácido secundario que no existe como tal en la uva sino que procede de la fermentación [27], algunos autores apuntan que su formación puede proceder en parte de la degradación de parte del ácido málico durante la fermentación [33], por lo que en vendimias verdes, donde la concentración de ácido málico es mayor puede existir una mayor formación de este ácido.

Evolución de la composición no volátil de los vinos tintos durante la etapa de embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno.

Tabla II-2. Concentración de los vinos en ácido tartárico (TH2), ácido láctico (LH2), ácido fumárico, ácido cítrico, ácido succínico, glicerol, acetaldehído (acetal), sulfuroso libre (SO2L), sulfuroso combinado (SO2C), grado medio de polimerización (MDP), pigmentos poliméricos de bajo peso molecular (SPP), pigmentos poliméricos de alto peso molecular (LPP) e índice de etanol (I.EtOH) antes del envejecimiento.

| Vino-código | SO ₂ L ^a | SO ₂ C ^a | TH ₂ ^b | LH ₂ ^b | fumárico ^a | cítrico ^a | succínico ^a | glicerol ^b | acetal ^a | MDP | EtOH | TPAs ^a | PPAs ^b | SPP | LPP |
|--------------|--------------------------------|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|------|-------|-------------------|-------------------|------|------|
| MC_R09 | 15.2 | 35.2 | 2.37 | 1.59 | 202.38 | 80.0 | 252.24 | 8.18 | 19.01 | 4.93 | 9.40 | 280.81 | 0.36 | 0.23 | 0.32 |
| BE_R10 | 18.4 | 33.6 | 3.41 | 1.73 | 350.85 | 400.72 | 250.09 | 8.93 | 17.45 | 4.66 | 11.49 | 182.27 | 0.28 | 0.24 | 0.24 |
| RB_R06 | 8.0 | 67.2 | 2.29 | 1.18 | 474.88 | 312.81 | 218.49 | 8.10 | 27.35 | 4.35 | 11.30 | 199.32 | 0.35 | 0.22 | 0.40 |
| CH_R10 | 7.2 | 16.0 | 2.19 | 2.58 | 29.76 | 9.86 | 238.88 | 6.15 | 27.61 | 3.67 | 10.85 | 404.92 | 0.07 | 0.43 | 0.36 |
| SC_R10 | 23.2 | 33.6 | 2.37 | 2.03 | 50.98 | 20.32 | 153.10 | 5.10 | 22.27 | 3.51 | 10.14 | 282.41 | 0.09 | 0.25 | 0.30 |
| RN_R09 | 29.1 | 76.8 | 3.25 | 1.66 | 61.99 | 2.21 | 287.23 | 8.48 | 31.51 | 2.90 | 9.96 | 231.70 | 0.32 | 0.23 | 0.35 |
| AR_A08 | 23.6 | 32.0 | 3.42 | 2.19 | 25.28 | 38.92 | 243.45 | 7.28 | 19.79 | 3.39 | 11.14 | 388.41 | 0.39 | 0.38 | 0.26 |
| RM_R10 | 17.1 | 89.2 | 3.90 | 0.79 | 38.91 | 41.04 | 264.84 | 9.45 | 46.09 | 2.90 | 8.80 | 146.27 | 0.41 | 0.45 | 0.48 |
| GC_R10 | 17.6 | 51.2 | 3.09 | 0.78 | 16.85 | 57.32 | 222.92 | 8.55 | 28.65 | 2.58 | 7.70 | 176.95 | 0.46 | 0.50 | 0.52 |
| MG_V05 | 8.0 | 25.6 | 0.86 | 0.80 | 26.99 | 61.34 | 215.89 | 9.23 | 19.28 | 2.93 | 7.34 | 271.76 | 0.58 | 1.17 | 0.28 |
| SO_C07 | 8.8 | 48.0 | 1.78 | 1.32 | 11.55 | 146.83 | 169.09 | 7.88 | 22.94 | 2.67 | 7.93 | 161.50 | 0.35 | 0.23 | 0.31 |
| AY_C05 | 6.4 | 58.4 | 2.02 | 0.95 | 8.61 | 32.13 | 185.87 | 6.15 | 28.24 | 2.20 | 9.22 | 285.08 | 0.62 | 0.60 | 0.35 |
| CD_C10 | 19.6 | 64.4 | 1.33 | 1.20 | 22.67 | 3.69 | 173.14 | 6.53 | 21.61 | 2.93 | 8.56 | 576.97 | 0.38 | 0.77 | 0.49 |
| CT_B07 | 15.6 | 64.0 | 2.82 | 0.73 | 35.15 | 28.62 | 112.42 | 7.35 | 28.13 | 2.88 | 7.59 | 304.25 | 0.27 | 0.61 | 0.40 |
| BO_B10 | 8.0 | 19.2 | 2.82 | 1.07 | 6.24 | 52.49 | 196.70 | 8.63 | 22.66 | 2.69 | 7.21 | 287.21 | 0.20 | 0.66 | 0.32 |
| CZ_D08 | 11.2 | 28.8 | 0.89 | 2.00 | 43.43 | 63.84 | 186.50 | 5.78 | 24.22 | 2.35 | 7.14 | 723.45 | 0.29 | 0.54 | 0.32 |
| max | 29.1 | 89.2 | 3.90 | 2.58 | 474.88 | 400.72 | 287.23 | 9.45 | 46.09 | 4.93 | 11.49 | 723.45 | 0.62 | 1.17 | 0.52 |
| media | 14.8 | 46.4 | 2.43 | 1.41 | 87.51 | 87.91 | 215.29 | 7.61 | 25.43 | 3.22 | 9.11 | 306.46 | 0.34 | 0.47 | 0.36 |
| min | 6.4 | 16.0 | 0.86 | 0.73 | 6.24 | 6.24 | 112.42 | 5.10 | 17.45 | 2.20 | 7.14 | 146.27 | 0.07 | 0.22 | 0.24 |

^amg L⁻¹
^bg L⁻¹

Finalmente, existe una correlación negativa altamente significativa entre el mDP y el IPT ($F = 20.55$; $P < 0.001$), indicando que los vinos con mayor IPT en este grupo de vinos son también los que menor mDP presentan. Este hecho, se debe a que muchos de los vinos de este estudio están orientados a un consumo como vinos jóvenes y éstos, por lo general, se caracterizan por ser vinos más ligeros, frescos y con menor IPT. Por otro lado, los vinos con mayor IPT de este estudio pertenecen a las añadas más viejas y como se ha puesto de manifiesto en la bibliografía el mDP decrece con la edad del vino [29, 34].

Por otra parte, la acidez total (ATT) como se esperaba, se encuentra inversamente correlacionada con el pH ($F = 20.87$; $P < 0.001$). Igualmente, se encuentra correlacionada con la concentración de ácido tartárico ($F = 5.32$; $P = 0.043$), ácido mayoritario de los vinos [27]. Además, también se encuentra correlacionada con la concentración de anhídrido sulfuroso combinado ($F = 9.90$; $P = 0.007$) y con la concentración de ácidos y derivados ($F = 6.65$; $P = 0.021$), mostrando la contribución de este tipo de compuestos a la acidez del vino.

En la Tabla II-3 se muestra la concentración máxima, media y mínima de los compuestos de bajo peso molecular (monómeros y dímeros) analizados por UPLC-MS. Con el fin de simplificar la presentación de los resultados y la discusión de los mismos, los compuestos se han agrupado en cuatro categorías diferentes: ácidos y derivados, ácidos hidroxicinámicos, flavanoles y flavonoles como se muestra en la Tabla II-4. Al igual para los parámetros de las Tablas P-I y II-2 los vinos cubren un amplio rango de concentración en las cuatro categorías, lo que era de interés con el fin de poder estudiar distintas evoluciones.

Con el objetivo de evaluar la similitud entre las 16 muestras de estudio, se calculó un PCA con los parámetros de las Tablas P-1, II-2 y II-4. La Figura II-2 muestra el plano bidimensional donde se ilustra la distribución de las muestras sobre las dos primeras dimensiones (a), así como la proyección de las variables sobre el plano bidimensional (b). La primera dimensión explica casi el 29% de la varianza original y esta principalmente caracterizada por el IPT (92%), la concentración de SPP (80%) y los azúcares reductores (74%) de manera positiva y por el mDP (77%) y el índice de etanol (76%) de manera negativa. El IPT tiene un peso importante en la PC1, situándose en la parte derecha del plano los vinos con mayor IPT y a la izquierda los de menor IPT, sin embargo hay vinos proyectados en todo el eje de la primera componente. Igualmente, se sitúan en la parte derecha los vinos con un menor mDP.

Tabla II-3. Cuantificación de los polifenoles de bajo peso molecular analizados por UPLC-MS en la F1 de la GPC. Concentración máxima (máx), media y mínima (mín) del grupo de vinos.

| Tiempo retención (min) | Estándar | máx. | media | mín. | |
|--------------------------------|--|--------------------------------------|--------|--------|--------|
| ácidos y estilbenos | | | | | |
| 0.97 | ácido <i>c</i> -aconítico | 3.90 | 3.10 | 2.50 | |
| 1.15 | ácido <i>t</i> -aconítico | 10.30 | 8.70 | 5.10 | |
| | relación <i>trans/cis</i> aconítico | 3.13 | 1.47 | 0.25 | |
| 1.40 | ácido <i>t</i> -gálico | 146.8 | 63.41 | 35.50 | |
| 2.12 | ácido protocatéquico | 16.6 | 2.51 | 1.32 | |
| 3.62 | ácido vaníllico | 11.50 | 4.90 | 4.90 | |
| 4.23 | ácido siringico | 11.40 | 7.39 | 3.88 | |
| 5.96 | éster etílico del ácido gálico | 177.0 | 81.38 | 39.60 | |
| 6.92 | ácido elágico | 6.72 | 1.65 | < L.D | |
| 8.30 | éster etílico del ácido protocatéquico | 1.25 | 0.20 | 0.05 | |
| 8.69 | <i>c</i> -resveratrol | 1.50 | 0.22 | < L.D | |
| 10.13 | <i>t</i> -resveratrol | 2.02 | 0.43 | < L.D | |
| ácidos hidroxicinámicos | | | | | |
| 2.32 | ácido <i>c</i> -caftárico | 0.31 | 0.16 | 0.04 | |
| 2.36 | ácido <i>t</i> -caftárico | 105.50 | 55.02 | 14.83 | |
| 3.08 | ácido <i>p</i> -cutárico | 44.30 | 17.27 | 5.69 | |
| 3.67 | ácido <i>t</i> -caféico | 13.7 | 5.40 | 3.28 | |
| 3.84 | ácido <i>t</i> -ferúlico | 3.75 | 1.30 | 0.72 | |
| 5.51 | ácido <i>c-p</i> -cumárico | 1.22 | 0.10 | < L.D. | |
| 6.28 | ácido <i>t-p</i> -cumárico | 4.42 | 1.57 | 0.35 | |
| 11.86 | éster etílico del ácido caféico | 5.30 | 1.14 | < L.D | |
| 11.89 | Éster etílico del ácido cumárico | 1.83 | 0.69 | 0.08 | |
| Flavanoles | | | | | |
| 0 | 2.01 | procianidina C1-trimero | 1.91 | 0.72 | 0.32 |
| | 2.73 | procianidina B1 | 36.70 | 27.40 | 16.50 |
| | 2.78 | epigallocatequina | 7.33 | 1.42 | 0.24 |
| | 3.15 | catequina | 24.6 | 15.1 | 8.72 |
| | 3.19 | procianidina C2-trimero | 1.32 | 0.82 | 0.47 |
| | 4.15 | procianidina B2 | 23.8 | 8.40 | 2.92 |
| | 4.97 | epicatequina | 22.35 | 6.48 | 2.64 |
| | 5.02 | galato de epicatequina | < L.D. | < L.D | < L.D |
| | 6.11 | procianidina B3 | 1.81 | 1.40 | 0.86 |
| | 7.09 | galato de catequina | 0.33 | 0.00 | < L.D |
| | 7.22 | galato de epigallocatequina | 4.29 | 0.50 | < L.D |
| | 7.47 | procianidina A2 | 1.36 | 0.37 | < L.D |
| Flavonoles | | | | | |
| | 5.23 | miricetina-3- <i>O</i> -glucósido | 0.44 | 0.26 | 0.17 |
| | 7.25 | quercetin-3- <i>O</i> -rutinósido | < L.D. | < L.D | < L.D |
| | 7.28 | quercetin-3- <i>O</i> -galactósido | 0.51 | 0.17 | < L.D |
| | 7.36 | quercetin-3- <i>O</i> -glucurónido | 18.21 | 7.52 | 2.34 |
| | 7.44 | quercetin-3- <i>O</i> -glucósido | 2.43 | 0.22 | < L.D |
| | 8.08 | kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido | 0.25 | 0.07 | < L.D. |
| | 8.22 | siringentin-3- <i>O</i> -glucósido | 0.29 | 0.09 | < L.D |
| | 8.27 | isoharmnetin-3- <i>O</i> -glucósido | 0.75 | 0.13 | < L.D |
| | 8.30 | siringentin-3- <i>O</i> -galactósido | < L.D. | < L.D | < L.D |
| | 8.33 | miricetina | 8.37 | 5.59 | 1.15 |
| | 9.74 | quercetina | 9.55 | 4.40 | 0.15 |
| | 11.15 | kaempferol | 1.25 | 0.38 | < L.D |
| | 11.51 | isoharmnetin | 0.54 | 0.14 | < L.D |

< L.D.: por debajo del límite de detección

La componente 2 que explica aproximadamente el 19% de la varianza original esta principalmente caracterizada por el contenido en glicerol (73%) y de ácido succínico (71%) de manera positiva y por la concentración de TPAs (77%) de manera negativa. De manera que los vinos con mayor concentración de TPAs se sitúan en la parte inferior del plano, siendo también los vinos con menor concentración de glicerol y ácido succínico.

La varianza que acumula la 3 tercera componente (16%) no es despreciable frente a la de la componente 2. Debido a esto, a la baja varianza que acumulan las dos primeras componentes del PCA y que no aparecen de grupos de vinos fácilmente diferenciables en su composición química, se realizó un análisis clúster jerárquico (HCA). Para la realización del HCA se tuvieron en cuenta las cinco primeras componentes del PCA que acumulan prácticamente el 80 % de la varianza original, de acuerdo a la ley Kaiser (valor propio > 1).

Tabla II-4. Concentración de flavanoles, flavonoles, ácidos y derivados y ácidos hidroxicinámicos de los vinos antes del envejecimiento.

| vinos | flavanoles (mg L ⁻¹) | flavonoles (mg L ⁻¹) | Ácidos y derivados (mg L ⁻¹) | hidroxicinámicos (mg L ⁻¹) | Total polifenoles monómeros (mg L ⁻¹) |
|--------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|---|---|
| MC_R09 | 31.09 | 10.27 | 73.21 | 56.42 | 170.99 |
| BE_R10 | 19.52 | 9.24 | 48.62 | 42.25 | 119.63 |
| RB_R06 | 17.39 | 3.00 | 110.85 | 72.85 | 204.09 |
| CH_R10 | 32.99 | 12.03 | 84.58 | 137.20 | 266.80 |
| SC_R10 | 40.72 | 11.03 | 65.05 | 73.18 | 189.98 |
| RN_R09 | 38.44 | 6.73 | 92.95 | 65.97 | 204.09 |
| AR_A08 | 44.75 | 7.39 | 84.99 | 73.07 | 210.20 |
| RM_R10 | 34.50 | 16.13 | 76.91 | 34.83 | 162.37 |
| GC_B10 | 36.36 | 25.19 | 113.07 | 124.95 | 299.57 |
| MG_V05 | 22.76 | 14.04 | 85.79 | 93.35 | 215.94 |
| SO_C07 | 17.67 | 7.71 | 90.91 | 65.07 | 181.36 |
| AY_C05 | 77.32 | 9.58 | 148.82 | 46.79 | 282.51 |
| CD_C10 | 45.72 | 23.90 | 78.21 | 69.47 | 217.30 |
| CT_B07 | 30.44 | 13.74 | 109.35 | 114.03 | 267.56 |
| BO_B10 | 55.71 | 24.11 | 87.61 | 108.85 | 276.28 |
| CZ_D07 | 32.25 | 6.99 | 93.27 | 90.61 | 223.12 |
| máx | 77.32 | 25.19 | 148.82 | 137.20 | 299.57 |
| media | 36.10 | 12.57 | 90.26 | 79.30 | 218.24 |
| min | 17.39 | 3.00 | 48.62 | 34.83 | 119.63 |

En la Figura II-3 se muestra el diagrama de árbol obtenido a partir del HCA. Se decidió realizar el corte para cuatro grupos con el objetivo de retener la mayor información posible y simplificar los resultados obtenidos. La Tabla II-5 muestra los parámetros que mejor caracterizaron cada clúster y en la Tabla II-6 se muestra la composición media para cada clúster. Para cada grupo, el vino más cercano al centro de

Evolución de la composición no volátil de los vinos tintos durante la etapa de embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno.

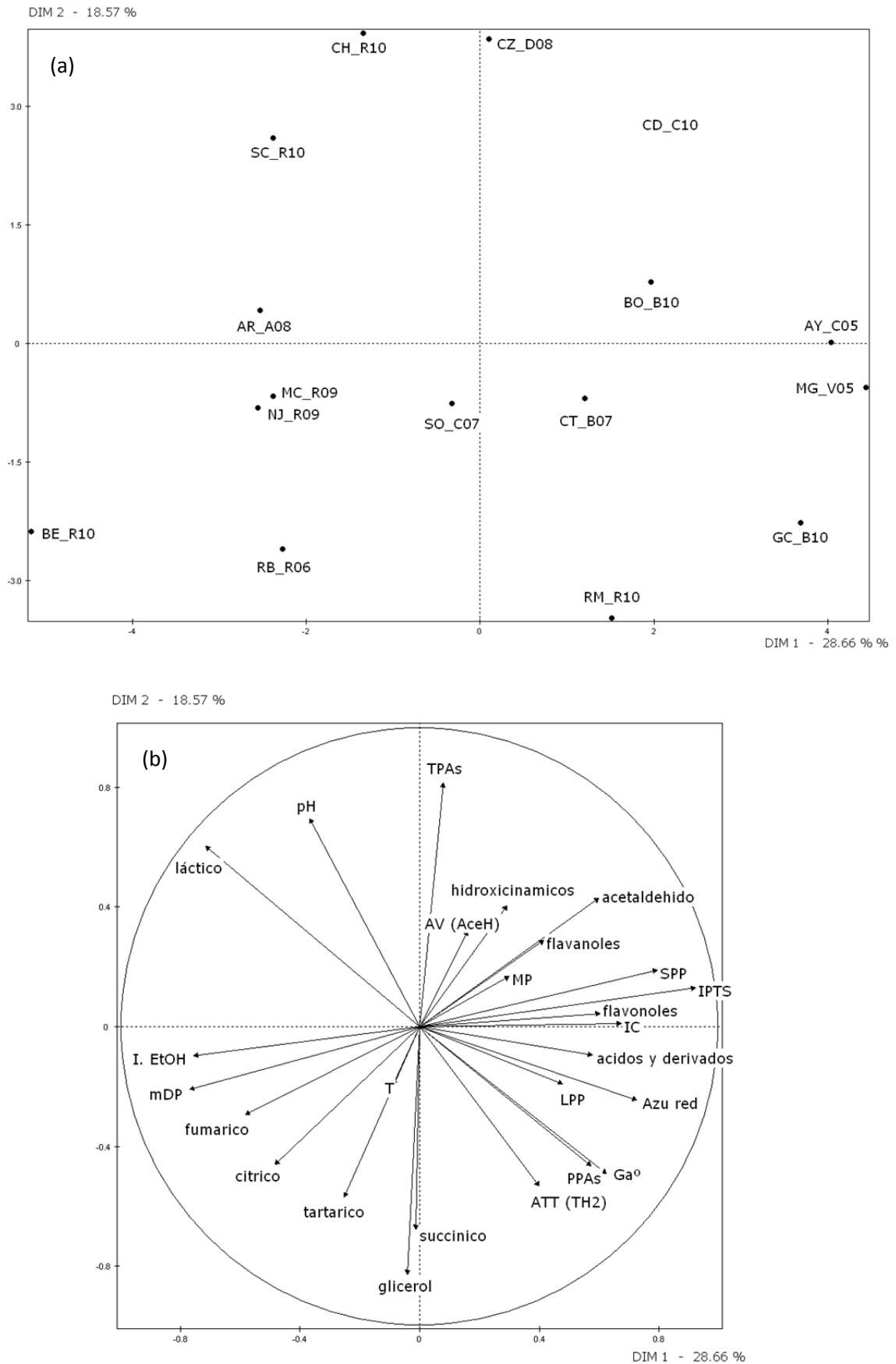


Figura II-2. Proyección de las muestras (a) y variables (b) sobre el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del análisis de componentes principales (PCA) antes del envejecimiento.

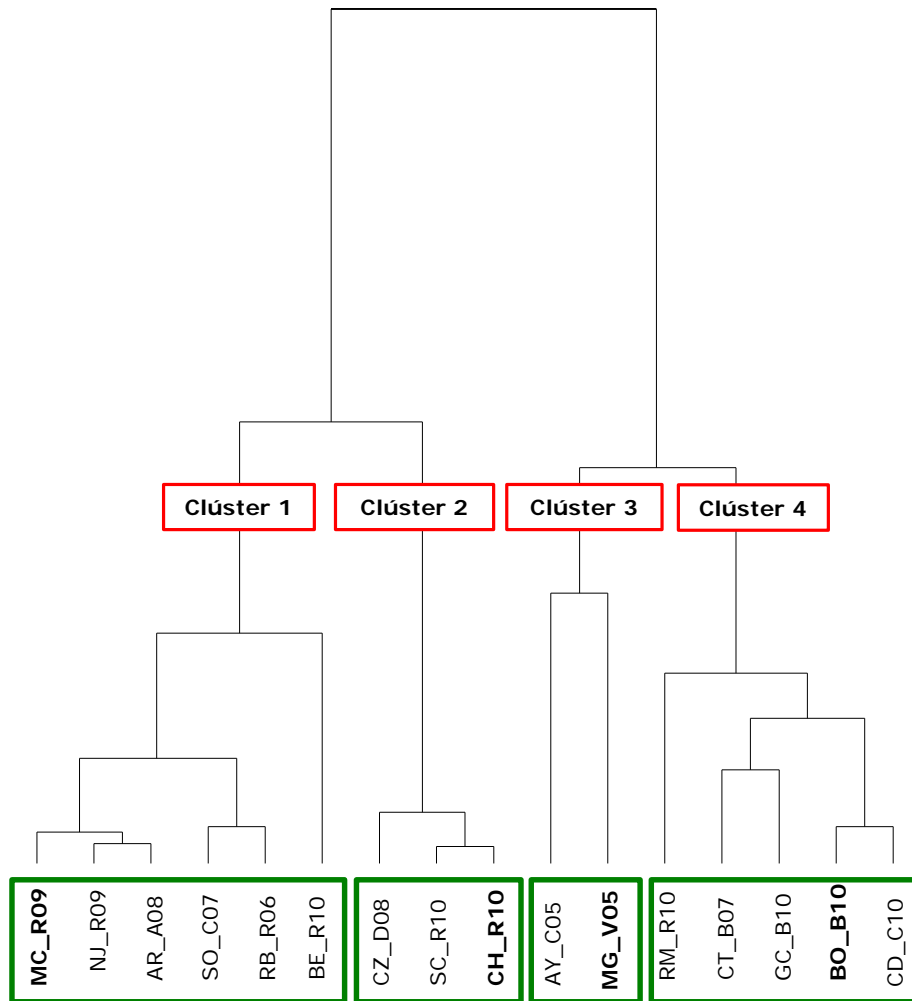


Figura II-3 Diagrama de árbol y clústeres obtenidos a partir del análisis clúster (HCA). Los centroides de cada clúster están marcados en negrita.

gravedad se identificó como el ejemplo más típico de la agrupación. Estas muestras son MC_R09 (clúster 1), CH_R10 (clúster 2), MG_V05 (clúster 3) y BO_B10_0 (clúster 4).

Como se puede observar en las Tabla II-5 y II-6 los vinos del clúster 1 se caracterizan por tener un mayor mDP y por un bajo IPT, baja IC, baja concentración de acetaldehído, baja concentración de SPP y baja concentración de flavonoles. Además, los vinos de este clúster presentan un grado alcohólico y una concentración de flavonoles por debajo de la media y contrariamente, presentan concentraciones superiores tanto de ácido láctico como de ácido tartárico.

El clúster 2 se caracteriza por una alta concentración de ácido láctico, alto pH y por una baja concentración de PPA y glicerol. Además presentan una baja concentración de azúcares reductores.

Tabla II-5. Clústeres generados a partir del HCA, vinos y parámetros químicos que caracterizan cada uno ($P < 0.05$).

| clúster | vino | parámetros > media ^a | parámetros < media ^b |
|---------|--|--|--|
| 1 | MC_R09, NJ_R09, AR_A08, SO_C07, RB_R06, BE_R10 | mDP, ácido láctico, ácido tartárico | IPTs, IC, acetaldehído, SPP, flavonoles, GA°, flavonoles |
| 2 | CZ_D08, SC_R10, CH_R10 | ácido láctico, pH | PPAs, glicerol, Az. Red. |
| 3 | AY_C05, MG_V05 | GA°, IPTs, PPAs, SPP, glicerol, Az. Red., IC, flavanoles, acetaldehído | mDP, ácido láctico, ácido tartárico |
| 4 | RM_R10, CT_B07, GC_B10, BO_B10, CD_C10 | Flavonoles, SPP, GA°, flavonoles, ácido tartárico, IC | T, ácido láctico |

^aParámetros que presentan valores significativamente mayores que la media.

^bParámetros que presentan valores significativamente menores que la media.

El clúster 3, formado por los dos vinos más viejos, se caracteriza por una alta concentración de SPP, PPAs y glicerol, un alto IPT y por un bajo mDP. Además, son los vinos que presentan mayor grado alcohólico (GA°), mayor concentración de azúcares reductores, mayor IC, mayor concentración de flavanoles y mayor concentración de acetaldehído. Contrariamente son los vinos que menor concentración de ácido láctico y tartárico presentan.

Finalmente, el clúster 4 está caracterizado por una alta concentración de flavonoles y SPP, por una baja T y una baja concentración de ácido láctico. Además, presentan un elevado GA°, una alta concentración de flavanoles, ácido tartárico e IC.

Tabla III -6. Composición química global de los 16 vinos iniciales y de cada clúster obtenido del HCA por separado. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los clústeres. ($P < 0.05$)

| Vino- | pH | AV (g L ⁻¹) | ATT (g L ⁻¹) | AR (g L ⁻¹) | GA° (v/v) | IPT (u.a) | IC (u.a) | T | LH ₂ | TH ₂ | Fuma. | cítrico | Succi. | gli | Acet. | SO _{2L} | SO _{2c} | MDP | |
|------------------|--------------|-------------------------------------|------------------------------------|----------------------------|-----------------------|---|---|--|---|-----------------|-------|--------------|--------|-------------|--------------|------------------|------------------|-------------|--|
| global | 3.61 | 0.54 | 5.33 | 2.58 | 14.09 | 60.3 | 11.3 | 0.77 | 1.35 | 2.56 | 36.42 | 86.40 | 209.60 | 6.7 | 37.6 | 14.8 | 46.4 | 7.9 | |
| Clúster 1 | 3.61b | 0.56 | 5.33 | 2.17ab | 13.85b | 50.8c | 8.2b | 0.81a | 1.56a | 2.78a | 59.56 | 167.30a | 228.70 | 7.2a | 26.9b | 17.2 | 48.8 | 9.3a | |
| Clúster 2 | 3.76a | 0.56 | 4.87 | 1.85b | 13.64ab | 60.0bc | 11.3ab | 0.74ab | 2.08a | 2.02ab | 26.29 | 26.63b | 171.07 | 5.5b | 43.6ab | 13.9 | 26.1 | 7.8ab | |
| Clúster 3 | 3.58b | 0.63 | 5.38 | 3.81a | 14.76a | 78.9a | 15.0a | 0.86a | 0.82b | 1.72b | 15.28 | 57.63b | 249.97 | 6.5ab | 54.5a | 7.2 | 42.0 | 5.0b | |
| Clúster 4 | 3.55b | 0.47 | 5.60 | 3.02ab | 14.37ab | 64.4b | 13.6ab | 0.69b | 0.88b | 3.01a | 23.17 | 36.71b | 193.65 | 7.0ab | 39.9ab | 15.6 | 57.6 | 7.6ab | |
| | | TPAs (mg L⁻¹) | PPAs (g L⁻¹) | SPP (U.A.) | LPP (U.A.) | flavonoles (mg L⁻¹) | flavonoles (mg L⁻¹) | benzoicos (mg L⁻¹) | hidroxicinámicos (mg L⁻¹) | EtOH | | | | | | | | | |
| global | | 305.33 | 0.34 | 0.47 | 0.37 | 36.10 | 12.57 | 90.26 | 79.30 | 9.1 | | | | | | | | | |
| Clúster 1 | | 237.67 | 0.34bc | 0.25b | 0.31 | 28.14b | 7.39b | 83.59 | 62.60 | 10.2 | | | | | | | | | |
| Clúster 2 | | 470.26 | 0.15c | 0.40b | 0.33 | 35.32ab | 10.02b | 80.97 | 100.33 | 9.4 | | | | | | | | | |
| Clúster 3 | | 278.42 | 0.60a | 0.88a | 0.31 | 50.04a | 11.81b | 117.30 | 70.07 | 8.3 | | | | | | | | | |
| Clúster 4 | | 298.33 | 0.34b | 0.60ab | 0.44 | 40.55ab | 20.62a | 93.03 | 90.43 | 7.8 | | | | | | | | | |

Color verde indica los parámetros > media que caracterizan el clúster.

Color rojo indica los parámetros < media que caracterizan el clúster.

AV. Acidez volátil expresada en ácido acético ATT. Acidez total expresada en ácido tartárico

IPT. Índice de polifenoles totales IC. Intensidad de color

TH₂. Acido tartárico Fuma. Acido fumárico

Acet. Acetaldehído SO_{2L}. Anhidrido sulfuroso libre

TPAs. Proantocianidinas totales PPAs. Proantocianidinas precipitables con proteína

I. EtOH. Índice de etanol

AR. Azúcares reductores

T. Tomalidad

Succi. Acido succínico

SO_{2C}. Anhidrido sulfuroso combinado

SPP. Pigmentos poliméricos de bajo peso molecular

GA°. Grado alcohólico v/v

LH₂. Acido láctico

gli. Clicerol

MDP. Grado medio de polimerización

LPP. Pigmentos poliméricos de alto peso molecular

3.2. Efecto del envejecimiento en la composición química

3.2.1. Efecto del envejecimiento en la composición química global.

El efecto del envejecimiento se evaluó mediante la comparación de la evolución química de los 16 vinos tras los 6 meses de envejecimiento con las distintas dosis de oxígeno aplicadas. A grandes rasgos y tomando todas las muestras en conjunto, se puede observar un aumento significativo de la T, de las PPAs, de la concentración de LPP así como un descenso significativo en el mDP, anhídrido sulfuroso libre y combinado, ácido tartárico, acetaldehído y en todas las familias de polifenoles de bajo peso molecular analizados (Tabla III-7).

El descenso en la concentración de anhídrido sulfuroso, tanto libre como combinado debido al efecto del envejecimiento ha sido ampliamente descrito en la bibliografía [19, 35-38]. Del mismo modo, también el descenso en el mDP durante el envejecimiento ha sido descrito en la bibliografía [34, 39], concluyendo que los vinos sometidos a un mayor período de envejecimiento, es decir vinos pertenecientes a las añadas más viejas, presentan un menor mDP y tienden a sufrir cambios menos acusados en el mismo. De hecho, existe una correlación lineal significativa entre la edad del vino y el mDP ($F = 3.23$; $P < 0.001$), lo que indica que este índice es un marcador de la añada del vino [29, 40].

El descenso en la concentración de ácido tartárico ha sido descrito en la bibliografía, concretamente Etaio y col. [2] y Hopper y col. [39] observaron ligeros descensos en la acidez total de los vinos durante el envejecimiento en botella que lo relacionaron con una precipitación de bitartrato potásico.

De igual manera, también está ampliamente descrito en la bibliografía el descenso en la concentración de polifenoles monómeros [4, 19, 40-42] y el aumento de concentración de LPP [19, 39]. Finalmente, en cuanto al aumento de la concentración de las PPAs, Gambuti y col. [21] también observaron un aumento de las mismas durante el envejecimiento, aunque este aumento no se traducía en un aumento de la astringencia sensorial.

Tabla II-7. Diferencias final-inicial entre la composición no volátil de los vinos del envejecimiento. Global: diferencias entre las medias de los parámetros para los 16 vinos y por clúster. Datos en negrita indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

| Vino- | pH | AV (g L ⁻¹) | ATT (g L ⁻¹) | AR (g L ⁻¹) | GA° (v/v) | IPT (u.a) | IC (u.a) | T | LH ₂ (g L ⁻¹) | TH ₂ (g L ⁻¹) | Fuma. (mg L ⁻¹) | Citríco (mg L ⁻¹) | Succi. (mg L ⁻¹) | Glí (g L ⁻¹) | Acet. (mg L ⁻¹) | SO _{2L} (mg L ⁻¹) | SO _{2C} (mg L ⁻¹) | mDP |
|-----------|-------|-------------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|---|---|---|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---|---|-------------|
| global | -0.03 | 0.03 | -0.04 | 0.23 | 0.04 | -1.2 | -0.1 | 0.10 | 0.06 | -0.35 | 4.01 | 0.04 | 7.97 | 0.80 | -13.95 | -14.8 | -46.4 | -5.4 |
| Cluster 1 | -0.03 | 0.03 | -0.02 | 0.31 | 0.05 | -0.57 | 0.71 | 0.10 | 0.04 | -0.21 | 10.10 | 9.0 | 20.55 | 0.93 | -5.91 | -17.9 | -48.8 | -6.3 |
| Cluster 2 | -0.03 | 0.03 | 0.09 | 0.19 | 0.03 | -3.82 | -1.15 | 0.11 | 0.15 | -0.33 | 15.08 | 1.05 | 12.70 | 0.15 | -19.62 | -13.8 | -26.1 | -5.4 |
| Cluster 3 | -0.03 | 0.02 | 0.11 | -0.04 | 0.06 | -0.25 | -1.18 | 0.06 | 0.03 | -0.35 | 13.63 | -14.74 | -18.48 | 0.84 | -31.50 | -7.2 | -42.0 | -3.0 |
| Cluster 4 | -0.03 | 0.03 | -0.20 | 0.27 | 0.02 | -0.64 | -0.03 | 0.10 | 0.03 | -0.55 | -0.89 | -5.45 | 0.62 | 1.01 | -13.17 | -15.6 | -57.6 | -5.4 |
| global | | TPAs (mg L ⁻¹) | PPAs (g L ⁻¹) | LPP (U.A.) | flavanoles (mg L ⁻¹) | flavonoles (mg L ⁻¹) | benzoicos (mg L ⁻¹) | hidroxicinámicos (mg L ⁻¹) | EtOH | | | | | | | | | |
| Cluster 1 | | -6.79 | 0.50 | 0.11 | -19.21 | -6.35 | -16.45 | -23.27 | 1.94 | | | | | | | | | |
| Cluster 2 | | 5.98 | 0.31 | 0.10 | -20.11 | -3.65 | -10.71 | -21.79 | -0.74 | | | | | | | | | |
| Cluster 3 | | -17.21 | 0.68 | 0.03 | -13.88 | -4.81 | -24.15 | -31.21 | -0.14 | | | | | | | | | |
| Cluster 4 | | 84.21 | 0.63 | 0.33 | -29.42 | -5.70 | -19.78 | -21.58 | 1.90 | | | | | | | | | |
| Cluster 4 | | -78.25 | 0.57 | 0.10 | -17.25 | -10.78 | -17.40 | -20.96 | 2.12 | | | | | | | | | |

AV. Acidez volátil expresada en ácido acético ATT. Acidez total expresada en ácido tartárico AR. Azúcares reductores
 IPT. Índice de polifenoles totales IC. Intensidad de color T. Tonalidad
 TH₂. Ácido tartárico Fuma. Ácido fumárico Succ. Ácido succínico
 Acet. Acetaldehído SO_{2L}. Anhidrido sulfuroso combinado SO_{2C}. Anhidrido sulfuroso combinado
 GA°. Grado alcohólico v/v
 LH₂. Ácido láctico
 glí. Glicerol
 mDP. Grado medio de polimerización

3.2.2. Efecto del envejecimiento en la composición química del clúster 1.

Con el objetivo de evaluar de manera específica la evolución de los 6 vinos de este clúster y sus parámetros químicos durante el periodo de envejecimiento se calculó un nuevo PCA con las muestras antes y después del envejecimiento sometidas a las diferentes dosis de oxígeno y con las variables químicas analizadas (**MC_R09**, BE_R10, RB_R06, NJ_R09, AR_A08 y SO_C07) (Figuras II-4 y II-5). Los incrementos y disminuciones de los parámetros químicos se recogen en la Tabla II-7. Las tres primeras componentes del PCA acumulan el 60.78% de la varianza original (22.9, 21.3, 16.4%, respectivamente).

Los vinos de este clúster se caracterizan por tener inicialmente (antes de los 6 meses a 25 °C) alto mDP y bajo IPT, baja IC, baja concentración de acetaldehído, baja concentración de SPP y baja concentración de flavonoles. El proceso de envejecimiento en presencia de diferentes nivel de oxígeno inicial ha provocado un desplazamiento común para los 6 vinos. Así, se observa una disminución de la componente 1 (Figura II-4) y por lo tanto un desplazamiento hacia la izquierda del plano, que de acuerdo con la Tabla II-7 está principalmente relacionado con un incremento de la concentración de glicerol. En relación con la componente 2 todos los vinos al final del envejecimiento se desplazan hacia arriba del plano, mostrando un incremento en dicha componente. A la vista de los resultados de la Tabla II-7, esto corresponde con un aumento significativo en la concentración de pigmentos poliméricos de bajo peso molecular (SPP). Los vinos de este clúster son los únicos de todos los estudiados que experimenta un incremento en este parámetro. En relación con la componente 3 (Figura II-5), el envejecimiento en presencia de diferentes niveles de oxígeno inicial provoca una disminución en esta componente que se debe a un aumento de la concentración de SPP y una reducción del índice de etanol. De manera similar a lo que ocurre con el aumento de los SPP la reducción del índice de etanol solo ha sido observado en los vinos de este clúster.

En conclusión, los vinos de este clúster (vinos con menor IPT del ensayo), sufren cambios químicos durante el envejecimiento que se ven acentuados por la presencia de mayores dosis de oxígeno suministradas en la etapa de embotellado. Así, a parte de los cambios observados de manera común para todos los vinos, los vinos de este clúster sufren un aumento en la concentración de glicerol, de SPP y un descenso en el índice de etanol exclusivo de los vinos de este clúster. Además son los vinos que presentan una mayor disminución en el mDP y un menor descenso en la concentración de acetaldehído.

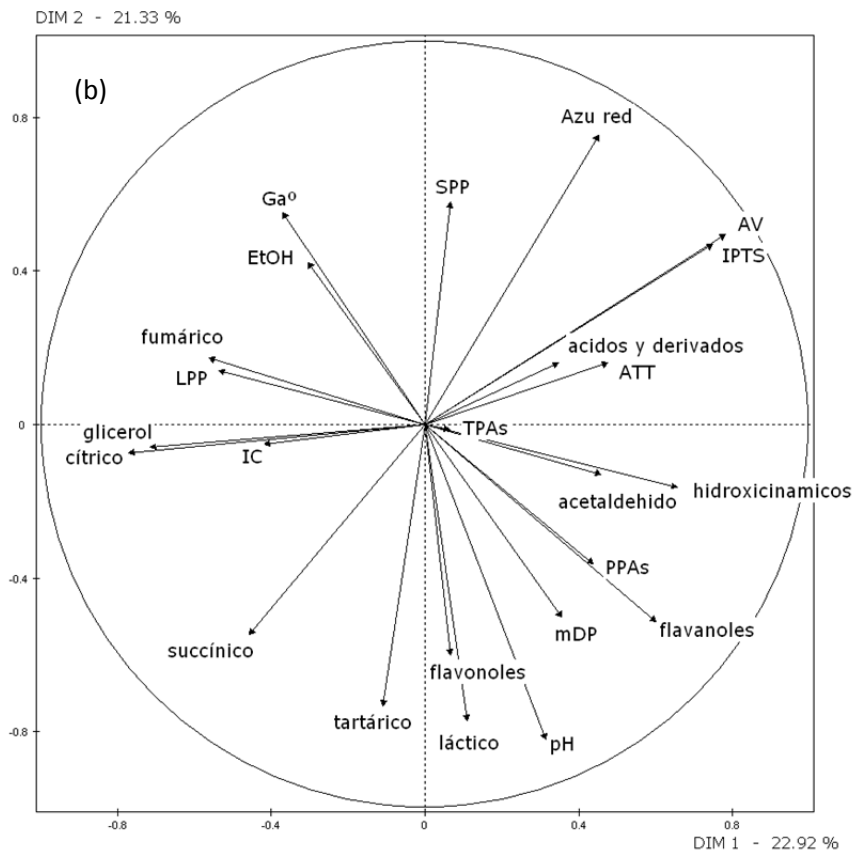
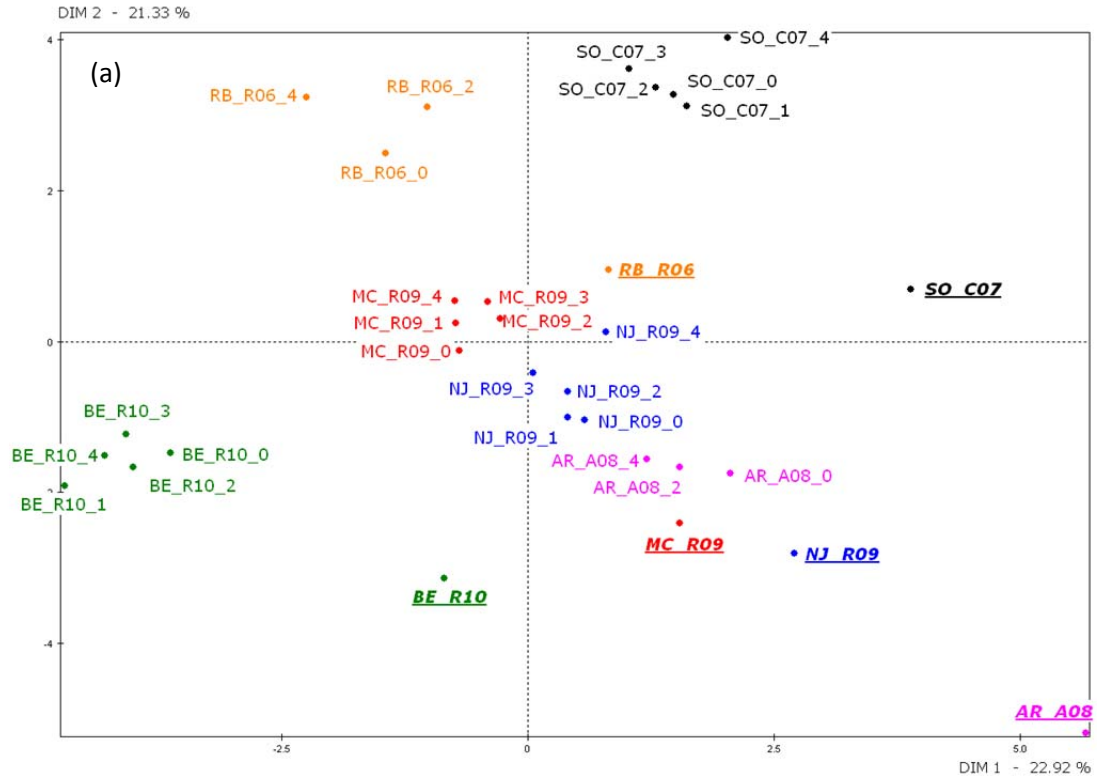


Figura II-4. Proyección de las muestras del clúster 1 (a) y variables (b) en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del PCA. MC_R09, BE_R10, RB_R06, NJ_R09, AR_A08, SO_C07 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno diferentes (dosis0 – dosis5).

Evolución de la composición no volátil de los vinos tintos durante la etapa de embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno.

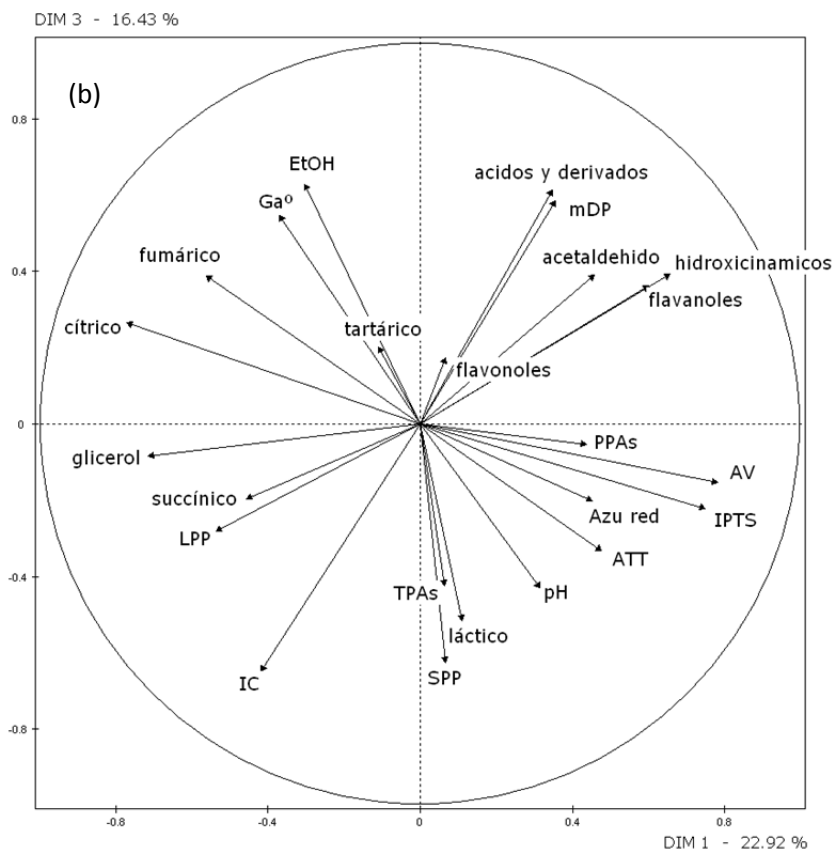
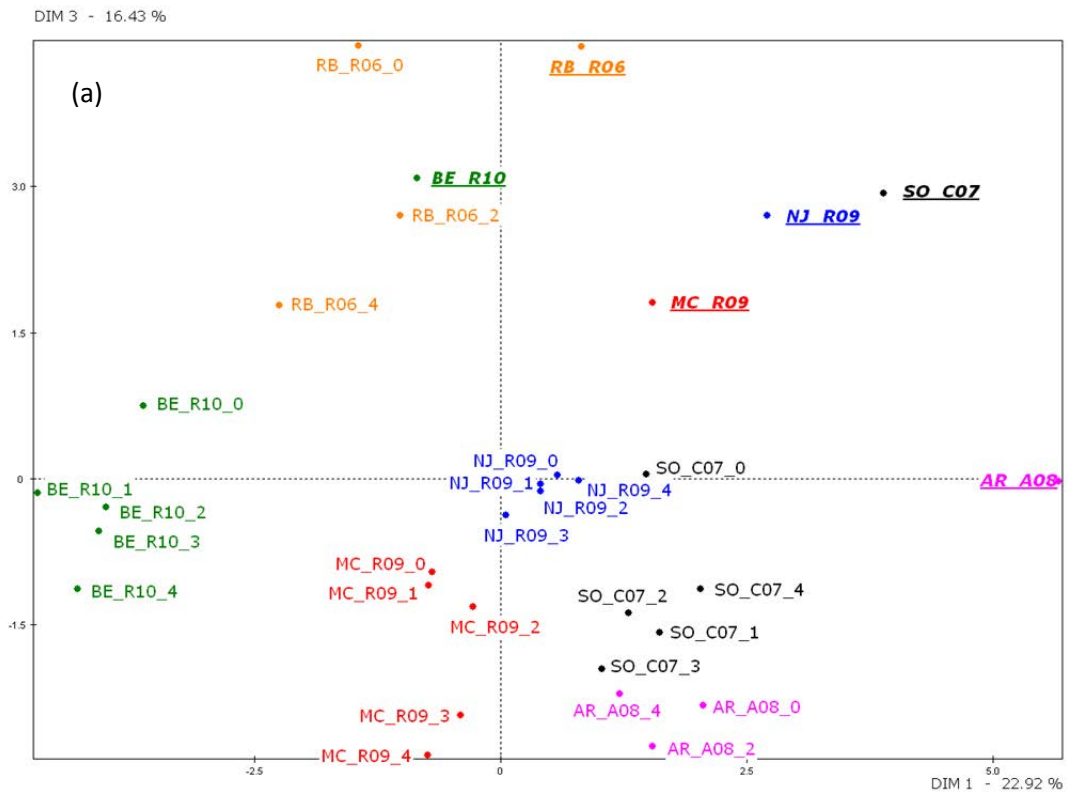


Figura II-5. Proyección de las muestras del clúster 1 (a) y variables (b) en el plano bidimensional (PC1 y PC3) obtenido del PCA. MC_R09, BE_R10, RB_R06, NJ_R09, AR_A08, SO_C07 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno diferentes (dosis0 – dosis5).

3.2.3. Efecto del envejecimiento en la composición química del clúster 2.

La evolución de los parámetros químicos tras el envejecimiento de los 3 vinos del clúster 2 (CH_R10, SC_R10 y CZ_D08) se muestra en las Figuras II-6 y II-7 y la Tabla II-7. Las tres primeras componentes del PCA acumulan el 86.16% de la varianza original (37.9, 26.6, 21.58%, respectivamente).

Los vinos de este clúster se caracterizan por tener inicialmente (antes de los 6 meses a 25 °C) un alto pH, una alta concentración de ácido láctico, una baja concentración de PPAs, glicerol y azúcares reductores. El proceso de envejecimiento ha provocado un desplazamiento hacia la izquierda del plano para los 3 vinos iniciales (Figura II-6). Sin embargo, las dosis de oxígeno parecen tener influencia sólo en el vino CH_R10, que corresponde al vino de mayor pH del grupo. Así, se observa una disminución de la componente 1 (Figura II-6) que de acuerdo con la Tabla II-7 está principalmente relacionado con la disminución en la concentración de ácidos hidroxicinámicos, siendo este clúster en el que más disminuyen. Esta mayor disminución puede estar provocada por el mayor pH de estos vinos, que generaría una mayor concentración de la especie anión fenolato a partir de la cual tiene una mayor oxidación química [6]. En relación con la componente 2, en todos los casos no existe prácticamente modificación, indicando por un lado la estabilidad de los parámetros relacionados con esta componente (ver Figura II-5 (b)) y por otro la diferencia de los vinos en estos parámetros. En relación con la componente 3 (Figura II-7), el envejecimiento ha provocado un aumento en esta componente, que a la vista de los resultados de la Tabla II-7 se debe principalmente a la disminución del IPT y de los ácidos y derivados, únicamente observado en los vinos de este clúster.

En conclusión, los vinos de este clúster (vinos con mayor pH del ensayo), sufren cambios químicos durante el envejecimiento, sin embargo mucho menos por las distintas dosis de oxígeno. El oxígeno parece tener sólo efecto en el vino con mayor pH del clúster. Así, a parte de los cambios observados de manera común para todos los vinos, los vinos de este clúster sufren una disminución en el IPT, en los ácidos y derivados y además, es el clúster donde existe una mayor disminución de la concentración de ácidos hidroxicinámicos.

Evolución de la composición no volátil de los vinos tintos durante la etapa de embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno.

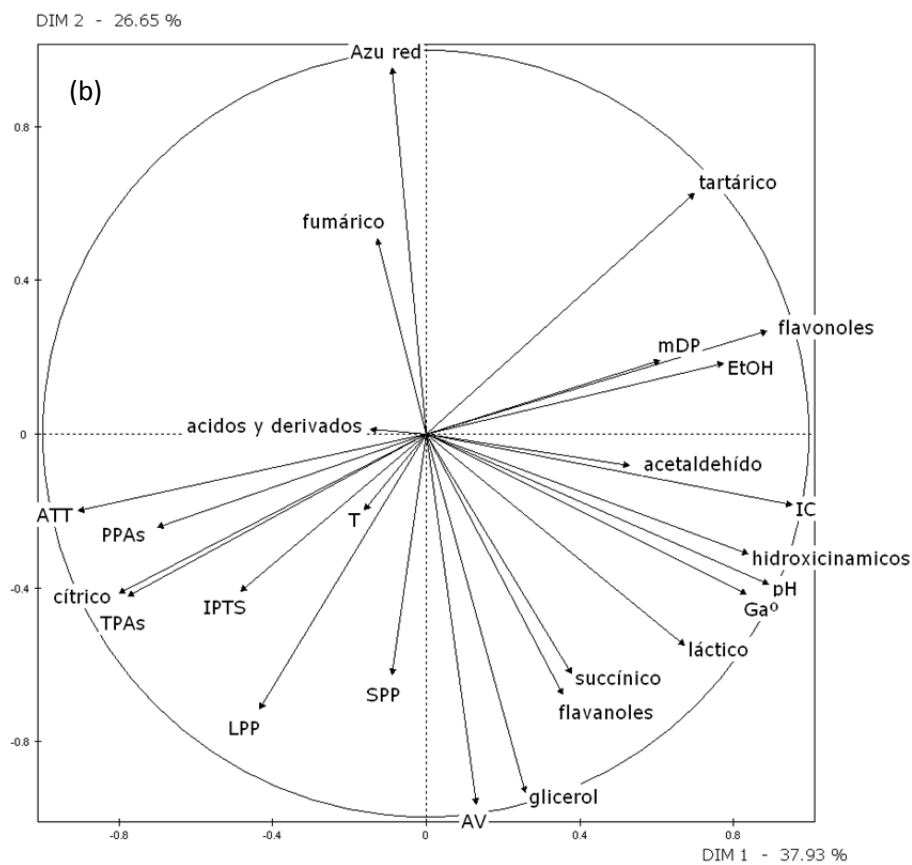
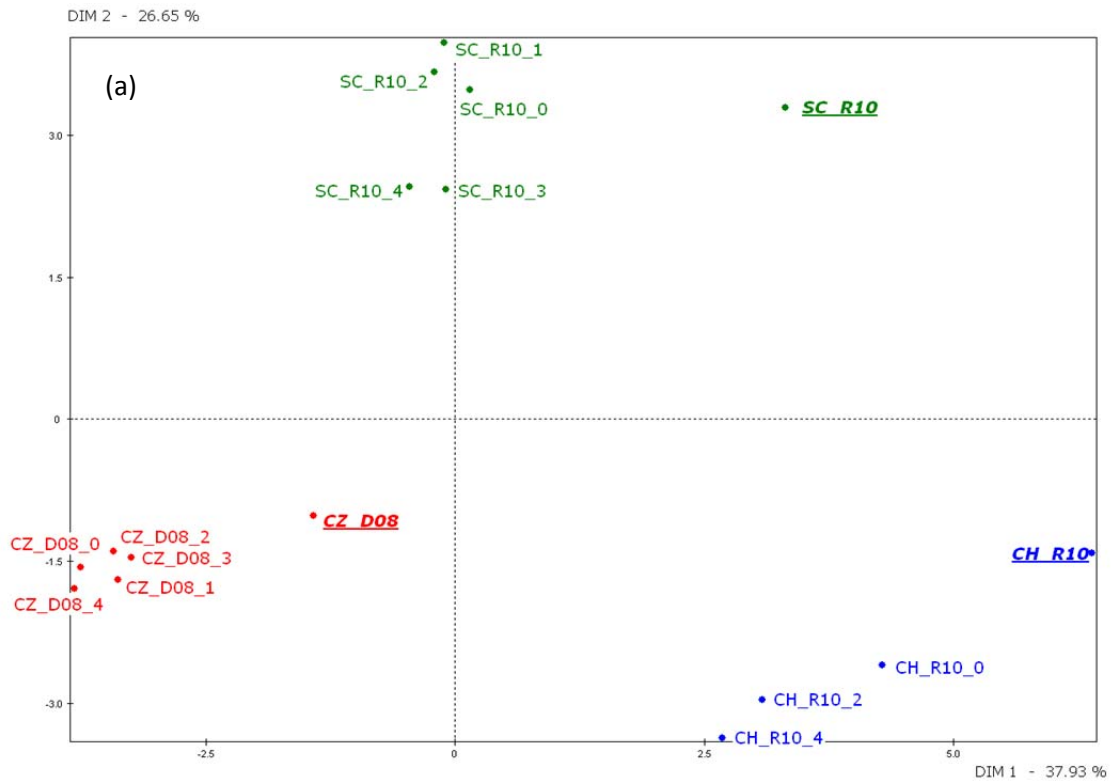


Figura II-6. Proyección de las muestras del clúster 2 (a) y variables (b) en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del PCA. CZ_D08, SC_R10, CH_R10 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno diferentes (dosis0 – dosis5).

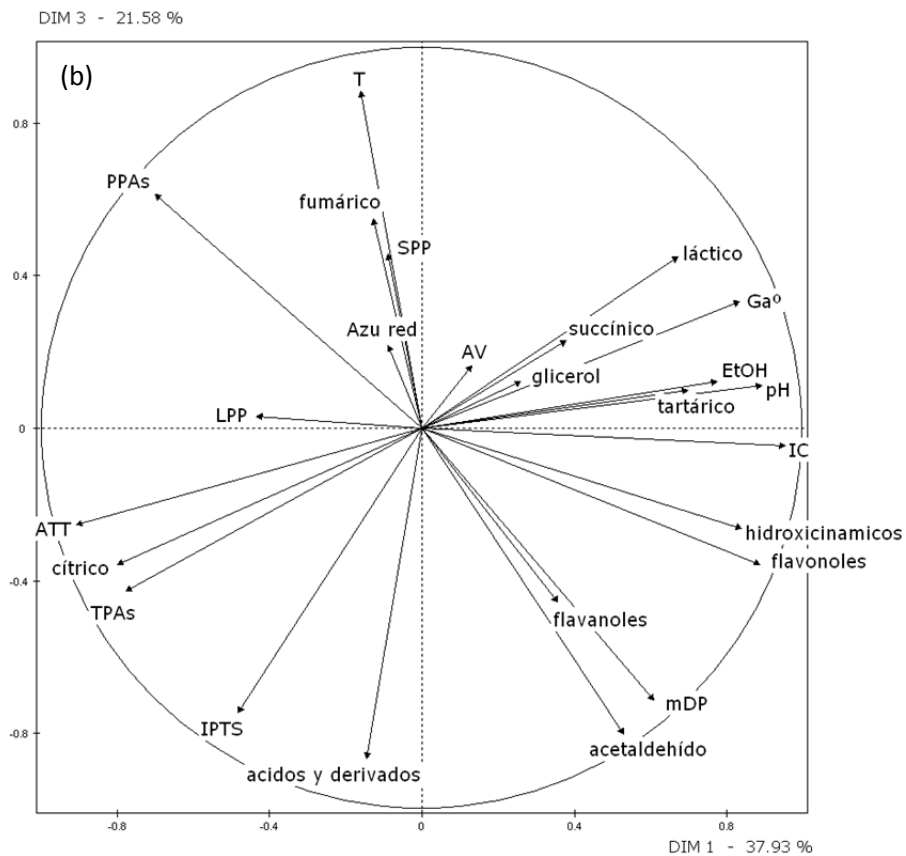
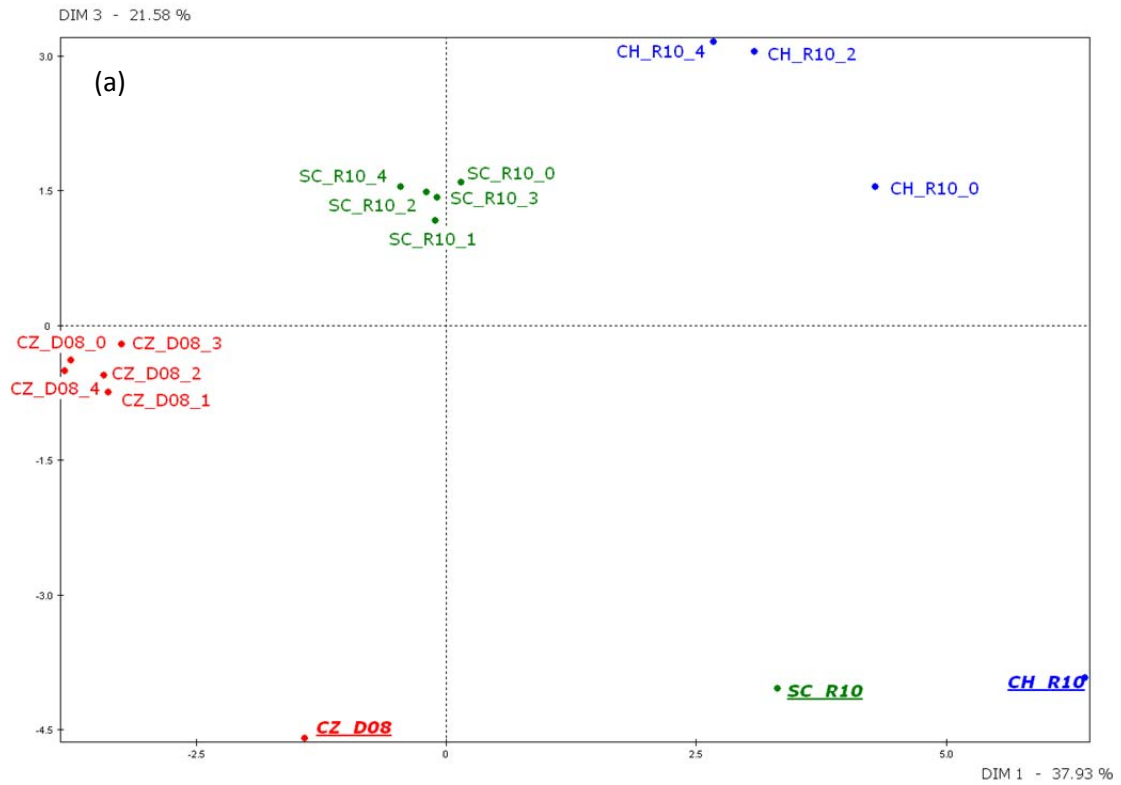


Figura II-7. Proyección de las muestras del clúster 2 (a) y variables (b) en el plano bidimensional (PC1 y PC3) obtenido del PCA. CZ_D08, SC_R10, CH_R10 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno diferentes (dosis0 – dosis5).

3.2.4. Efecto del envejecimiento en la composición química del clúster 3.

La evolución de los parámetros químicos tras el envejecimiento de los 2 vinos del clúster 3 (**MG_V05**, **AY_C05**) se muestra en las Figuras II-8 y II-9 y la Tabla II-7. Las tres primeras componentes del PCA acumulan el 93.84% de la varianza original (66.5, 20.8, 6.43% respectivamente).

Los vinos de este clúster, muestras de la añada más vieja: 2005, se caracterizan por tener inicialmente (antes de los 6 meses a 25 °C) una alta concentración de PPAs y glicerol, un alto valor de IPT y por un bajo mDP. El proceso de envejecimiento sin y con adición de oxígeno ha provocado un desplazamiento común a los dos vinos respecto al vino inicial sobre el plano bidimensional de las dos primeras componentes, y un desplazamiento contrario en ambos vinos sobre la componente 3. Por un lado, no se observa desplazamiento en la componente 1 (Figura II-8) indicando la estabilidad de los parámetros relacionados con esta componente (ver Figura II-8 (b)) y por otro, la diferencia de los vinos en estos parámetros. En relación con la componente 2, en ambos casos se ha producido un gran desplazamiento negativo sobre la componente. A la vista de los resultados de la Tabla II-7 se debe principalmente al gran descenso en la concentración de acetaldehído, el mayor de todos los clústeres, y la disminución de mDP, el menor de todos los clústeres. En relación con la componente 3 (Figura II-9), el envejecimiento ha provocado un aumento en esta componente en el caso del vino AY_C05 y una disminución en el caso del vino MG_V05. A la vista de los resultados de la Tabla II-7 se debe principalmente a la variación del índice de etanol.

Finalmente, los resultados de la Tabla II-7 muestran también que es el único clúster en el que no existe un aumento significativo de la T. Estos resultados apoyan el hecho observado por otros autores que concluyen que los vinos más viejos son los que tienen una materia colorante más estable [34]. Además, resulta interesante apuntar que en este clúster se produce una disminución en la concentración de los SPP no observado en ningún otro clúster, el mayor aumento en la concentración de LPP y un aumento en la concentración de ácido fumárico tampoco observada en ningún otro clúster. Al mismo tiempo, es el clúster donde se produce la mayor disminución de flavanoles y a su vez el único donde no existe una disminución de flavonoles. Este hecho resulta llamativo ya que Cheynier y col. [43] apuntan que los flavonoles son la familia más fácilmente oxidable, por encima de flavanoles, ácidos benzoicos e hidroxicinámicos.

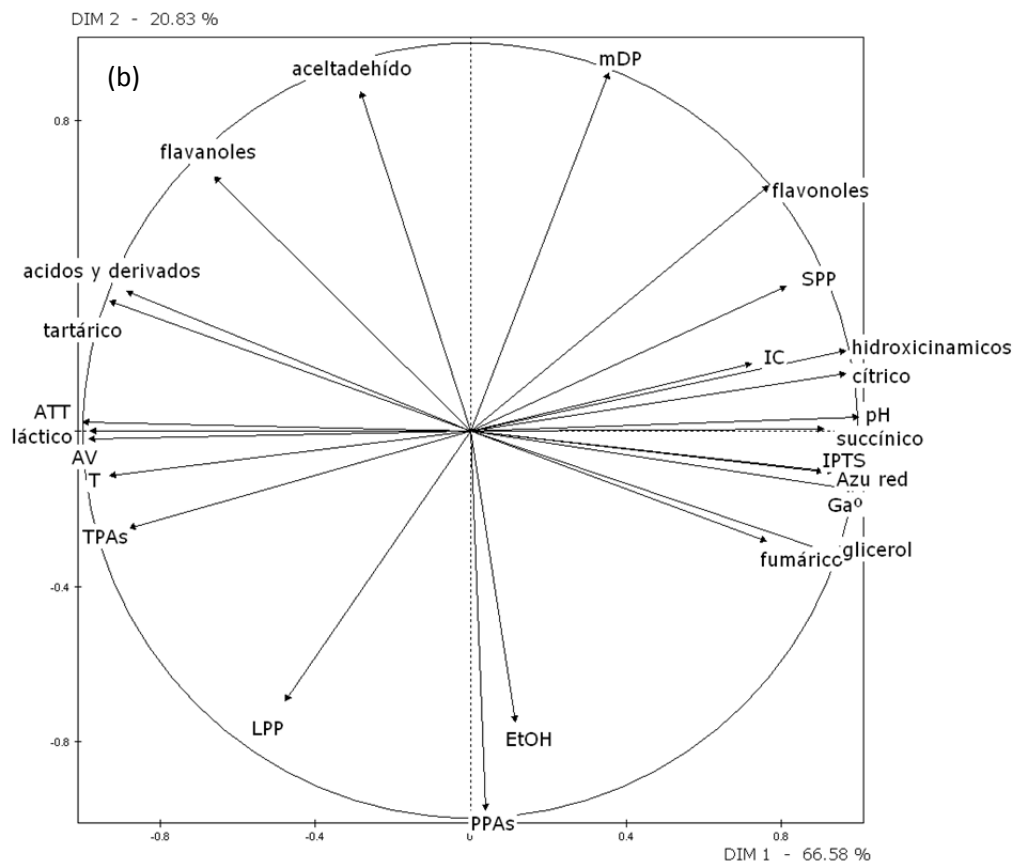
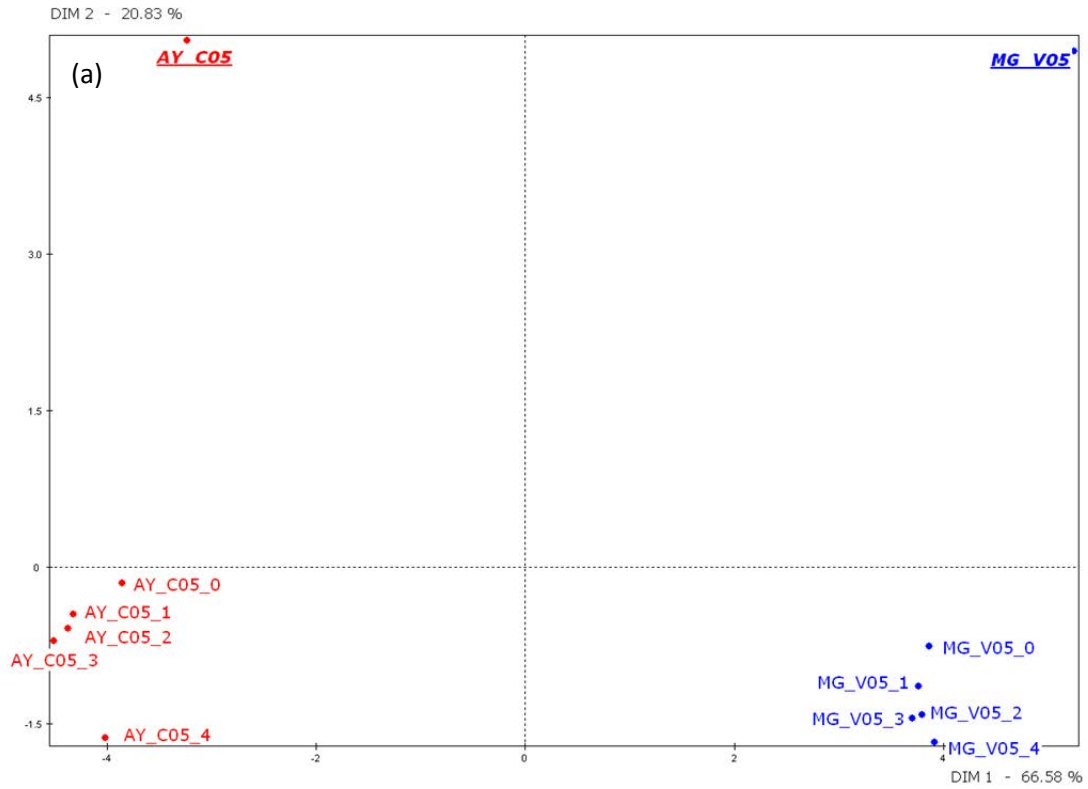


Figura II-8. Proyección de las muestras del clúster 3 (a) y variables (b) en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del PCA. AY_C05, MG_V05 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno diferentes (dosis0 – dosis5).

Evolución de la composición no volátil de los vinos tintos durante la etapa de embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno.

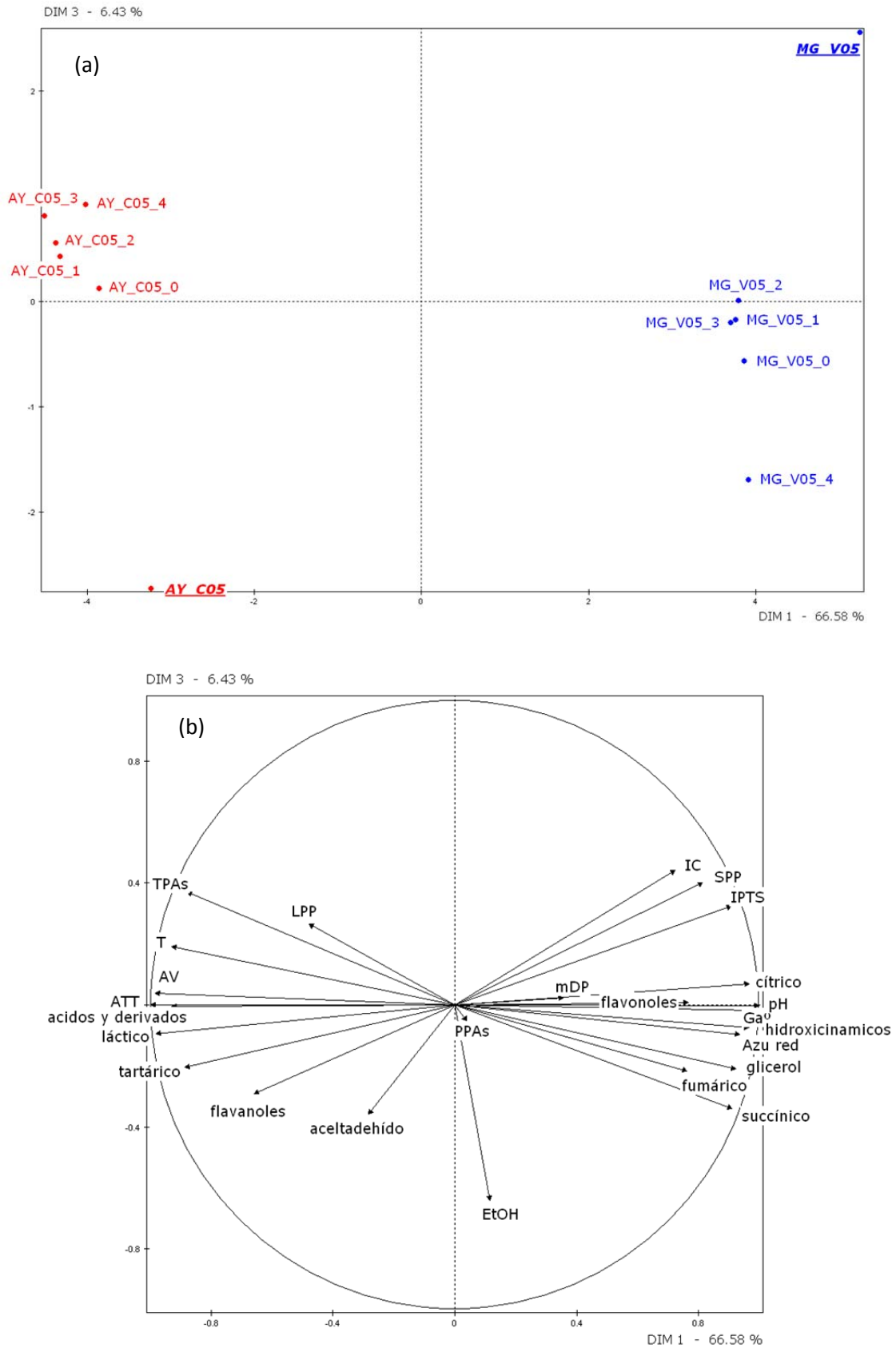


Figura 11-9. Proyección de las muestras del clúster 3 (a) y variables (b) en el plano bidimensional (PC1 y PC3) obtenido del PCA. AY_C05, MG_V05 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno diferentes (dosis0 – dosis5).

En conclusión, los vinos de este clúster (vinos de la añada más vieja), sufren cambios químicos durante el envejecimiento y también por las distintas dosis de oxígeno. En general el oxígeno parece acentuar los procesos de envejecimiento. Así, a parte de los cambios observados de manera común para todos los vinos, los vinos de este clúster sufren una disminución en los SPP, un aumento en la concentración de ácido fumárico, y no sufren un aumento de la T durante el envejecimiento. Además es el clúster donde se produce la mayor disminución de la concentración de acetaldehído y flavanoles y el único donde no existe una disminución significativa de la concentración de flavonoles.

3.2.5. Efecto del envejecimiento en la composición química del clúster 4.

La evolución de los parámetros químicos tras el envejecimiento de los 5 vinos del clúster 4 (RM_R10, CT_C07, GC_B10, **BO_B10** y CD_C10), vinos jóvenes con mayor IPT, se muestra en las Figuras II-10 y II-11 y la Tabla II-7. Las tres primeras componentes del PCA acumulan el 71.85% de la varianza original (32.30, 22.76, 16.79% respectivamente).

Los vinos de este clúster se caracterizan inicialmente (antes de los 6 meses a 25 °C) por presentar una alta concentración de flavonoles y SPP, por una baja T y una baja concentración de ácido láctico. El proceso de envejecimiento ha provocado un desplazamiento común a todos los vinos respecto al vino inicial sobre los planos bidimensionales. Así, se observa una ligera disminución de la componente 1 (Figura II-10) en todos los casos excepto para el vino GC_B10 que presenta una mayor disminución. De acuerdo con la Tabla II-7 este desplazamiento está principalmente relacionado con la pérdida de ácido tartárico, siendo éste el clúster que presenta mayor disminución. En relación con la componente 2 todos los vinos al final del envejecimiento se desplazan hacia arriba del plano, mostrando un incremento en dicha componente, acentuado por la presencia de dosis de oxígeno crecientes. A la vista de los resultados de la Tabla II-7, esto corresponde con un aumento de la T, un descenso del mDP y en la concentración de los flavanoles y flavonoles, siendo este el clúster donde se produce la mayor disminución de este último grupo de compuestos. En relación con la componente 3 (Figura II-11), el envejecimiento (6 meses 25 °C) provoca un aumento en esta componente, no siendo tan claro el debido al efecto de las dosis de oxígeno. A la vista de los resultados de la Tabla II-7 este aumento se debe principalmente al aumento de las PPAs y a la disminución de flavonoles.

Evolución de la composición no volátil de los vinos tintos durante la etapa de embotellado. Efecto de la presencia de diferentes niveles de oxígeno.

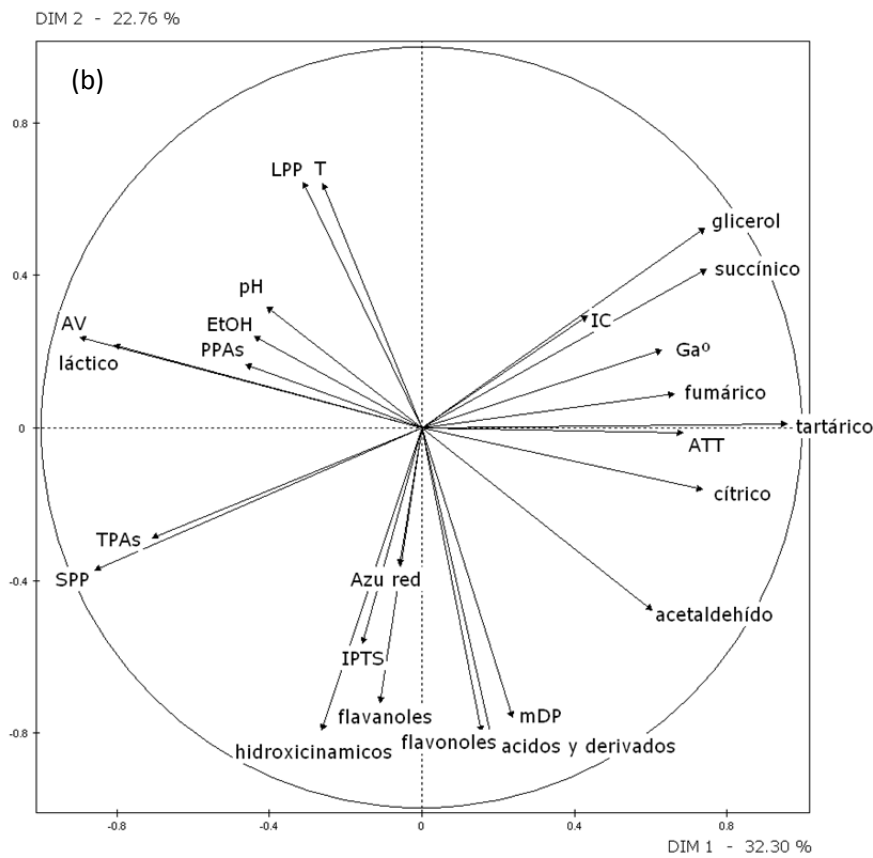
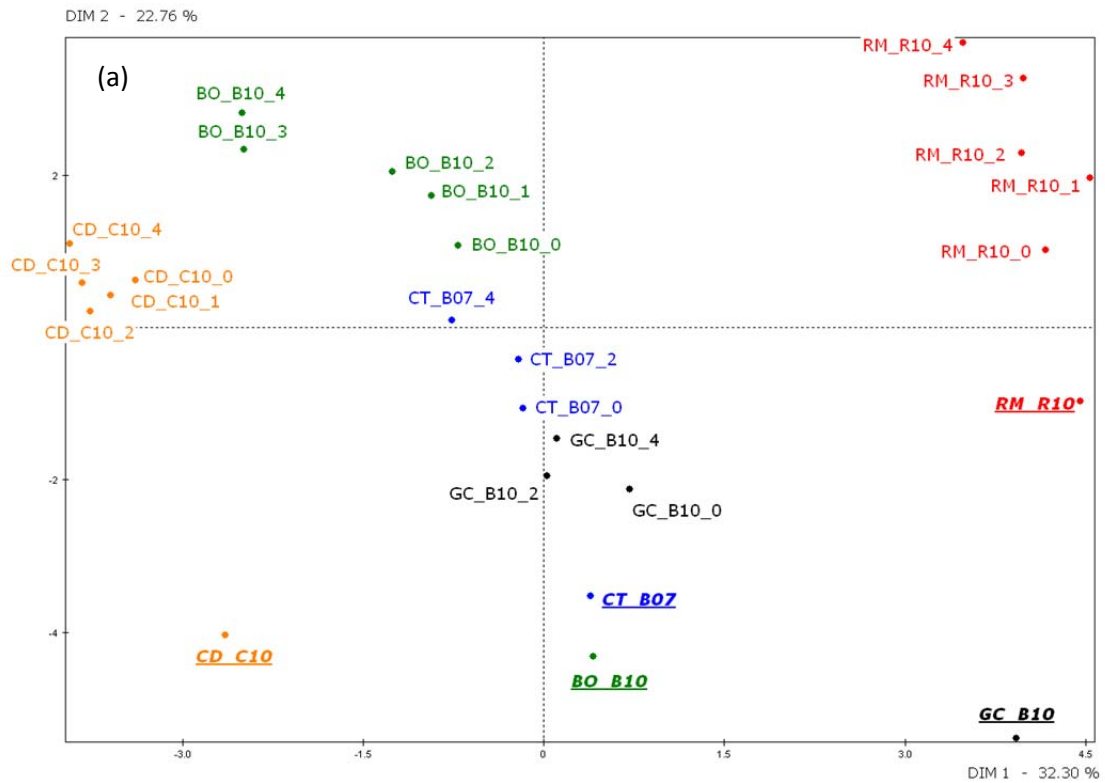


Figura II-10. Proyección de las muestras del clúster 4 (a) y variables (b) en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del PCA. CD_C10, CT_B07, BO_B10, GC_B10, RM_R10 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno diferentes (dosis0 – dosis5)..

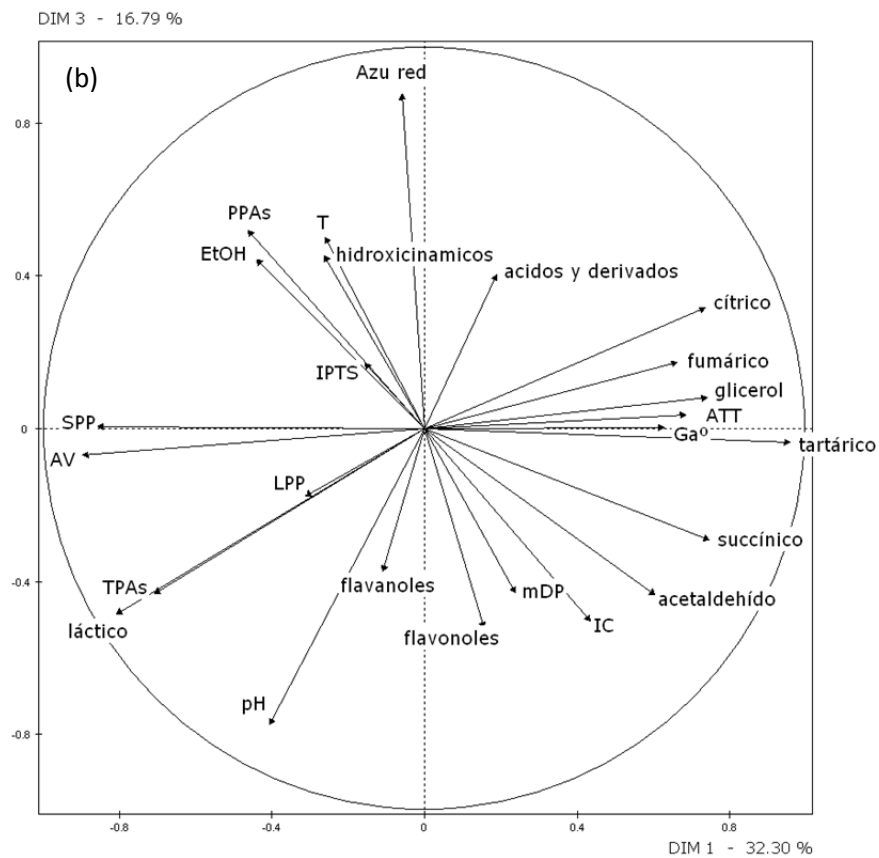
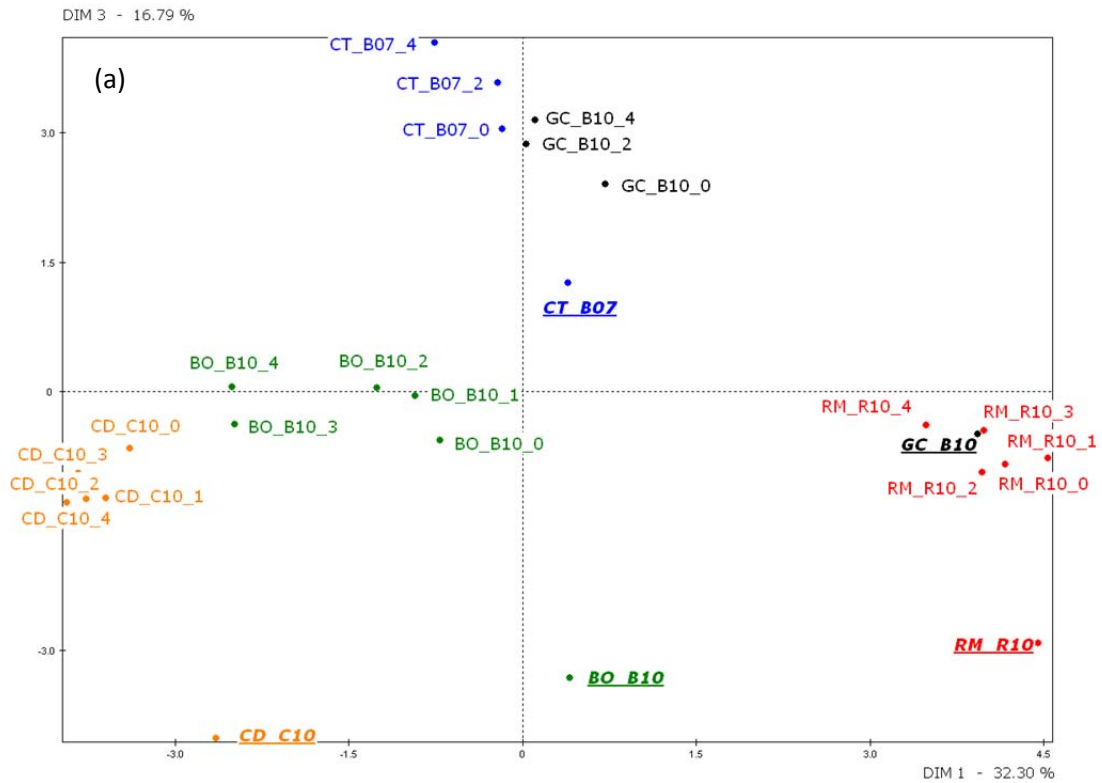


Figura II-11. Proyección de las muestras del clúster 4 (a) y variables (b) en el plano bidimensional (PC1 y PC3) obtenido del PCA. *CD_C10, CT_B07, BO_B10, GC_B10, RM_R10* vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno diferentes (dosis0 – dosis5)..

Por otro lado, los resultados de la Tabla II-7 muestran como este clúster de vinos es el único clúster junto con el 3 (también con mayor IPT) en el que aumenta la concentración de LPP. Sin embargo, a diferencia del clúster 3 en este clúster la concentración de SPP permanece constante. Finalmente es el clúster donde se produce el mayor aumento del índice de etanol.

En conclusión, los vinos de este clúster (la mayoría vinos jóvenes con alto IPT), sufren cambios químicos durante el envejecimiento y también por las distintas dosis de oxígeno. En general el oxígeno parece acentuar los procesos de envejecimiento. Así, a parte de los cambios observados de manera común para todos los vinos, las muestras de este clúster sufren la mayor pérdida de flavonoles y ácido tartárico y el mayor aumento del índice de etanol. Por otro lado, es junto al clúster 3 (ambos con mayor IPT) donde aumenta la concentración de LPP, aunque a diferencia del clúster 3 no existe una disminución de los SPP.

3.3. Relación entre los cambios sensoriales en boca y los cambios químicos en la matriz no volátil.

Como se puso de manifiesto en el Capítulo I de esta misma Sección, los cambios experimentados en las propiedades sensoriales en boca se han visto poco afectados por el envejecimiento realizado en botella y en los casos en los que se han detectado cambios significativos, éstos han sido muy pequeños (menos de 1 unidad de diferencia en todos los casos) y vino-dependientes. En la Tabla II-8 se muestran las variaciones medias de las propiedades sensoriales evaluadas en boca observadas tras el periodo de envejecimiento.

3.3.1. Correlación entre la variación del amargor y los cambios químicos en la matriz no volátil.

Diversos trabajos [44-46] que han estudiado el amargor que inducen los compuestos polifenólicos, concluyen que son las moléculas más pequeñas las que están relacionadas con este sabor. En particular, se ha atribuido a los flavanoles monómeros así como a sus oligómeros ser los principales responsables del amargor [46]. Además, recientemente se ha puesto de manifiesto que determinados antocianos también son capaces de influir en el amargor [47]. Así mismo, diferencias en la estereoquímica del compuesto [44] parece influir en la percepción de este sabor, por ejemplo la epicatequina resulta más amarga que su isómero catequina [48].

Tabla II-8. Diferencias medias (media entre la puntuación de los vinos con diferentes dosis de oxígeno menos la puntuación inicial del vino antes del envejecimiento) de los atributos evaluados en boca por el panel entrenado para las muestras que presentan diferencias significativas (amargor y astringencia medidos en una escala de 10 puntos e intensidad global y persistencia medidos en una escala de 9 puntos).

| Vinos | amargor | astringencia | intensidad global | persistencia |
|--------|---------|--------------|-------------------|--------------|
| MC_R09 | -0.45 | - | - | - |
| RB_R06 | - | 0.76 | - | - |
| SC_R10 | 0.47 | - | 0.36 | - |
| AR_A08 | -0.90 | - | - | -0.45 |
| RM_R10 | -0.61 | 0.19 | - | - |
| GC_B10 | - | - | -0.56 | - |
| MG_V05 | -0.77 | - | -0.41 | - |
| SO_C07 | - | 0.66 | - | - |
| AY_C05 | - | - | -0.51 | -0.43 |
| CD_C10 | 0.43 | - | - | - |
| CT_B07 | 0.54 | - | - | - |
| BO_B10 | 0.42 | 0.94 | - | - |
| CZ_D08 | 0.39 | - | - | - |

Por otro lado, Hufnagel y col. [46] apuntan que concentraciones por debajo del umbral sensorial de los esteres de los ácidos fenólicos y determinados flavonoles son capaces de inducir amargor. También, existen compuestos presentes en el vino que sin ser amargos por sí mismos contribuyen al aumento en la percepción de este atributo, como es el caso del etanol [49, 50]. A la vista de todo esto, en la Tabla II-8 se muestra la variación significativa de los compuestos que han sido citados como responsables o con cierta influencia en el sabor amargo para todos los vinos en los que se han observado diferencias significativas.

Tal y como puede observarse (Tabla II-8) el envejecimiento en botella ha provocado disminución del amargor en unos vinos y aumento en otros. En relación con los vinos que experimentan un aumento en el amargor (SC_R10, CD_C10, CT_B07, BO_B10, CZ_D08) resulta difícil poder explicar este hecho en base únicamente a la composición fenólica analizada y que a priori tendría una mayor implicación en este sabor, ya que casi todos estos compuestos han experimentado una disminución durante el periodo de envejecimiento (Tabla II-8). Este hecho, estaría de acuerdo con los resultados obtenidos por Gonzalo-Diago y col. [47] que describen la fracción de compuestos fenólicos de bajo peso molecular como amarga pero no correlacionada con el amargor evaluado en los correspondientes vinos. Así, cabe pensar que otros parámetros pueden estar implicados

Tabla II-9. Variación en la concentración de los compuestos durante el envejecimiento que muestran diferencias y han sido reportados como contribuyentes al sabor amargo.

| Δ compuesto (mg L⁻¹) | MC_R09 | SC_R10 | AR_A08 | RVL_R10 | MG_V05 | CD_C10 | CT_B07 | BO_B10 | CZ_D08 |
|--|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Variación amargor | -0.45 | 0.47 | -0.90 | -0.61 | -0.77 | 0.43 | 0.54 | 0.42 | 0.39 |
| ácidos y derivados | | | | | | | | | |
| ácido succínico | 19.29 | -19.27 | 0 | 0 | 0 | 67.51 | 0 | -12.36 | 0 |
| ácido gálico | -4.44 | -2.82 | -10.73 | -6.39 | -8.92 | -1.44 | -1.43 | -12.83 | -17.35 |
| ácido protocatéquico | -0.33 | 0 | 0 | -0.87 | -0.82 | -0.90 | -1.20 | -1.36 | -1.78 |
| ácido <i>t</i> -caftárico | -14.20 | -6.26 | -8.10 | -10.28 | -14.83 | -2.51 | -13.77 | -34.23 | -20.97 |
| ácido cutárico | -4.89 | -4.30 | -4.71 | -3.06 | -3.79 | -3.13 | -5.82 | -9.67 | -14.70 |
| ácido vainíllico | -0.59 | 0 | -0.71 | -2.22 | -1.03 | -0.92 | -1.47 | -1.92 | -1.72 |
| ácido caféico | -2.27 | -2.00 | -1.56 | -0.88 | -1.65 | -4.20 | -2.98 | -0.69 | -1.71 |
| ácido ferúlico | -0.33 | -0.23 | -0.36 | -0.82 | -0.40 | -0.33 | -1.37 | -1.79 | -0.61 |
| ácido siringico | -1.10 | -0.74 | -1.31 | -5.54 | -5.90 | -2.88 | -3.76 | -3.52 | -1.95 |
| ácido cumárico | 0 | -0.31 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ácido elágico | -2.15 | -2.31 | -3.27 | -1.43 | -2.25 | -1.21 | -3.01 | -3.55 | -3.39 |
| éster etílico del ácido protocatéquico | 0.16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| éster etílico del ácido caféico | -0.76 | 0.37 | 0.34 | 0.65 | 0 | 0 | -0.71 | -0.29 | 0 |
| éster etílico del ácido gálico | -8.13 | 5.26 | 9.44 | -1.92 | -6.62 | -14.06 | -10.38 | -10.86 | -24.97 |
| éster etílico del ácido cumárico | 0.86 | 0.56 | 0.46 | 1.52 | 0.25 | 0.42 | 1.02 | 0.41 | 0.35 |
| flavanoles | | | | | | | | | |
| IPTs | 1.61 | -4.10 | 0 | -6.70 | -2.44 | 0 | 3.25 | -3.49 | 0 |
| procianidina C1 | -0.38 | -0.79 | -0.52 | -0.22 | -0.23 | -0.45 | -0.40 | -0.31 | -0.23 |
| procianidina B1 | -11.69 | -19.51 | -10.79 | -9.71 | -6.86 | -10.71 | -5.21 | -1.32 | -1.79 |
| epigallocatequina | -0.88 | -1.37 | -0.70 | -0.84 | -0.16 | -0.63 | 0 | -7.07 | -0.66 |
| catequina | -0.94 | -2.97 | -3.26 | -2.39 | -2.73 | -1.39 | -1.35 | 3.27 | -1.05 |
| Procianidina C2 | -0.71 | -0.94 | -0.39 | -0.41 | -0.34 | -0.96 | -0.60 | -0.57 | -0.65 |
| procianidina B2 | -2.39 | -4.61 | -2.94 | -8.73 | -1.87 | -4.65 | -2.57 | -6.06 | -1.07 |
| epicatequina | -1.56 | -3.28 | -20.39 | -7.01 | -1.96 | -3.49 | -2.09 | -5.77 | -1.56 |
| procianidina B3 | -0.25 | -0.33 | 0 | -0.23 | 0 | -0.30 | -0.25 | -0.31 | -0.24 |
| procianidina A2 | -0.48 | 0.27 | 0 | 0.21 | -0.32 | 0 | 0.33 | 0 | 0 |
| TPAs | 0 | 41.26 | -193.09 | -74.14 | 0 | -126.87 | -136.59 | -100.77 | 0 |
| flavonoles | | | | | | | | | |
| quercetina-3- <i>O</i> -glucurónido | -5.89 | -3.62 | -2.69 | -8.16 | -4.41 | -10.02 | -5.04 | -11.74 | -3.45 |
| quercetin-3- <i>O</i> -glucósido | 0 | 0 | 0 | 0 | -0.79 | -0.33 | 0 | 0 | 0 |
| siringentin-3- <i>O</i> -glucósido | 0.41 | 0.54 | 0.34 | 2.11 | 1.49 | 0.26 | 0 | 0 | 0.20 |
| quercetina | -0.54 | -1.75 | -0.77 | -4.81 | -0.57 | -2.42 | -1.92 | -3.80 | -0.50 |
| antocianos | | | | | | | | | |
| vitisina B de delphinidina-3- <i>O</i> -glucósido | 0 | 0.11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -0.10 | 0 |
| vitisina A | 0 | -0.20 | -1.22 | -0.49 | -0.61 | -0.45 | -0.36 | -1.00 | -0.55 |
| petunidin-3- <i>O</i> (6'-acetil)glucósido | -0.32 | -0.63 | -0.28 | -0.50 | 0 | -2.00 | -0.30 | -0.74 | -0.17 |
| vitisina a de malvidina-3- <i>O</i> (6'- <i>p</i> -coumaroil)glucósido | -0.33 | -0.37 | -0.30 | -0.81 | -0.79 | -0.28 | -0.26 | -0.44 | -0.38 |
| SPP* | 0.19 | 0.19 | 0 | 0 | -0.39 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| LPP | 0.25 | 0 | 0 | 0 | 0.29 | 0.16 | 0 | 0.30 | 0 |

en el sabor amargo de los vinos. En esta línea, existen evidencias de que otras moléculas no volátiles pueden afectar a la percepción del sabor, por ejemplo la presencia de azúcares [51, 52] o glicerol [54], que hacen reducir la percepción de amargor. Sin embargo, en este caso parece difícil que este tipo de interacciones sean responsables del cambio en la percepción, ya que la concentración de azúcares no ha experimentado modificaciones significativas durante el envejecimiento y la concentración de glicerol ha aumentado (Tabla II-7).

Por otra parte, otro tipo de interacciones que pueden contribuir a provocar cambios en el sabor amargo son los cambios experimentados en el aroma, ya que ha quedado demostrado que un cambio en el aroma induce cambios en la percepción de los distintos sabores. Concretamente, se ha observado cómo el aroma frutal (relacionado cognitivamente con el sabor dulce) hace reducir la percepción de amargor y astringencia en los vinos tintos [54]. Este tipo de interacción también se ha puesto de manifiesto en el Capítulo 1 de la sección II de esta memoria. El cambio en el perfil aromático podría traducirse en un aumento de la percepción del sabor amargo en estos vinos.

Finalmente, los resultados del Capítulo II de la Sección II de esta tesis han puesto de manifiesto que dentro del mismo grupo de moléculas (quercetinas), o incluso dentro de la misma molécula según su estereoquímica (ácido *cis* y *trans* aconítico) pueden existir fenómenos de supresión sensorial [55]. Este tipo de relaciones también pueden resultar interesantes a la hora de poder explicar este aumento en la percepción del amargor, ya que, aunque existe una disminución de los compuestos que pueden estar implicados en el sabor amargo, estos no lo hacen todos en la misma magnitud, pudiendo cambiar relaciones entre moléculas que pueden conllevar un cambio en el amargor.

En el caso de los vinos MC_R09, AR_A08, RM_R10 y MG_V05, los cuales han sufrido un descenso significativo en el amargor, sí parece posible establecer correlaciones entre el descenso de este atributo y el descenso de los compuestos relacionados con el amargor. De hecho, se han encontrado correlaciones significativas entre el descenso de este atributo y el descenso de la catequina, la procianidina B3, el ácido gálico y la vitisina A ($F = 21.27, 11.07, 78.26, 26.40$; $P = 0.044, 0.079, 0.001, 0.035$, respectivamente). Sin embargo, observando las variaciones y conociendo los umbrales que presenta cada compuesto, parece difícil que únicamente la variación de estos compuestos pueda explicar la variación del amargor percibido. De nuevo la interacción con el aroma parece contribuir de manera importante a estos cambios. De hecho, es reseñable que de los 5

vinos en los que aumenta el amargor, 3 de ellos pertenecen al clúster 3 (agrupación del Capítulo 1 de esta sección), que sufre un aumento del atributo herbal (+1.9) y de los 4 en los que desciende el amargor, 3 de ellos pertenecen al clúster 4 (agrupación del capítulo 1 de esta sección) donde las notas herbales sufren un gran descenso (-5.3), existiendo una correlación positiva entre la modificación del sabor amargo y la modificación del atributo herbal ($R = 0.517$; $P = 0.04$). En esta línea, Caporale y col. [56] concluyeron que un aumento en la concentración del *cis*-3-hexenol (notas herbáceas) hacen aumentar el amargor percibido.

Finalmente, la hipótesis es que, aunque la variación en estos compuestos polifenólicos tengan influencia en la modificación del amargor, seguro que determinadas interacciones (no volátil- no volátil, volátil-no volátil, volátil-volátil...) están jugando un papel fundamental en esta modificación, ya que en caso contrario, sería esperable cambios en el amargor de otros vinos en los que los descensos en estos compuestos son similares o incluso superiores.

3.3.2. Correlación entre la variación de la astringencia y los cambios químicos en la matriz no volátil.

La mayoría de los trabajos encaminados a estudiar la contribución de las moléculas no volátiles en el perfil sensorial de los vinos se ha centrado en los compuestos que contribuyen a la percepción de astringencia [40, 46, 55, 57, 58]. Esta percepción se debe principalmente a las proantocianidinas o taninos (TPAs) [46, 55], aunque también se puede ver modulada por otros compuestos como los ácidos aconíticos, el etanol, flavanoles monoméricos, ácidos hidroxicinámicos, así como por determinados derivados de éstos [44, 46, 55].

La Tabla II-10 muestra la variación significativa de los compuestos que han sido descritos como responsables o con cierta influencia en la percepción de astringencia para los vinos en los que se han observado diferencias.

Tal y como puede observarse (Tabla II-8) y en contra de lo esperado, el envejecimiento en botella ha provocado un aumento de la astringencia percibida exclusivamente en 4 de los 16 vinos. La primera hipótesis sería que la variación en la astringencia fuera promovida por la variación de la TPAs y por la variación de las PPAs, ya que se ha demostrado que son el principal conductor de la astringencia [31, 34, 59]. A la vista de los resultados de la Tabla II-10 esta hipótesis parece no corroborarse, ya que, salvo en uno de los vinos, en todos ha descendido la concentración de TPAs,

Tabla II-10. Variación en la concentración de los compuestos durante el envejecimiento que muestran diferencias y han sido reportados como contribuyentes a la astringencia.

| Δ compuesto (mg L ⁻¹) | RB_R06 | RM_R10 | SO_C07 | BO_B10 |
|--|--------|--------|--------|---------|
| Variación astringencia | 0.76 | 0.19 | 0.66 | 0.94 |
| ácidos y derivados | | | | |
| ácido tartárico (g L ⁻¹) | -0.32 | -0.60 | -0.32 | -1.02 |
| ácido fumárico | 0.46 | 12.71 | 0 | 0 |
| ácido succínico | 0 | 0 | -35.38 | -12.36 |
| <i>t/c</i> aconítico* | -0.24 | 0.69 | -0.73 | -1.99 |
| ácido gálico | -2.52 | -6.39 | -9.74 | -12.83 |
| ácido protocatéquico | -1.46 | -0.87 | -1.52 | -1.36 |
| ácido <i>t</i> -caftárico | -16.31 | -10.28 | -15.33 | -34.23 |
| ácido cutárico | -5.14 | -3.06 | -5.68 | -9.67 |
| ácido vainílico | -1.51 | -2.22 | -1.03 | -1.92 |
| ácido caféico | -2.40 | -0.88 | -2.32 | -0.69 |
| ácido ferúlico | -0.33 | -0.82 | -0.49 | -1.79 |
| ácido siríngico | -1.48 | -5.54 | -3.95 | -3.52 |
| ácido cumárico | 0 | 0 | 0 | 0 |
| ácido elágico | -4.49 | -1.43 | -1.36 | -3.55 |
| éster etílico del ácido protocatéquico | 0 | 0 | 0 | 0 |
| éster etílico del ácido caféico | 1.11 | 0.65 | -0.18 | -0.29 |
| éster etílico del ácido gálico | -15.16 | -1.92 | -7.19 | -10.86 |
| éster etílico del ácido cumárico | 0.79 | 1.52 | 0.52 | 0.41 |
| flavanoles | | | | |
| Procianidina C1 | 2.04 | -0.22 | -0.28 | -0.31 |
| procianidina B1 | -7.77 | -9.71 | -4.87 | -11.32 |
| epigallocatequina | 0.78 | -0.84 | -0.37 | -7.07 |
| catequina | -2.56 | -2.39 | -1.35 | -3.27 |
| procianidina C2 | 0 | -0.41 | -0.36 | -0.57 |
| procianidina B2 | 0.17 | -8.73 | -1.86 | -6.06 |
| epicatequina | -1.30 | -7.01 | -1.98 | -5.77 |
| procianidina B3 | -0.18 | -0.23 | -0.13 | -0.31 |
| procianidina A2 | -0.45 | 0.21 | -0.42 | 0 |
| TPAs | 0 | -74.14 | 156.13 | -100.77 |
| PPAs | 0.43 | 0.20 | 0.41 | 0.35 |
| flavonoles | | | | |
| quercetina-3-O-glucurónido | -1.32 | -8.16 | -3.72 | -11.74 |
| quercetin-3-O-glucósido | 0 | 0 | 0 | 0 |
| siringentin-3-O-glucósido | 0.48 | 2.11 | 0.63 | 0.73 |
| quercetina | 0 | -4.81 | 0 | -3.80 |
| otros | | | | |
| IPTs | 0 | -6.70 | 0 | -3.46 |
| mDP | -6.39 | -10.93 | -6.09 | -5.03 |
| LPP | 0.20 | 0 | 0.15 | 0.30 |

*Relación entre las concentraciones de los ácidos *trans* y *cis* aconíticos.

resultando altamente llamativo que variaciones en las TPAs de 0, -74, 156, -100 mg L⁻¹, no se traducen en mayores diferencias en la astringencia. Por otro lado, aunque si es verdad que la concentración de PPA's aumenta durante el envejecimiento este aumento no se ha visto correlacionado con el aumento de la astringencia percibida.

A la vista de estos resultados y de los resultados de la Tabla II-10 de nuevo resulta difícil explicar el aumento en la astringencia percibida, ya que la mayoría de los compuestos sufren una disminución durante el envejecimiento. A pesar de ello, se realizaron correlaciones simples entre la variación de la astringencia y la variación de los distintos compuestos descritos como astringentes, existiendo una correlación positiva entre la variación de los LPP (F= 84.86; P = 0.011). Este resultado parece razonable, ya que este tipo de compuestos son capaces de reaccionar con las proteínas de la saliva forzando su precipitación [60]. En esta línea, determinados autores [44, 61,62] concluyen que los LPP parecen contribuir a la astringencia de los vinos. Por otro lado, el descenso en el grado medio de polimerización mDP también muestra una correlación significativa con la variación de astringencia (F = 41.28; P = 0.023), mostrando que el mayor aumento en la astringencia corresponde con los vinos que han tenido un menor descenso del mDP. Este resultado puede resultar contradictorio, ya que es a los taninos más polimerizados a los que se les atribuye la función astringente [45, 63]. Además, la variación de la astringencia muestra correlaciones con la variación en la concentración de ácido fumárico y del ester etílico del ácido cumárico (F = 13.59, 13.55; P = 0.066, 0.066, respectivamente). Ambos compuestos sufren un aumento de concentración durante el envejecimiento. Todos estos resultados apoyan de nuevo la hipótesis de que aun influyendo la variación de todos estos compuestos en la variación de la astringencia parecen existir fuertes interacciones que hacen modificar la percepción de este atributo.

En definitiva, se puede concluir que la variación de la astringencia durante el envejecimiento en botella es muy baja (cuatro vinos han visto modificado este atributo durante el envejecimiento y el incremento no supera la unidad) y como cuando lo hay, parecen existir fuertes interacciones sensoriales.

3.3.3. Evolución de la intensidad global y la persistencia durante el envejecimiento.

A la vista de los resultados de la Tabla II-8 se puede concluir que tanto la intensidad global como la persistencia en boca han experimentado pocas variaciones durante el envejecimiento de los vinos en botella. En la literatura se ha puesto de manifiesto la relación existente entre estos dos atributos y la astringencia y amargor de los vinos [33],

por lo que cabría esperar que los compuestos que tienen influencia en la variación de estos atributos la tuvieran también en la intensidad global y la persistencia. Sin embargo a la vista de los resultados obtenidos tanto como con el amargor como con la astringencia resulta difícil explicar la variación en estos dos atributos. De nuevo, la presencia de interacciones entre el aroma y el sabor parece la hipótesis más fuerte para poder explicar las pequeñas variaciones observadas en estos atributos.

4. CONCLUSIONES.

La composición polifenólica de este grupo de vinos ha resultado estar vinculada principalmente a la concentración de PPAs y de manera indirecta a la de TPAs. Así mismo, los resultados han puesto de manifiesto que los vinos con mayor IPT por lo general, contienen menor cantidad de ácidos, mayor grado alcohólico y mayor cantidad de azúcares reductores. La ATT ha resultado estar vinculada principalmente a la concentración de ácido tartárico pero sin embargo, los resultados del presente estudio han puesto de manifiesto la contribución del anhídrido sulfuroso combinado y de los ácidos fenólicos a la ATT del vino.

De manera general, el envejecimiento ha provocado un aumento de la T, de la PPAs, de la concentración de LPP y una disminución en la concentración de ácido tartárico, de acetaldehído, del mDP, en la concentración de todas las familias de polifenoles de bajo peso molecular y una drástica disminución/desaparición de la concentración de anhídrido sulfuroso. Sin embargo, se han encontrado comportamientos diferentes en función de la concentración inicial de polifenoles totales, del pH y de la añada de los vinos.

El efecto de la presencia de diferentes dosis de oxígeno suministradas en el momento del embotellado es bastante limitado y los vinos con menor IPT y de mayor pH resultan ser los más influenciados. El oxígeno en general, parece acentuar los cambios observados durante el envejecimiento. Es destacable que el índice de etanol (que mide la concentración de taninos unidos a polisacáridos) desciende en los vinos con menor IPT tras el envejecimiento y aumenta en los vinos de mayor IPT en este grupo de vinos.

Finalmente la vinculación de los cambios observados en las sensaciones evaluadas en boca con los cambios observados en la matriz no volátil parece difícil de establecer y parece depender en gran medida de numerosas y complejas interacciones que pueden estar teniendo lugar tanto a nivel físico-químico como cognitivo.

5. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*. Eds. Mundi Prensa, Madrid, España. pp. 217-225.
- [2] Etaio, I., Pérez-Elortondo, M. A., Gaston, E., & Schlich, P. (2009). Sensory attribute evolution in bottled young red wines from Rioja Alavesa. *European Food Research and Technology*, 228, 695-705.
- [3] Dobourdiou, D. (1992). *Les grans Bordeaux de 1945 à 1988*. Mollat, Burdeos.
- [4] Giovanelli, G., & Brenna, O. V. (2007). Oxidative stability of red wine stored in packages with different oxygen permeability. *European Food Research and Technology*, 226, 169-179.
- [5] Schwarz, M., Wabnits, T. C., & Winterhalter, P. (2003) Pathway leading to the formation of anthocyanin-vinylphenol adducts and related pigments in red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3682-3687.
- [6] Singleton, V. L. (1987). Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *American Journal of Enology and Viticulture*, 38, 69-77.
- [7] Gómez-Plaza, E., Cano-López, M. (2011). A review on micro-oxygenation of red wines: Claims, benefits and the underlying chemistry. *Food Chemistry*, 125, 1131-1140.
- [8] Castellari, M., & Simonato, G. B., Spinelli, P., & Ferrarini, R. (2004). Effects of different enological treatments on dissolved oxygen in wines. *Italian Journal of Food Science*, 16, 387-396.
- [9] Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, 458, 15-27.
- [10] Cano-López, M., Pardo-Minguez, F., Schmauch, G., Sucier, C., Teissedre P. L., López-Roca, J. M., & Gómez-Plaza, E. (2008). Effect of micro-oxygenation on color and anthocyanin-related compounds of wines with different phenolic contents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5932-5941.
- [11] Godden, P. W., Francis, L., Field, J., Gishen, M., Coulter, A. D., Valente, P., Hoj, P., & Robinson, E. (2001). Wine bottle closures: Physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine. 1. Performance up to 20 months postbottling. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7, 64-105.
- [12] Mas, A., Puig, J., Lladó, N., & Zamora, F. (2002). Sealing and storage position effects on wine evolution. *Journal of Food Science*, 67, 374-1378.
- [13] Silva, A., Lambri, M., & De Faveri, M. D. (2003). Evaluation of the performances of synthetic and cork stoppers up to 24 months post-bottling. *European Food Research and Technology*, 216, 529-534.
- [14] Mas, A., Puig, J., Llado, N., & Zamora, F. (2002). Sealing and storage position effects on wine evolution. *Journal of Food Science*, 67, 1374-1378.
- [15] Skouroumounis, G. K. Kwiatkowski, M. J., Francis, I. L., Oakey, H., Capone, D. L., Duncan, B., Sefton, M. A., & Waters, J. (2005). The impact of closure type and storage conditions on the

composition, colour and flavor properties of a riesling and a wooded Chardonnay wine during five years´ storage. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11, 369-384.

[16] Caillé, S., Samson, A., Wirth, J., Diéval, J. B., Vidal, S., & Cheynier, v. (2010). Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre ad post bottling. *Analitica Chimica Acta*, 660, 35-42.

[17] Godden, P. W., Francis, L., Field, J., Gishen, M., Coulter, A. D., Valente, P., Hoj, P., & Robinson, E. (2001). Wine bottle closures: physical characteristics and effect on composition and sensory properties of a Semillon wine. 1. Performance up to 20 months post-bottling. *Australian Journal of Grape and Wine Research*. 7, 64-105.

[18] Dimkou, E., Ugliano, M., Dieval, J. B., Vidal, S., Aagaard, O., Rauhut, D., & Jung, R. (2011). Impact of headspace oxygen and closure on sulfur dioxide, color, and hydrogen sulfide levels in a Riesling wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 62, 261-269.

[19] Wirth, J., Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Dieval, J. B., Aagaard, O., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2010). The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines. *Food Chemistry*, 123, 107-116.

[20] Wirth, J., Caillé, S., Souquet, J. M., Samson, A., Dieval, J. B., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2012). Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rosé wines. *Food Chemistry*, 132, 1861-1871.

[21] Gambuti, A., Rinaldi, A., Ugliano, M., & Moio, L. (2013). Evolution of phenolic compounds and astringency during aging of red wine: effect of oxygen exposure before and after bottling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1618-1627.

[22] O.I.V., *Recueil des methods internationales d´analyses des vins et des mouts*. Vienne, 2005

[23] AOAC (2002). Method 993.05: L-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice. *Official Methods of Analysis*.

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

[25] Llaudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., Rozes, N., Arola, L., & Zamora, F. (2004). New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 742-746.

[26] Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, d. (1999). *Química del vino, estabilización y tratamientos*. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, España. pp 177-255.

[27] Sun, B. S., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998) Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4267-4274.

[28] Labarbe, B., Cheynier, V., Brossaud, F., Souquet, J.M., & Moutounet, M. (1999). Quantitative fractionation of grape proanthocyanidins according to their degree of polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 2719-2723.

[29] Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., Fernández-Zurbano, P. (2013) Taste and mouthfeel properties of red wines proanthocyanidins and their relation to the chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 8861-8870.

- [30] Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., Bartolomé, B., Laureano, O., & Ricardo Da Silva, J. M. (2003). 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*, 51, 6475-6481.
- [31] Sáenz-Navajas, M. P., Fernandez-Zurbano, P., Tao, Y. S., Dizey, M., & Ferreira, V. (2010). Relationship between Nonvolatile Composition and Sensory Properties of Premium Spanish Red Wines and Their Correlation to Quality Perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 12407-12416.
- [32] Hidalgo Togados, J. (2003). *Tratado de Enología*. Eds. Mundi-Prensa, Madrid, España. pp. 758-820.
- [33] Mengqi, Y., Tianli Y., & Yahong, Y. (2014). Evolution of polyphenols and organic acids during the fermentation of apple cider. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. In press. DOI 10.1002/jsfa.6639.
- [34] McRae, J. M., Damberg, R. G., Kassara, S., Parker, M., Jeffery, D. W., Herderich, M. J., & Smith P. A. (2012). Phenolic compositions of 50 and 30 year sequences of Australian red wines: The impact of wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10093-10102.
- [35] Sánchez-Iglesias, M., González-San José, M. L., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., & González-Huerta, C. (2009). Effect of micro-oxygenation and Wood type on the phenolic composition and color of and aged red wine. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 57, 11498-11509.
- [36] De Simón, B. F., Cadahia, E., Sanz, M., Poveda, P., Perez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., & Gonzalez-Herta, C. (2008). Volatile compounds and sensorial characterization of wines from four Spanish denominations of origin, aged in spanish Rebollo (*Quercus pirenaica* Willd.) oak wood barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9046-9055.
- [37] Rentsch, W., Schwarz, M., & Winterhalter, P. (2007). Pyranoanthocyanins – an overview on structures, occurrence, and pathways of formation. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 526-534.
- [38] Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J. (2009). Characterisation and classification of Spanish Verdejo young white wines by volatile and sensory analysis with chemometric tools. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1927-1935.
- [39] Hopfer, H., Buffon, P. A., Ebeler, S. E., & Heymann, H. (2013). The combined effects of storage temperature and packaging on the sensory, chemical, and physical properties of a Cabernet sauvignon wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3320-3334.
- [40] Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., & Teissedre, P. L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, 126, 1971-1977.
- [41] García-Falcón, C., Pérez-Lamela, E., Martínez-Carballo, J., & Simal-Gándara, J. (2007). Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wine on their evolution. *Food Chemistry*, 105, 248-259.

- [42] Monagas, M., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2005). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle-II. Non-anthocyanin phenolic compounds. *European Food Research and Technology*, 220, 331-340.
- [43] Sarni-Manchado, P., Cheynier, V. (2006). Les polyphénols en agroalimentaire. Eds. Tec & Doc, Paris, Francia. pp 277-282.
- [44] Peleg, H., Gacon, K., Schlich, P., & Noble, A. C. (1999). Bitterness and astringency of flavan-3-ol monomers, dimers and trimers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 1123-1128.
- [45] Robichaud, J. L., & Noble, A. C. (1990). Astringency and bitterness of selected phenolics in wine. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 52, 343-353
- [46] Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008). Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9190-9199.
- [47] Gonzalo-Diago, A., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2014). Contribution of low molecular weight phenols to bitter taste and mouthfeel properties in red wines. *Food Chemistry*, 154, 187-198.
- [48] Noble, A. C. (1994). Bitterness in wine. *Physiology & Behavior*, 56, 1251-1255.
- [49] Fischer, U., & Noble, A. C. (1994). The effect of ethanol, catechin concentration, and pH on sourness and bitterness of wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 45, 6-10.
- [50] Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513, 57-65.
- [51] Keast, R. S. J., Canty, T. M., & Breslin, P. A. S. (2004). The influence of sodium salts o binary mixtures of bitter-tasting compounds. *Chemical Senses*, 29, 431-439.
- [52] Lyman, B., & Green, B. G. (1990). Oral astringency – effects of repeated exposure and interactions with sweeteners. *Chemical Sesnses*, 23, 222-233.
- [53] Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., & Waters, E. J. (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavor and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19, 596-607.
- [54] Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). An assessment of the effects of wine volátiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chesmitry*, 121, 1139-1149.
- [55] Sáenz-Navajas, Avizcuri, J. M., Ferreira, V., & Fernandez-Zurbano, P. (2012). Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chemistry*, 134, 1484-1493.
- [56] Caporale, G. Policastro, S., & Monteleone, E. (2004). Bitterness enhancement induced by cut grass odorant (cis-3-hexen-1-ol) in a model olive oil. *Food Quality and Preference*, 15, 219-227.
- [57] Gawel, R., Francis, L., & Waters, E. J. (2007). Statistical correlations between the inmouth textural characteristics and the chemical composition of Shiraz wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 2683-2687.

- [58] Landon, J. L., Weller, K., Harbertson, J. F., & Ross, C. F. (2008). Chemical and sensory evaluation of astringency in Washington State red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 59, 153–158.
- [59] Burin, V. M., Freitas-Costa, L. L., Rosier, J. P., & Bordignon-Luiz, M. T. (2011). Cabernet sauvignon wines from two different clones, characterization and evolution during bottle ageing. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 1931-1938.
- [60] Roginsky, V., De Beer, D., Habertson, J. F., Kilmartín, P. A., Barsukova, T., & Adams, D. O. (2006). The antioxidant activity of Californian red wines does not correlate with wine age. *Journal of the Science and Food and Agriculture*, 86, 834-840.
- [61] Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2006). Evolution of the phenolic content of red wines from *Vitis vinifera* L. during ageing in bottle. *Food Chemistry*, 95, 405-412.
- [62] Jaffré, J., Valentin, D., Dacremont, C., & Peyron, D. (2009). Burgundy red wines: Representation of potencial for aging. *Food Quality and Preference*, 20, 505-513.
- [63] Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle – I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins. *European Food Research and Technology*, 220, 607-614.

SECCIÓN III. CAPÍTULO III

Evolución del color y la composición antociánica de vinos tintos durante el periodo de envejecimiento en botella. Efecto de distintas concentraciones de oxígeno.

1. INTRODUCCIÓN

La primera evaluación que el consumidor realiza de un alimento o bebida está influenciada por la apariencia, en la cual, el color juega un papel muy importante [1]. Por esta razón, el color es uno de los atributos fundamentales que marcan la percepción de la calidad de los vinos, en especial la de los vinos tintos. El color proporciona información sobre el tipo de vino, tipo de elaboración, envejecimiento e incluso defectos, pudiendo muchas veces predisponer a la percepción de otras características sensoriales. Es por esto, que el color, además de tener una importante influencia en la aceptabilidad del producto por parte de los consumidores [2], es un atributo muy importante de los vinos tintos ya que permite anticiparse a las propiedades gustativas y/o aromáticas en base a la experiencia previa del consumidor [3].

El color rojo-violáceo de los vinos jóvenes, el cual tornará hacia rojo-teja en los vinos con un cierto tiempo de envejecimiento, es debido fundamentalmente a los antocianos libres. El cambio de color durante el envejecimiento se atribuye a la progresiva formación de nuevos pigmentos [4, 5], lo que conlleva una disminución de los antocianos libres originales [4, 6, 7]. En la actualidad, se conocen cientos de antocianos y derivados de éstos con diferentes estructuras químicas y características cromáticas [8-15]. El color rojo-teja de los vinos envejecidos se debe principalmente a los pigmentos poliméricos y piranoantocianos, además de a los antocianos libres residuales. Los pigmentos poliméricos son compuestos formados por reacciones de condensación de los antocianos con otros compuestos polifenólicos como los flavanoles, a partir de los cuales se forman aductos antociano-flavanol, pudiendo tener lugar esta condensación de forma directa (unión interflavanol) o indirecta a través de puentes etilo formados a partir del acetaldehído. Los piranoantocianos resultan de reacciones de cicloadición de antocianos con metabolitos secundarios de la fermentación tales como el ácido pirúvico (vitisinas tipo-A) [9], acetaldehído (vitisina tipo-B), vinilfenoles [11] y derivados de los ácidos hidroxicinámicos [8]. Estos metabolitos secundarios además de proceder del metabolismo secundario de la fermentación, pueden proceder de rutas oxidativas, como por ejemplo, el acetaldehído que puede proceder de la oxidación del etanol [16] (ver

Figura III-1), o el ácido pirúvico que puede resultar de la oxidación de los ácidos tartárico, málico y láctico por radicales hidroxilo producidos en las reacciones de Fenton [17] (ver Figura III-2). Los productos de condensación entre antocianos y flavanoles, A-F, (tanto por condensación directa como por puentes de etilo), dan lugar a matices rojo-azulados en los vinos debido a un cambio batocrómico en su máximo de absorción en la región del visible [10, 18]. Los piranoantocianos tienen características cromáticas muy diferentes de los antocianos originales mostrando matices anaranjados y constituyendo por lo tanto una familia muy importante de pigmentos que contribuye al color global del vino [19]. Una característica cromática común de estos derivados pigmentados es su mayor resistencia a la decoloración por bisulfito y a cambios en el pH [14], que hacen que aumente la estabilidad del color en los vinos envejecidos.

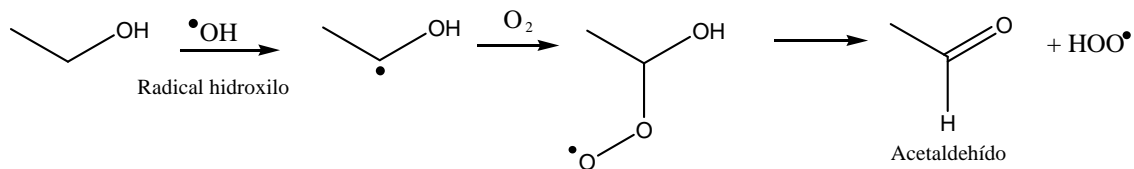


Figura III-1. Oxidación no enzimática del etanol a acetaldehído.

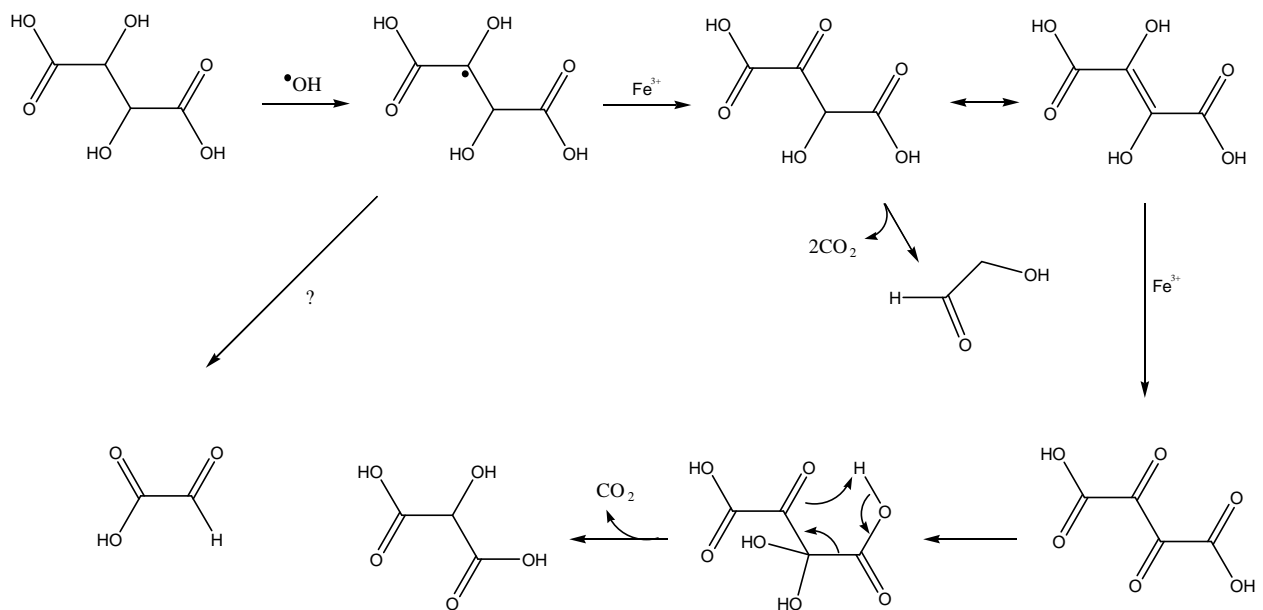


Figura III-2. Oxidación del ácido tartárico mediante las reacciones de Fenton.

Todos estos compuestos van aumentando su concentración a lo largo del envejecimiento gracias a las reacciones de oxidación, debidas al aporte continuo de oxígeno al vino. Durante el envejecimiento en botella, el aporte de oxígeno es muy reducido pero indispensable para que siga la formación y degradación de este tipo de compuestos. Wirt y col. y Caille y col. [20, 21] en ensayos de envejecimiento con

distintas tasas de transferencia de oxígeno (OTR) concluyeron que, los vinos conservados con OTRs más altas mostraban valores más altos de intensidad de color (IC). Este hecho lo atribuían a la liberación de compuestos decolorados por el anhídrido sulfuroso, ya que los vinos con mayor OTR presentaban valores inferiores de este antioxidante. Además, paralelamente existe una formación de pigmentos poliméricos resistentes a la decoloración. También observaron una concentración más alta de piranoantocianos durante todo el proceso de envejecimiento, concluyendo que su concentración aumentaba durante todo el proceso y que además estaba correlacionada con la OTR. Por ello, establecieron a éstos como posibles marcadores de la oxidación.

Monagas y col. [7] en un ensayo sobre la evolución que sufren los antocianos en botella con 3 variedades diferentes (Tempranillo, Graciano y Cabernet Sauvignon) concluyeron que la tasa de desaparición de los antocianos libres durante el envejecimiento era independiente de la variedad y de la concentración inicial de antocianos, aunque las variedades presentaran perfiles antociánicos distintos y distintos valores de concentración. Igualmente, concluyeron que la tasa de degradación de los piranoantocianos era menor que la de los antocianos libres, pero que aún así disminuía su concentración durante el periodo de envejecimiento en contraposición a lo obtenido por Wirt y col. [20]. Los aductos antociano-flavanol eran los únicos que permanecían constantes.

Gambutí y col. [22] en otro ensayo con dos vinos de la variedad Garnacha con una concentración de polifenoles inicial diferente y tres OTRs, concluyeron que el vino con menor concentración de polifenoles mostraba diferencias en la intensidad de color (IC), presentando el vino con la OTR intermedia un valor significativamente mayor para esta variable que el de mayor OTR. Para el caso del vino con mayor concentración inicial de polifenoles no encontraron diferencias significativas entre los distintos niveles de OTR para la IC. De manera análoga a lo observado en la IC, los antocianos libres presentes en el vino con menor concentración de polifenoles sufrieron una disminución con OTRs crecientes, no encontrándose dicho efecto en el vino de mayor contenido polifenólico. Estos resultados parecen ser contradictorios a los obtenidos por Wirt y col. [20], quienes establecían a los antocianos como los compuestos con mayor facilidad para oxidarse ejerciendo un efecto protector sobre los demás compuestos polifenólicos.

A la vista de todos estos resultados, que aparentemente son contradictorios y debido a la importancia del color del vino y su composición antocianica en la percepción de calidad, así como que los trabajos existentes se han limitado a un número reducido

de muestras [20, 21, 22, 23] los objetivos de este trabajo fueron: (1) definir el espacio de color de un número relativamente alto de vinos tintos comerciales de distinta composición polifenólica, variedad, añada, tiempo de envejecimiento y (2) estudiar la evolución de todas estas muestras con distintas dosis de oxígeno durante un periodo de envejecimiento de 6 meses a 25 °C, con el fin de evaluar la evolución de los parámetros de color y de su composición antocianica.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Vinos

El estudio se ha llevado a cabo con los 16 vinos tintos españoles, listados en la Tabla 0-1 de la presentación de esta Sección, así como con los ochenta vinos resultantes del ensayo de envejecimiento: 6 meses de envejecimiento a 25 °C y sometidos a 5 dosis diferentes de oxígeno (16 vinos x 5 dosis).

Los vinos seleccionados cubrieron un amplio rango de intensidad de color (IC) y composición polifenólica, que partían de diferentes estados de oxidación medido por la tonalidad (abs 420/abs 520) y la coordenada b_{10}^* (color amarillo).

2.2. Análisis químicos

2.2.1. Reactivos.

Todos los productos químicos utilizados fueron de calidad analítica. Todos los disolventes cromatográficos fueron de calidad HPLC. Se obtuvo agua ultrapura de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Molsheim, Francia). El metanol, ácido fórmico, etanol, acetonitrilo, acetaldehído, ácido acético, metabisulfito de potasio y ácido sulfúrico fueron suministrados por Scharlab (España). La ovoalbúmina (grado V) y el ácido tartárico se adquirieron en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El estándar malvidin-3-*O*-glucósido fue suministrado por Extrasynthèse (Genay, Francia).

2.2.2. Análisis de los parámetros de color clásicos.

Los parámetros de color clásicos de los vinos se determinaron de acuerdo a las prácticas oficiales de la OIV [24]. La intensidad de color (IC) fue calculada como la suma de las absorbancias a 420 nm, 520 nm, y 620 nm [25]. El contenido total de polifenoles (IPT) se estimó midiendo la absorbancia de los vinos a 280 nm [26]. La tonalidad (T) se estimó como el cociente entre la absorbancia a 420 nm y 520 nm. La determinación del anhídrido sulfuroso (libre y combinado) se realizó mediante las prácticas oficiales de la OIV [24].

2.2.3. Análisis de antocianos por UPLC-UV-Vis-MS.

El análisis cromatográfico de antocianos fue realizado empleando un sistema Ultra Performance LCTM Waters ACQUITY (Waters, Milford, MA, USA) acoplado a un detector UV-Vis TUV Detector ACQUITY (Waters, Milford, MA, USA) y a un espectrofotómetro de masas de alta resolución microTOF II (Bruker Daltonik, Germany) equipado con una fuente de ionización Apollo II ESI/APCI (*electrospray/atmospheric pressure chemical*

ionization). El software de análisis de datos Bruker Daltonics (Versión 3.4, Waters, Milford, MA, USA) fue utilizado para el control del instrumento, procesado y adquisición de datos. Las muestras previamente filtradas por filtros de nailon de 0.22 μm fueron inyectadas en una columna de fase reversa BEH C18, de tamaño de partícula 1.7 μm , 2.1 mm de diámetro interno y 100 mm (Waters, Milford, MA, USA), la cual se mantuvo termostaticada a 40 °C durante todo el análisis. El flujo de la fase móvil fue 0.45 mL min^{-1} . El volumen de inyección fue 7.5 μL .

Para la separación y cuantificación se utilizaron como eluyentes agua/ácido fórmico (5%) como fase A y acetonitrilo/ácido fórmico (5%) como fase B. La elución se inició con un gradiente de fase A de 95 - 85% en 0 - 3 min; 85 - 55% en 3 - 12.5 min; 55 - 100% en 12.5 - 13 min, tras el gradiente la columna se equilibró con las condiciones iniciales durante 2 minutos. La interfaz de ionización por electrospray (ESI) operó en modo positivo empleando un rango de masas entre m/z 120 - 1500 (potencial capilar 3.5 kV, gas nebulizador 3.0 bar, temperatura de secado del gas 180 °C y un flujo 9.0 L min^{-1}). La cuantificación de todos los compuestos antocianicos se expresó en mg L^{-1} de malvidin-3-*O*-glucósido. La identificación se realizó en base a los espectros MS/MS y comparando con el tiempo de retención y la masa espectral obtenidos de la bibliografía [19, 20]. Las medidas fueron realizadas por duplicado.

2.2.4. Medidas colorimétricas.

Se midieron los espectros de transmitancia en el visible (380 – 770 nm) de todos los vinos y se calcularon las coordenadas de color usando el procedimiento CIE (CIE 15:2004), con el observador estándar CIE 1964 10° y el iluminante D65, de acuerdo con la OIV [27]. El espesor de la cubeta utilizada fue de 2 mm y se empleó agua destilada como blanco de referencia [28, 29]. Los parámetros calculados fueron L_{10}^* , a_{10}^* y b_{10}^* . La claridad (L_{10}^*) estima la capa del vino, variando desde completamente opaco (valor 0) a totalmente transparente (100). Las coordenadas a_{10}^* y b_{10}^* indican la cromaticidad de la muestra, oscilando la coordenada a_{10}^* desde valores negativos (verdes) a valores positivos (rojos) y la coordenada b_{10}^* oscila desde valores negativos (azules) a valores positivos (amarillos).

2.2.5. Determinación del contenido en pigmentos poliméricos.

El análisis de los pigmentos poliméricos se realizó de acuerdo con el método propuesto por Habertson y col. [30]. De modo que se prepararon dos disoluciones distintas: disolución 1 con 200 mM de ácido acético, 170 mM de NaCl y ajuste del pH a 4.9 con NaOH y, disolución 2 con 200 mM de ácido acético, 170 mM de NaCl, ajuste del

pH a 4.9 con NaOH y una concentración de 1 g L^{-1} de ovoalbúmina. A continuación se realizaron dos medidas: (1) de la disolución formada por 1 mL de disolución 1, 500 μL y 120 μL de bisulfito de potasio 0.36 M y se realizó la Medida A a 520 nm después de 10 minutos y (2) la disolución formada por 1 mL de disolución 2 y 500 μL de vino se agitó suavemente durante 15 min, se centrifugó durante otros 15 min a 4000 rpm y finalmente se tomó 1 mL del sobrenadante que se colocó en una cubeta de 10 mm de paso óptico y se le añadieron 80 μL de bisulfito de potasio 0.36 M realizándose la Medida B a 520 nm después de 10 min de reposo. La Medida B corresponde a los pigmentos poliméricos de bajo peso molecular (no decolorables con metabisulfito y no precipitables con ovoalbúmina, SPP), la diferencia entre la Medida A y B corresponde a los pigmentos poliméricos de alto peso molecular (no decolorables con metabisulfito y precipitables con proteína, LPP).

2.2.6. Determinación del contenido de antocianos copigmentados.

La determinación del contenido en antocianos copigmentados se realizó de acuerdo con el método descrito por Boulton [31]. Se determinó así la fracción de color debida a los antocianos copigmentados. Inicialmente se ajustó el pH de las muestras de vino a 3.6. El color total (A_{acet}) del vino se determinó como la medida de la absorbancia a 520 nm tras la eliminación del efecto del anhídrido sulfuroso mediante la adición de 20 μL de acetaldehído al 10%.

El color del vino sin la contribución de los antocianos copigmentados (A_{20}) se estimó como la absorbancia medida a 520 nm de la muestra de vino diluida 20 veces con una disolución buffer. La hidratación producida por esta dilución conduce a la disociación de los complejos de copigmentación existentes, mientras que la contribución de los antocianos libres y los pigmentos poliméricos permanece.

El color debido a los antocianos copigmentados es $[(A_{\text{acet}} - A_{20}) / A_{\text{acet}}]$;

2.3. Análisis estadísticos

Todos los análisis se realizaron por duplicado, expresando los resultados como la media de las dos medidas. Todos los análisis estadísticos se han realizado usando el paquete estadístico SPSS, versión 19 para Windows. El efecto del envejecimiento se ha evaluado mediante el análisis de ANOVA de un factor. Los niveles de significación se establecieron en el 95% ($P < 0.05$).

El análisis de componentes principales (PCA) y el análisis clúster (HCA) se realizó con el programa SPAD, versión 5.5 (Montreal, Francia).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Coordenadas de color y composición antociánica de los vinos antes del envejecimiento

En la Tabla III-1 se muestra la concentración de anhídrido sulfuroso libre, combinado, IC (intensidad de color), T (tonalidad) y coordenadas de color de los vinos antes del envejecimiento. Como puede observarse en la Tabla III-1 los vinos cubren un amplio rango de intensidad de color fluctuando entre 7.3 puntos para el vino Señorío de la Obra (SO_C07) y 19.3 puntos para el vino Marqués de Griñón (MG_V05), mientras que el contenido polifenólico (IPTs) oscila entre 45.4 puntos para el vino Beturia (BE_R10) y 83.3 puntos para el vino MG_V05. Debido a la gran diversidad de vinos (origen, añada, tipo de elaboración, variedad...) además de presentar grandes diferencias en intensidad de color, también presentan diferencias en la tonalidad, así como en las medidas colorimétricas.

Tabla III-1. Concentración inicial de SO₂ libre, SO₂ combinado, IC, T y coordenadas de color de los vinos en el momento inicial.

| vinos | SO ₂ libre (mg L ⁻¹) | SO ₂ combinado (mg L ⁻¹) | IC (UA) | T | a ₁₀ * | b ₁₀ * | L ₁₀ * | IPTs |
|--------------|--|---|------------|------|-------------------|-------------------|-------------------|------|
| MC_R09 | 15.2 | 35.2 | 8.8 | 0.80 | 38.4 | 10.0 | 57.5 | 52.3 |
| BE_R10 | 18.4 | 33.6 | 8.0 | 0.71 | 40.3 | 5.1 | 59.4 | 45.4 |
| RB_R06 | 8.0 | 67.2 | 8.6 | 0.92 | 33.2 | 18.1 | 60.2 | 49.4 |
| CH_R10 | 7.2 | 16.0 | 13.3 | 0.77 | 43.8 | 10.5 | 43.3 | 60.3 |
| SC_R10 | 23.2 | 33.6 | 11.0 | 0.69 | 45.4 | 6.7 | 49.0 | 57.8 |
| RN_R09 | 29.1 | 76.8 | 7.7 | 0.82 | 34.0 | 11.3 | 62.0 | 49.6 |
| AR_A07 | 23.6 | 32.0 | 8.8 | 0.79 | 37.4 | 10.7 | 38.9 | 53.0 |
| RM_R10 | 17.1 | 89.2 | 18.7 | 0.71 | 47.1 | 14.0 | 31.5 | 66.4 |
| GC_B10 | 17.6 | 51.2 | 14.0 | 0.64 | 53.2 | 10.3 | 41.8 | 71.4 |
| MG_V05 | 8.0 | 25.6 | 19.3 | 0.79 | 46.5 | 26.6 | 34.4 | 83.3 |
| SO_C07 | 8.8 | 48.0 | 7.3 | 0.85 | 35.1 | 13.8 | 64.6 | 54.8 |
| AY_C05 | 6.4 | 58.4 | 10.8 | 0.94 | 41.1 | 27.6 | 55.3 | 74.3 |
| CD_C10 | 19.6 | 64.4 | 14.9 | 0.66 | 53.3 | 13.0 | 40.2 | 66.4 |
| CT_B07 | 15.6 | 64.0 | 9.2 | 0.77 | 42.2 | 13.7 | 57.6 | 59.0 |
| BO_B10 | 8.0 | 19.2 | 12.5 | 0.66 | 51.5 | 9.6 | 45.7 | 61.0 |
| CZ_D07 | 11.2 | 28.8 | 9.6 | 0.76 | 41.1 | 10.5 | 54.3 | 62.0 |
| máx | 29.1 | 60.2 | 19.3 | 0.94 | 27.6 | 53.3 | 64.6 | 83.3 |
| media | 14.8 | 31.6 | 11.4 | 0.77 | 13.2 | 42.7 | 50.9 | 60.4 |
| min | 6.4 | 16.0 | 7.2 | 0.64 | 5.1 | 33.1 | 31.5 | 45.4 |

Como era de esperar, los valores más altos de T y de la coordenada b₁₀^{*}, que representan el color amarillo de los vinos, corresponden con los vinos de las añadas más viejas y con los periodos de envejecimiento en barrica más largos. De hecho, se han encontrado correlaciones significativas negativas entre la añada y la T (F = 6.11; P = 0.02) y la coordenada b₁₀^{*} (F = 11.27; P = 0.04). Estos resultados están de acuerdo

con el hecho de que durante el envejecimiento existe una evolución continua de la materia colorante hacia la formación de moléculas más complejas y de mayor tamaño, pigmentos poliméricos, que junto a los piranoantocianos son los principales responsables del color en los vinos envejecidos y muestran especialmente tonalidades anaranjadas y amarillas [13, 32, 33].

Por otro lado, la importancia de medir la concentración de anhídrido sulfuroso, tanto libre como combinado, reside en que al pH del vino la forma predominante de éste es la forma bisulfito (HSO_3^-), que reacciona de forma reversible con el catión flavilio formando un producto incoloro. Además, el anhídrido sulfuroso también se une de forma mucho más estable con el etanal (anhídrido sulfuroso combinado), el cual interviene como agente copolimerizante de antocianos con taninos. Se puede comprobar, que la concentración de anhídrido sulfuroso tanto libre como combinado está dentro de los límites legales en todos los casos. Además se puede observar, que de forma general, los vinos de las añadas más viejas son los que menos concentración de anhídrido sulfuroso libre presentan, hecho esperable ya que son los vinos que más tiempo llevan embotellados.

La coordenada L_{10}^* , variable inversamente correlacionada con el potencial de envejecimiento de los vinos tintos [34], presenta una alta correlación inversa con la IC ($F = 44.08$; $P < 0.001$). Por otra parte, la coordenada a_{10}^* , que mide el color rojo de los vinos, también presenta una correlación positiva con la IC ($F = 15.98$; $P = 0.001$), indicando que los vinos con mayor IC son también los que tienen mayores tonos rojos.

Con el fin de obtener una información detallada sobre la composición antociánica se llevó a cabo un análisis UPLC-UV-Vis-MS de los antocianos que se muestran en la Tabla III-2. Para la presentación de los resultados y la discusión de los mismos, los compuestos analizados se han agrupado en cuatro categorías diferentes de acuerdo con su estructura química: antocianos glicosilados o libres, antocianos acilados, piranoantocianos y dímeros de antociano-flavanol (MV-F) (Tabla III-3). Además, para completar el perfil antociánico de los vinos se analizó la concentración de antocianos copigmentados, así como los pigmentos poliméricos de bajo peso molecular (SPP) y pigmentos poliméricos de alto peso molecular (LPP).

La Tabla III-3 muestra que los vinos cubren un amplio rango de concentraciones mostrando una gran heterogeneidad, lo que resulta altamente interesante con el fin de poder observar distintas evoluciones. Todos los valores son similares a los descritos en la bibliografía para vinos tintos [31, 35], siendo el antociano más abundante la

Evolución del color y la composición antocianica de vinos tintos durante el periodo de envejecimiento en botella. Efecto de distintas concentraciones de oxígeno.

Tabla III-2. Identificación, familia, espectro MS y MS² (M+: ion molecular cargado positivamente), tiempo de retención (t_R), identificación, concentraciones medias, máximas (máx) y mínimas (mín). Las concentraciones de los antocianos están expresadas en mg L⁻¹ de malvidin-3-O-glucosido.

| pico | familia | M ⁺ (m/z) | MS ² | t _R (min) | compuesto | máx. | media. | mín. |
|------|--|-------------------------|-----------------|-------------------------|--|-------|--------|------|
| 1 | piranoantociano | 489 | 327 | 1.2 | vitisina B de delphinidin-3-O-glucosido | 0.22 | 0.13 | 0.04 |
| 2 | antociano glicosilado + dímero de condensación | 465 / 781 | 303 / 619 | 2.0 | delphinidin-3-O-glucosido + malvidin-3-O-glucosido y (epi) catequina | 17.00 | 8.72 | 0.47 |
| 3 | antociano glicosilado | 449 | 287 | 2.4 | claudin-3-O-glucosido | 2.12 | 1.11 | 0.30 |
| 4 | antociano glicosilado | 479 | 317 | 2.7 | petundin-3-O-glucosido | 17.80 | 8.25 | 0.33 |
| 5 | antociano glicosilado | 463 | 301 | 3.2 | peonidin-3-O-glucosido | 6.52 | 3.02 | 0.10 |
| 6 | antociano glicosilado | 493 | 331 | 3.4 | malvidin-3-O-glucosido | 72.43 | 36.35 | 2.48 |
| 7 | antociano acilado | 507 | 303 | 3.6 | delphinidin-3-O-(6'-acetil)glucosido | 0.96 | 0.29 | 0.04 |
| 8 | piranoantociano | 561 | 399 | 3.7 | vitisina A de malvidin-3-O-glucosido | 4.21 | 2.76 | 1.98 |
| 9 | piranoantociano | 517 | 355 | 4.0 | vitisina B de malvidin-3-O-glucosido | 0.18 | 0.08 | 0.04 |
| 10 | piranoantociano / antociano acilado | 559 / 491 | 355 / 287 | 4.2 | vitisina B de malvidin-3-O-(6'-acetil)glucosido / claudin-3-O-(6'-acetil)glucosido | 0.82 | 0.25 | 0.04 |
| 11 | antociano acilado | 521 | 317 | 4.6 | petundin-O-(6'-acetil)glucosido | 2.14 | 0.52 | 0.08 |
| 12 | dímero de condensación | 809 | 357 | 4.9 | malvidin-3-O-glucosido-8-etil-(epi)catequina | 0.71 | 0.34 | 0.12 |
| 13 | antociano acilado | 611 | 303 | 5.3 | delphinidin-3-O-(6'-p-cumaril)glucosido | 3.48 | 1.82 | 0.08 |
| 14 | antociano acilado | 535 | 331 | 5.8 | malvidin-3-O-(6'-acetil)glucosido | 10.63 | 3.31 | 0.07 |
| 15 | piranoantociano | 707 | 399 | 5.9 | vitisina A de malvidin-3-O-(6'-p-cumaril)glucosido | 0.86 | 0.42 | 0.23 |
| 16 | antociano acilado | 625 | 317 | 6.7 | petundin-3-O-(6'-p-cumaril)glucosido | 2.76 | 1.16 | 0.04 |
| 17 | antociano acilado | 639 | 331 | 7.3 | malvidin-3-O-(6'-p-cumaril)glucosido cis | 1.97 | 0.52 | 0.18 |
| 18 | antociano acilado | 609 | 301 | 8.0 | peonidin-3-O-(6'-p-cumaril)glucosido | 2.05 | 0.97 | 0.07 |
| 19 | antociano acilado / piranoantociano | 639 / 771 | 331 / 463 | 8.2 | malvidin-3-O-(6'-p-cumaril)glucosido trans/ malvidin-3-cumarilglucosido-4-vinilcatecol | 7.62 | 4.04 | 0.53 |
| 20 | piranoantociano | 651 | 447 | 9.4 | malvidin-3-acetilglucosido-4-vinilferol | 2.28 | 0.50 | 0.14 |
| 21 | piranoantociano | 755 | 447 | 10.7 | malvidin-3-cumarilglucosido-4-vinilferol | 0.07 | 0.05 | 0.04 |

Tabla III-3. Concentración de antocianos copigmentados, antocianos monoméricos (MP), pigmentos poliméricos de bajo peso molecular (SPP), pigmentos poliméricos de alto peso molecular (LPP), antocianos glicosilados (glicosidados), antocianos acilados (acilados), piranoantocianos y aductos antociano flavanol (MV-F) de los vinos antes del envejecimiento.

| Vino | copigmentados | SPP (UA) | LPP (UA) | glicosilados (mg L ⁻¹) | acilados (mg L ⁻¹) | Piranoantocianos (mg L ⁻¹) | MV-F (mg L ⁻¹) |
|--------|---------------|----------|----------|------------------------------------|--------------------------------|--|----------------------------|
| MC_R09 | 2.96 | 0.23 | 0.32 | 74.04 | 15.09 | 3.07 | 0.29 |
| BE_R10 | 2.11 | 0.24 | 0.24 | 66.01 | 14.56 | 2.66 | 0.33 |
| RB_R06 | 0.99 | 0.22 | 0.40 | 18.08 | 4.18 | 3.42 | 0.14 |
| CH_R10 | 2.81 | 0.43 | 0.36 | 88.28 | 18.90 | 7.35 | 0.46 |
| SC_R10 | 3.29 | 0.25 | 0.30 | 113.26 | 22.27 | 6.32 | 0.44 |
| RN_R09 | 1.98 | 0.23 | 0.35 | 64.21 | 13.92 | 3.26 | 0.21 |
| AR_A07 | 2.04 | 0.38 | 0.26 | 58.71 | 11.70 | 4.58 | 0.18 |
| RM_R10 | 2.84 | 0.50 | 0.50 | 63.55 | 9.14 | 6.15 | 0.45 |
| GC_B10 | 1.56 | 0.50 | 0.52 | 61.47 | 14.28 | 4.72 | 0.41 |
| MG_V05 | 1.12 | 1.17 | 0.28 | 4.03 | 4.28 | 5.74 | 0.00 |
| SO_C07 | 0.16 | 0.23 | 0.31 | 44.89 | 10.25 | 5.57 | 0.23 |
| AY_C05 | 0.00 | 0.60 | 0.35 | 5.50 | 1.46 | 3.31 | 0.22 |
| CD_C10 | 2.35 | 0.77 | 0.49 | 94.16 | 26.13 | 4.26 | 0.62 |
| CT_B07 | 0.00 | 0.61 | 0.40 | 29.15 | 7.45 | 3.53 | 0.12 |
| BO_B10 | 1.57 | 0.66 | 0.32 | 85.48 | 21.82 | 5.70 | 0.71 |
| CZ_D08 | 2.77 | 0.54 | 0.32 | 48.53 | 8.84 | 3.87 | 0.25 |
| máx | 3.29 | 1.17 | 0.52 | 113.26 | 26.13 | 7.35 | 0.71 |
| media | 1.66 | 0.47 | 0.36 | 57.46 | 12.74 | 4.14 | 0.34 |
| min | 0.00 | 0.22 | 0.24 | 4.03 | 1.46 | 2.66 | 0.00 |

malvidin-3-*O*-glucósido, que se encuentra presente en estos vinos en una concentración más de cuatro veces superior a los siguientes antocianos glicosilados: delphinidina-3-*O*-glucósido y petunidin-3-*O*-glucósido.

La mayor concentración de antocianos copigmentados la presentan los vinos más jóvenes, de hecho, existe una correlación positiva significativa entre la concentración de éstos y la añada ($F = 20.48$; $P \leq 0.001$). Estos compuestos contribuyen a formar más de la mitad del color de los vinos jóvenes [31].

La fracción de SPP contiene pigmentos del tipo vitisinas, dímeros y trímeros formados por condensación de antocianos y flavanoles tanto por vía directa como indirecta [30], cuya formación y desaparición es continua desde la fermentación y durante todo el envejecimiento [9], por lo que sería esperable encontrarlos en niveles constantes durante el envejecimiento y se esperaría no encontrar diferencias en los vinos en función de su año de elaboración. Aunque, y en contra de lo esperado, los vinos de este estudio presentan una correlación positiva significativa con la añada ($F = 3.18$; $P = 0.09$) indicando que los vinos sometidos a un mayor tiempo de envejecimiento tienen una menor concentración de SPP. Los niveles medios (0.47 UA) están en línea con los descritos en vinos tintos (0.31 - 0.86 UA) [36].

Por otro lado, la formación de pigmentos poliméricos de mayor peso molecular (LPP) es lenta y continua a lo largo del envejecimiento, por lo que sería esperable que los vinos más envejecidos tuvieran una mayor concentración de LPP, sin embargo esto no ocurre en este set de vinos. Aunque no hay que olvidar que cuando estas moléculas son suficientemente grandes pueden llegar a precipitar viéndose reducida su concentración [9].

En cuanto a los antocianos de bajo peso molecular y decolorables por metabisulfito, los vinos de este estudio presentan diferencias cualitativas y cuantitativas en la concentración tanto de los antocianos procedentes de las uvas (antocianos glicosilados o libres y acilados) como los formados durante la elaboración (MV-F y piranoantocianos) debido a las diversas variedades, distintas zonas de cultivo, diferentes añadas y diferentes procesos de elaboración. El contenido en antocianos presentes en los vinos estudiados se encuentra en el rango de concentraciones encontradas en la bibliografía [35-37]. Estos compuestos intervienen en múltiples reacciones durante el proceso de envejecimiento disminuyendo drásticamente su concentración, hecho que queda altamente patente observando la concentración de estos y la edad del vino. De hecho, existen correlaciones positivas significativas entre todas las familias de antocianos y la

añada ($P < 0.001$) excepto para los piranoantocianos ($F = 0.96$; $P = 0.34$), cuya contribución al color de los vinos envejecidos ha sido ampliamente demostrada [38].

3.2. Definición del espacio de color de los vinos antes del envejecimiento. Análisis de componentes principales (PCA)

Con el objetivo de evaluar la relación existente entre las coordenadas de color del vino y su composición antocianica, así como definir el espacio de color formado por las 16 muestras estudiadas, se calculó un PCA con las familias de antocianos y parámetros de color de las Tablas III-1 y III-3. Según la aproximación de la ley de Kaiser, se tuvieron en cuenta las 3 primeras componentes principales que explicaron prácticamente el 80% de la varianza original. Las Figuras III-3 y III-4 muestran los gráficos donde se ilustra la distribución de las muestras sobre las tres primeras PCs. La PC1 está principalmente caracterizada por los antocianos glicosilados (93%), acilados (92%), dímeros MV-F (84%) y por los antocianos copigmentados (79%) de forma positiva y por la T (86%) de forma negativa. Esta componente parece estar relacionada con la añada, ya que los vinos de la añada más joven se proyectan a la derecha del plano, caracterizados por contener una mayor concentración de antocianos glicosilados, acilados, MV-F y copigmentados así como una menor T. En cuanto a la PC2, que explica aproximadamente el 26% de la varianza original, esta principalmente caracterizada por la concentración de anhídrido sulfuroso libre (49%) de forma positiva y por la IC (87%), los SPP (86%) y por la concentración de piranoantocianos (70%) de manera negativa, indicando que los vinos situados más arriba del plano se caracterizan por contener mayor IC, mayor concentración de SPP, piranoantocianos y mayor concentración de anhídrido sulfuroso. Finalmente la PC3, que explica aproximadamente el 16% de la varianza original esta principalmente caracterizada por el pH (69%) de manera positiva y por la concentración de anhídrido sulfuroso combinado (86%) y los LPP (75%) de manera negativa.

La matriz de correlación obtenida del PCA para los 16 vinos estudiados reveló que la IC de los vinos de este grupo está principalmente correlacionada con la concentración de piranoantocianos, SPP, la coordenada a_{10}^* y en menor medida con los LPP ($F = 21.93, 16.61, 15.84, 3.25$; $P < 0.001, < 0.001, < 0.001, = 0.084$ respectivamente). Es destacable que aparte de los piranoantocianos ningún otro grupo de antocianos analizados por UPLC-UV-Vis muestra correlación con la IC, revelando de nuevo la contribución de estos compuestos al color del vino.

Evolución del color y la composición antocianica de vinos tintos durante el periodo de envejecimiento en botella. Efecto de distintas concentraciones de oxígeno.

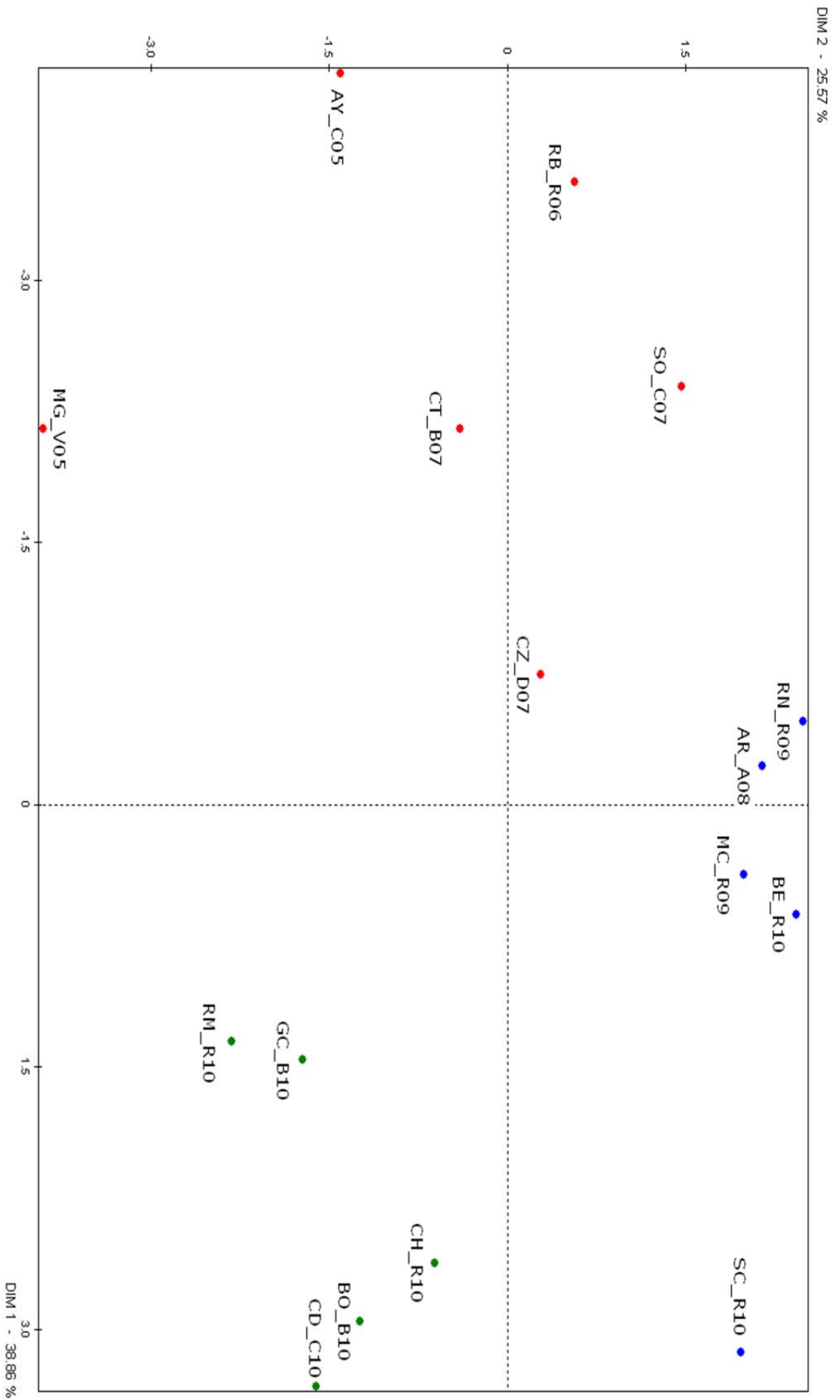


Figura III-3. Proyección de las muestras en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del análisis de componentes principales (PCA) antes del envejecimiento. (colores diferentes indican clúster diferentes. Color azul: clúster 1, color verde: clúster 2 y color rojo: clúster 3.

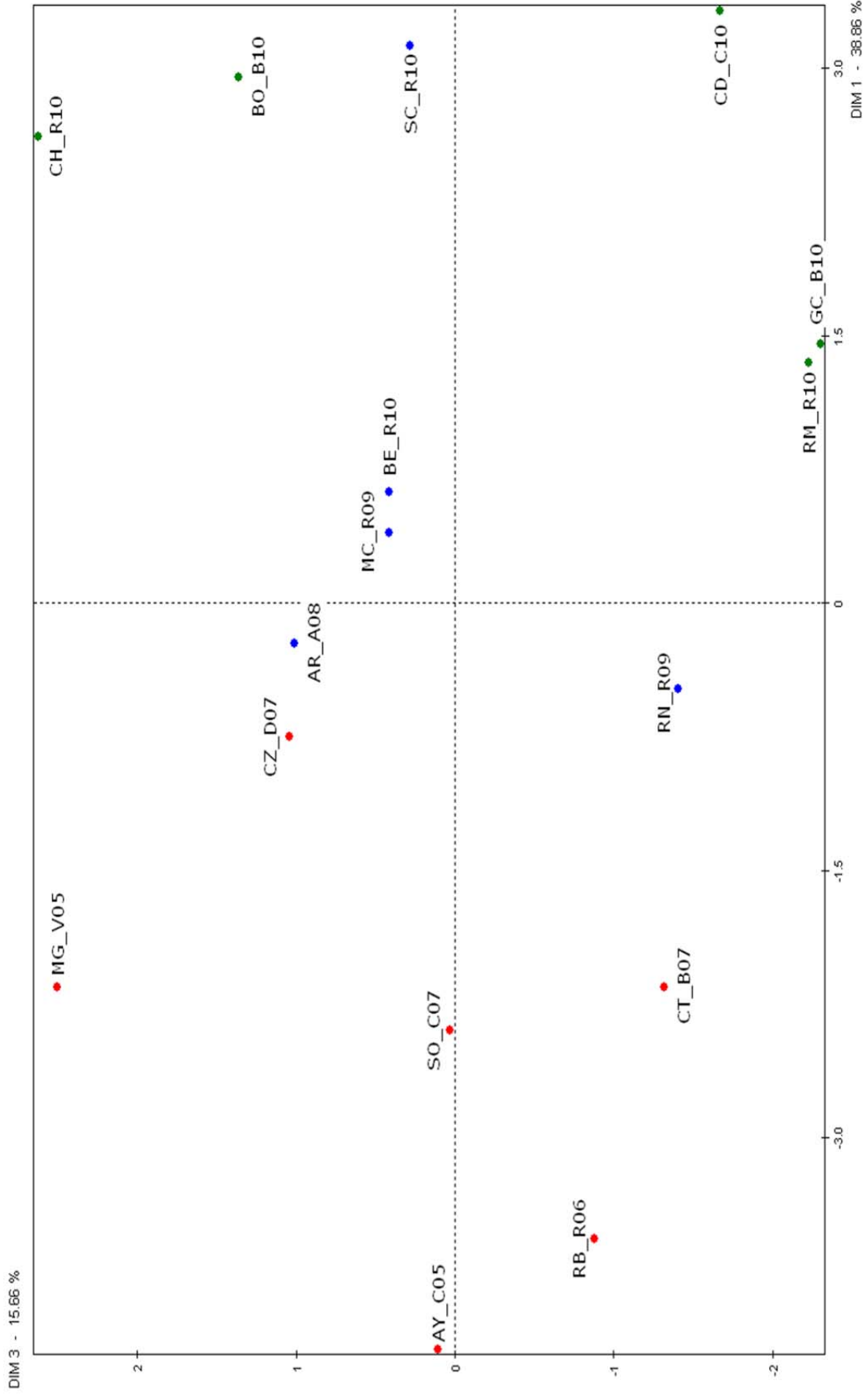


Figura III-4. Proyección de las muestras en el plano bidimensional (PC1 y PC3) obtenido del análisis de componentes principales (PCA) antes del envejecimiento. (colores diferentes indican clúster diferentes. Color azul: clúster 1, color verde: clúster 2 y color rojo: clúster 3.

Por otra parte, todas las familias de antocianos a excepción de la de piranoantocianos se oponen al aumento de la coordenada b_{10}^* (color amarillo), presentando correlaciones negativas con dicha coordenada ($F = 25.33, 12.77, 4.72$; $P = 0.000, 0.003, 0.040$ glicosilados, acilados y MV-F respectivamente). Del mismo modo, los antocianos copigmentados ($F = 6.09$; $P = 0.02$) y la concentración de anhídrido sulfuroso libre ($F = 5.15$; $P = 0.039$) presentan correlaciones negativas con la coordenada b_{10}^* , lo que se traduce en menores tonos amarillos en los vinos con mayores niveles de anhídrido sulfuroso libre y antocianos copigmentados. Sin embargo, los SPP presentan una correlación positiva con la coordenada b_{10}^* ($F = 6.87$; $P = 0.020$) indicando que este tipo de compuestos contribuyen, además de al color general (correlación con la IC), al color amarillo de los vinos.

En cuanto a la coordenada a_{10}^* está principalmente correlacionada con los antocianos copigmentados, los SPP, los LPP y con las familias de antocianos monoméricos acilados, MV-F y piranoantocianos, lo que sugiere una contribución importante de este tipo de compuestos al color rojo de este conjunto de vinos. El hecho de que los piranoantocianos además de mostrar correlación con la IC muestren correlación con la coordenada a_{10}^* pone de manifiesto la contribución de este tipo de compuestos a la estabilidad del color rojo-naranja de los vinos tintos [38].

Finalmente, se llevó a cabo un análisis clúster jerárquico con las tres primeras dimensiones del PCA. En la Figura III-5 se muestra el diagrama de árbol con los tres clústers de vinos obtenidos. Para cada clúster, el vino más cercano al centro de gravedad se identificó como el ejemplo más típico de la agrupación y por lo tanto, con sus características de color. Estas muestras son MC_R09 (clúster 1), CD_C10 (clúster 2) y CT_B07 (clúster 3).

En la Tabla III-4 se muestra la composición global (media de todos los vinos) y la media para cada clúster. El clúster 1 formado por cinco vinos (MC_R09, AR_A08, BE_R10, NJ_R09 y SC_R10), todos ellos con IPT inferior a la media, están caracterizados por una alta concentración de anhídrido sulfuroso libre y alta concentración de antocianos copigmentados y por una baja concentración de SPP. De acuerdo a nuestra hipótesis de partida los vinos de este clúster se espera que presenten una mayor tendencia a la oxidación durante el envejecimiento, ya que son los vinos con menor IPT. Esta hipótesis se apoya en resultados que muestran que los vinos con mayor cantidad de polifenoles (mayor IPT) son los más resistentes a la oxidación del color y los más adecuados para el envejecimiento [34].

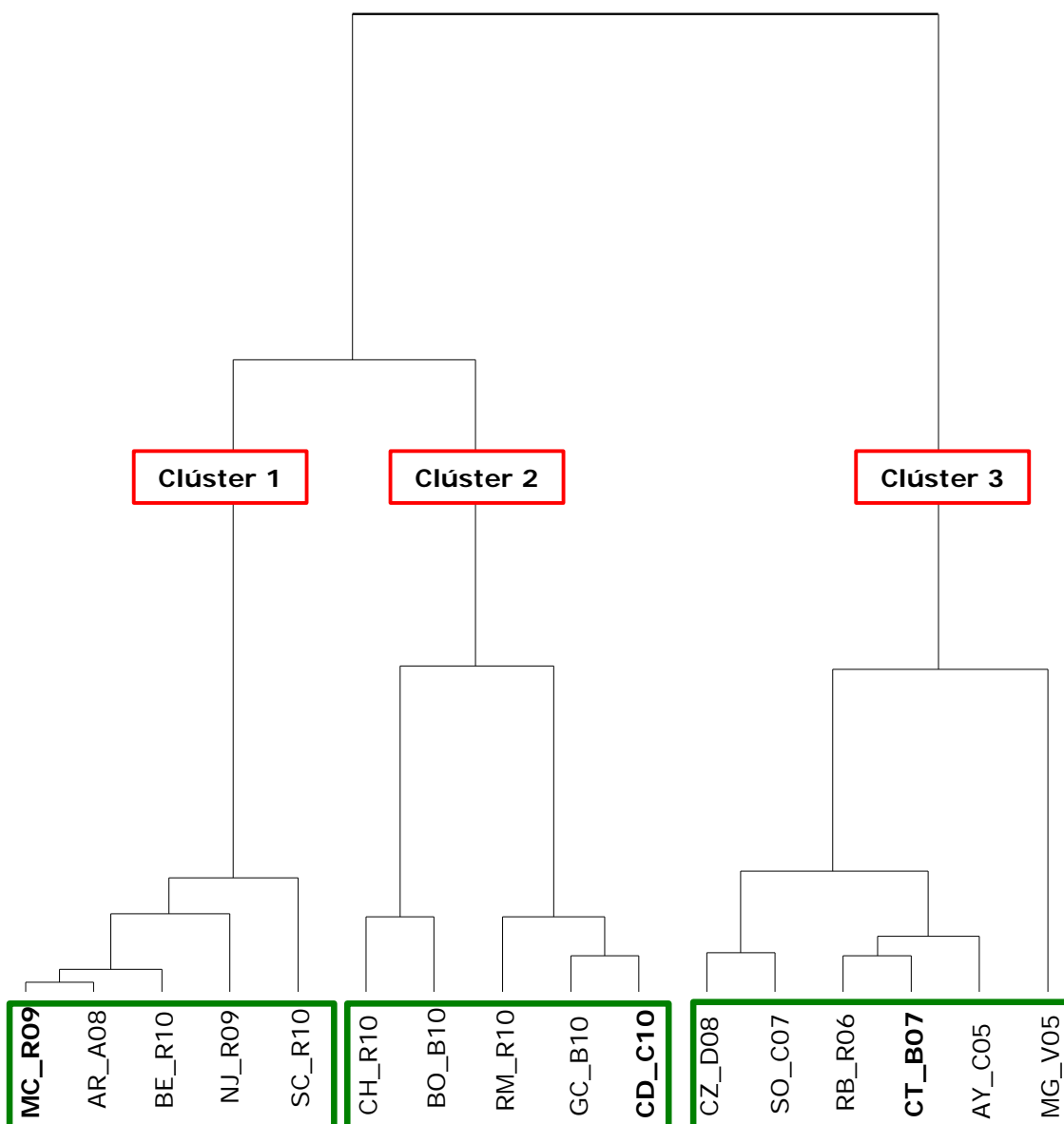


Figura III-5. Diagrama de árbol y clústers obtenidos a partir del análisis clúster (HCA). Los centroides de cada clúster están marcados en negrita.

El clúster 2, formado por 5 vinos, contiene las muestras de la añada más joven: 2010 (CH_R10, BO_B10, RM_R10; GC_B10, **CD_C10**) y presentan IPTs superiores a la media. Estos vinos están caracterizados por una alta concentración de MV-F, piranoantocianos, LPP, un alto valor de la coordenada a_{10}^* , una alta IC y por una baja T. Así, los vinos de este clúster son los que presentan mayores tonos rojos y menores tonos amarillos, lo que sugiere que son los vinos con un menor estado de oxidación inicial. Resulta extraño que los vinos jóvenes de este clúster sean los que mayor cantidad de LPP presenten. Sin embargo, se debe tener en cuenta que son los vinos con mayor IC, por lo que aunque en valor absoluto la cantidad de LPP es mayor, también contienen mayor cantidad de antocianos de bajo peso molecular. Así, el % que

representan los LPP frente al total de compuestos que contribuyen al color en los vinos jóvenes es menor que en otros vinos más envejecidos (Ej. CD_C10 con una cantidad de LPP de 0.49 estos representan un 33% de total de compuestos que contribuyen al color mientras que en el vino RB_R06 con una cantidad de 0.40 los LPP representan más de un 53% del total de compuestos que contribuyen al color).

Finalmente, el clúster 3, formado por seis vinos (CZ_D08, SO_C07, RB_R06, **CT_C07**, AY_C05 y MG_V05) pertenecientes a las añadas más viejas, presentan valores de IPTs superiores a la media y están caracterizados por un alto valor de T y de la coordenada b_{10}^* y por una baja concentración de MV-F, antocianos acilados, antocianos glicosilados y de antocianos copigmentados. Así, los vinos de este clúster parecen ser vinos con una oxidación importante debido a sus elevados valores de T y de la coordenada b_{10}^* , ambos parámetros relacionados con la oxidación [39-41].

Tabla III-4. Composición media global de los 16 vinos iniciales, así como de los clúster obtenido del HCA de los que posteriormente se estudiará su evolución. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre los clúster ($P < 0.05$)

| clúster | IPTs | pH | SO ₂ L (mg L ⁻¹) | SO ₂ C (mg L ⁻¹) | IC (UA) | T | a ₁₀ * | b ₁₀ * | SPP (UA) | LPP (UA) | copigmentados (UA) | glicosilados (mg L ⁻¹) | acilados (mg L ⁻¹) | pirano. (mg L ⁻¹) | MV-F (mg L ⁻¹) |
|---------|--------|------|---|---|---------|--------|-------------------|-------------------|----------|----------|--------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| global | 60.43 | 3.61 | 14.81 | 31.6 | 11.41 | 0.77 | 42.72 | 13.24 | 0.47 | 0.36 | 1.66 | 57.45 | 12.74 | 4.14 | 0.32 |
| 1 | 51.64b | 3.67 | 21.9a | 42.2 | 8.89b | 0.76ab | 39.08b | 8.82b | 0.27b | 0.29b | 2.48a | 75.24a | 15.51a | 3.10b | 0.29a |
| 2 | 65.12a | 3.63 | 13.9b | 48.0 | 14.68a | 0.69b | 49.78a | 11.50ab | 0.57a | 0.44a | 2.22a | 78.59a | 18.05a | 5.63a | 0.53a |
| 3 | 63.84a | 3.55 | 9.7b | 48.7 | 10.79ab | 0.84a | 39.87b | 18.37a | 0.56a | 0.34ab | 0.51b | 25.03b | 6.01b | 3.77b | 0.16b |

Color verde indica los parámetros que caracterizan el clúster positivamente.

Color rojo indica los parámetros que caracterizan el clúster negativamente.

3.3. Evolución de los parámetros de color y composición antociánica tras el envejecimiento en botella.

3.3.1. Evolución global.

El efecto del envejecimiento se evaluó mediante la comparación de los parámetros de color de los 16 vinos en el momento inicial del estudio y con los mismos vinos tras el envejecimiento durante 6 meses a 25 °C y sometidos a 5 dosis de oxígeno distintas. Estos resultados se muestran en la Tabla III-5.

A grandes rasgos y tomando todas las muestras en conjunto (global: Tabla III-5) se observa un descenso en la concentración de anhídrido sulfuroso tanto libre (-14.8 mg L⁻¹) como combinado (-20.1 mg L⁻¹) y un aumento de los tonos amarillos en los vinos durante el envejecimiento medido por el aumento de la T (+0.13) y por el aumento de la coordenada b₁₀^{*} (+10.27). Estos hechos han sido ampliamente descritos en la bibliografía [20, 23, 39-41]. La variación de la T producida durante el envejecimiento presenta una correlación positiva con la añada (F= 21,19; P = 0.010), indicando que el menor aumento se produce en los vinos más viejos. Estos resultados están de acuerdo con el hecho de que la materia colorante de los vinos envejecidos es más estable frente a los cambios producidos por el tiempo, temperatura u oxígeno disponible durante el envejecimiento [42].

Por otro lado, globalmente ni el pH ni la IC se han visto afectados durante el envejecimiento, aunque la ausencia de diferencias en el caso de la IC (no para el caso del pH), es debido a que en algunos vinos durante el envejecimiento se produce un aumento y en otros un descenso. En la bibliografía, se encuentran resultados dispares al respecto, por ejemplo Wirth y col. [20, 23] y Etaio y col. [43] concluyeron que se producía un aumento de la IC atribuido principalmente a la pérdida de anhídrido sulfuroso y a la formación de pigmentos más estables y no decolorables por dicho óxido. Sin embargo, García-Falcón y col. [44] concluyeron que la IC se mantenía estable durante el primer año de envejecimiento para disminuir en el segundo y Gambuti y col. [22] concluyeron que el efecto sobre la IC no estaba muy claro y que era bastante limitado, atribuyéndolo a que a la par que se produce la degradación de determinados pigmentos se produce la formación de otros compensándolo.

En cuanto a la composición antociánica, parece ser que la concentración de LPP aumenta durante el envejecimiento. Este hecho era esperable, ya que la formación de este tipo de compuestos es lenta y continua a lo largo del envejecimiento. En cambio, los

Tabla III -5. Diferencias entre los parámetros de color y composición antocianica media de los vinos antes y después del envejecimiento. Datos en negrita muestran diferencias significativas tras el envejecimiento ($P < 0.05$)

| clúster | IPTs | pH | SO ₂ L (mg L ⁻¹) | SO ₂ C (mg L ⁻¹) | IC (UA) | T | a ₁₀ * | b ₁₀ * | SPP (UA) | LPP (UA) | copigmentados (UA) | glicosilados (mg L ⁻¹) | acilados (mg L ⁻¹) | pirano. (mg L ⁻¹) | MV-F (mg L ⁻¹) |
|---------------|--------------|-------|--|--|-------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------|-------------|-----------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| global | -1.2 | -0.03 | -14.8 | -20.1 | 0.37 | 0.13 | -2.57 | 10.27 | 0.05 | 0.18 | -0.08 | -46.51 | -10.53 | -1.03 | -0.16 |
| 1 | -1.74 | -0.04 | -21.9 | 36.4 | 0.77 | 0.15 | -3.11 | 11.98 | 0.14 | 0.17 | -1.52 | -61.70 | -13.40 | -0.32 | -0.14 |
| 2 | -2.61 | -0.04 | -13.9 | -29.8 | -0.30 | 0.13 | 0.72 | 10.48 | 0.00 | 0.18 | 0.22 | -64.60 | -14.68 | -1.41 | -0.32 |
| 3 | 0.53 | -0.03 | -9.7 | -37.0 | -0.27 | 0.09 | -0.84 | 8.61 | 0.01 | 0.19 | 1.29 | -18.88 | -4.36 | -1.24 | -0.05 |

antocianos de pesos moleculares intermedios como los copigmentados y los SPP no muestran diferencias tras el periodo de maduración en botella. Este hecho puede explicarse debido a una formación y desaparición (debido a su implicación en la formación de compuestos más polimerizados) continúa desde la fermentación y a lo largo de todo el periodo de envejecimiento [9].

Finalmente, se puede observar un descenso significativo de todas las familias de antocianos de menor peso molecular durante el envejecimiento. Dicho descenso es mucho más acusado para los antocianos glicosilados y acilados que para los piranoantocianos y los aductos antociano-flavanol, cuyo cambio de concentración es mínimo. La disminución de los antocianos de bajo peso molecular a lo largo del periodo de envejecimiento ha sido ampliamente descrita en la bibliografía [7, 20, 22, 23, 44-47]. Todos estos autores coinciden en observar una gran disminución de los antocianos glicosilados y acilados, a diferencia de lo que se observa para los piranoantocianos y MV-F que aumentan lentamente especialmente durante las primeras etapas de maduración en botella de vinos muy jóvenes [23, 44, 45]

A pesar del comportamiento global descrito, existen tendencias diferentes en función de las propiedades iniciales de los vinos, por lo que a continuación se estudiará la evolución por separado de cada clúster.

3.2.2. Evolución del clúster 1.

La evolución de los 5 vinos pertenecientes al clúster 1 (**MC_R09**, AR_A08, RN_R09, BE_R10, SC_R10) se observa en las Figuras III-6 y III-7. Igualmente, los incrementos o disminuciones de los parámetros de color y de la composición antocianica para el clúster se muestran en la Tabla III-5.

Las muestras de este clúster, caracterizadas por una alta concentración de anhídrido sulfuroso libre, antocianos copigmentados, por una baja concentración de SPP y todas ellas con un IPT inferior a la media (Tabla III-4), sufren sustanciales cambios durante el envejecimiento, encontrándose también diferencias entre las muestras embotelladas inicialmente con distintas dosis de oxígeno. No obstante, en todos los casos el tiempo de envejecimiento ha provocado mayores diferencias que las distintas dosis de oxígeno, de acuerdo con la magnitud del desplazamiento de las muestras sobre el plano bidimensional del PCA (Figura III-6),. Según la ley de Kaiser se consideraron las 3 primeras componentes que explican aproximadamente el 80% de la varianza original. La primera componente, que explica aproximadamente el 48 % de la varianza original, está principalmente caracterizada por la concentración de antocianos glicosilados y

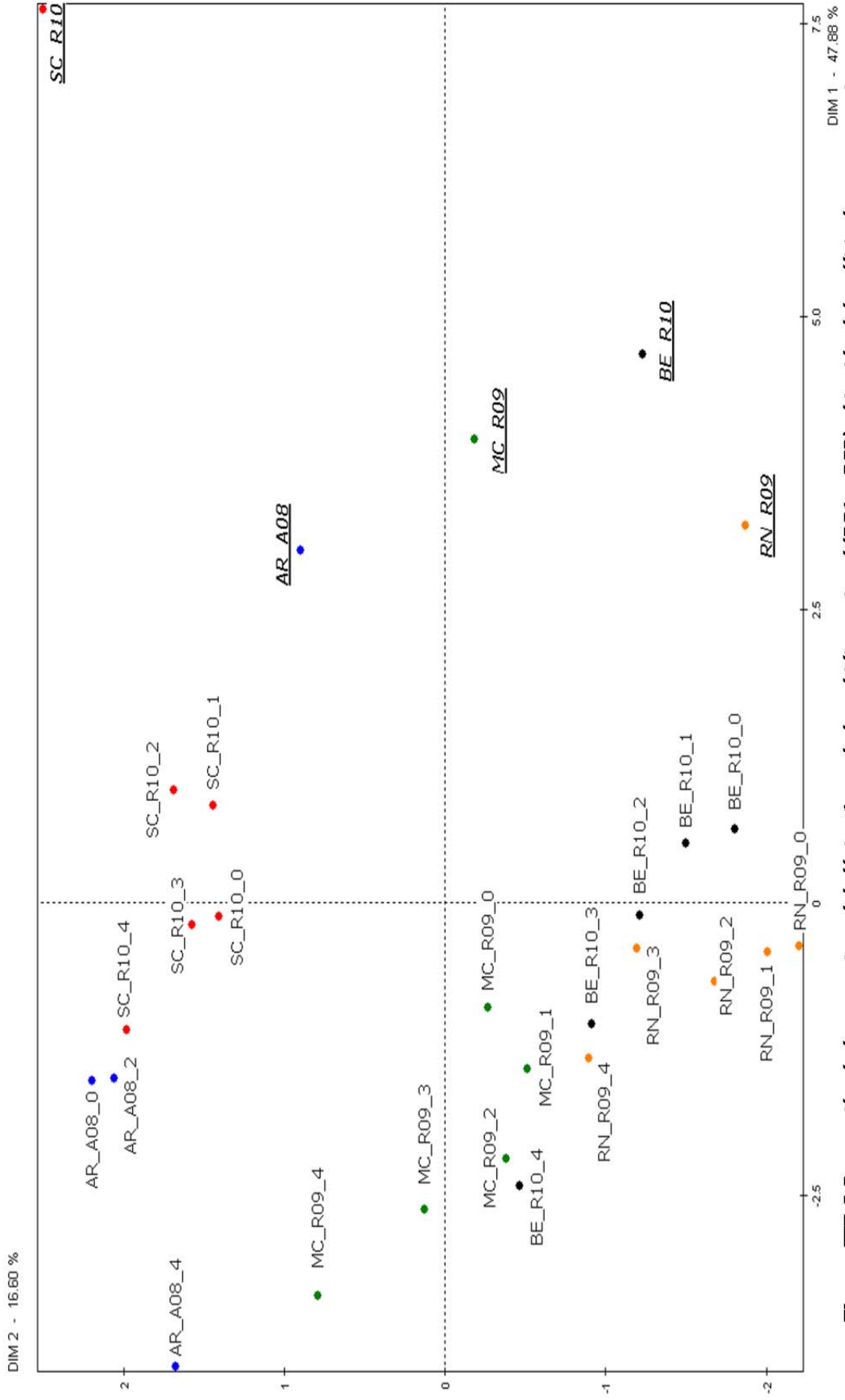


Figura III-6 Proyección de las muestras del clúster 1 en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del análisis de componentes principales (PCA). *MC_R09*, *BE_R10*, *SC_R10*, *RN_R09*, *AR_A08* vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno. (Ej. *MC_R09_0*: 0 mg L⁻¹ día⁻¹, *MC_R09_1*: 1,1 mg L⁻¹ día⁻¹, *MC_R09_2*: 3,1 mg L⁻¹ día⁻¹, *MC_R09_3*: 10,6 mg L⁻¹ día⁻¹, *MC_R09_4*: 30,4 mg L⁻¹ día⁻¹)

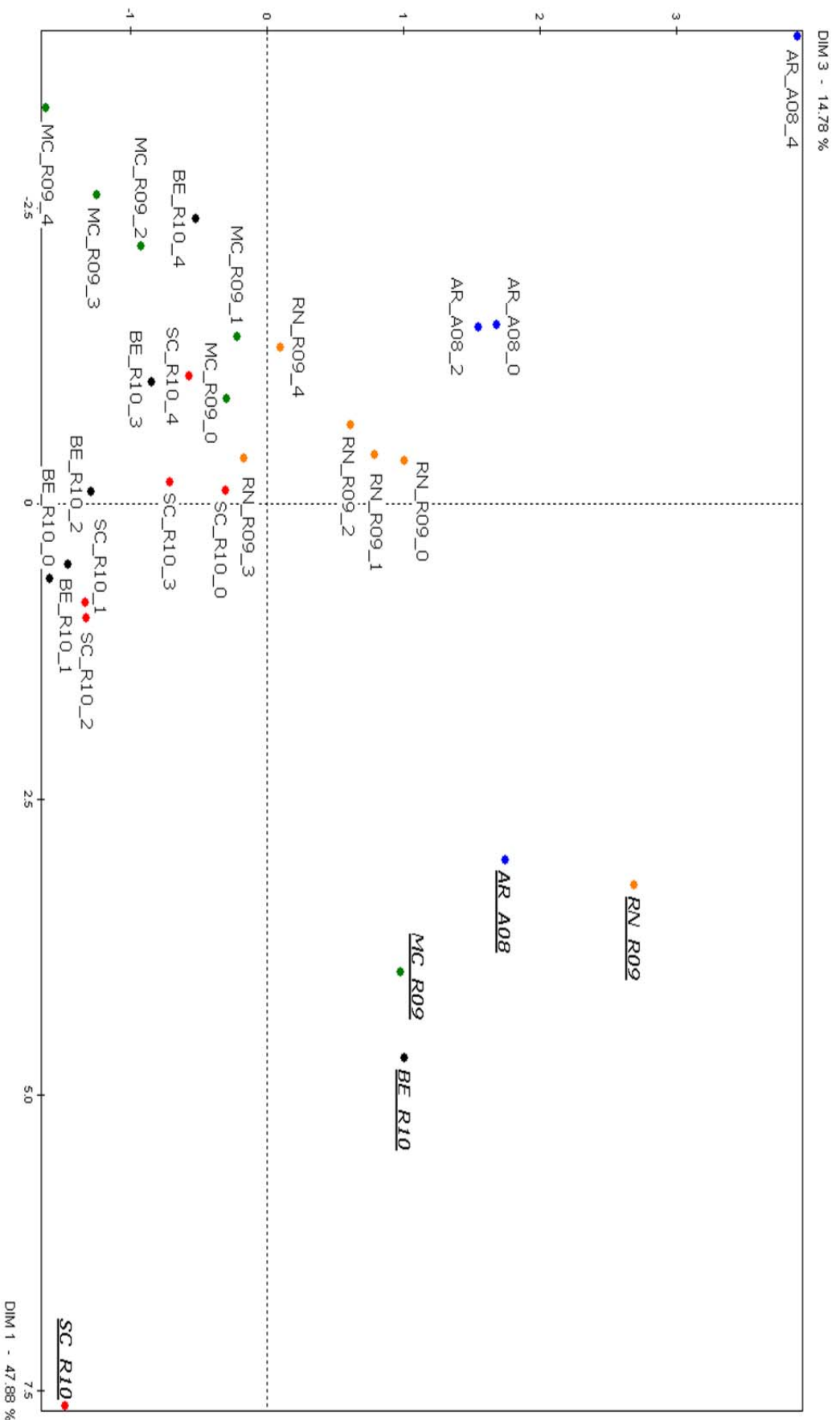


Figura III-7 Proyección de las muestras del clúster 1 en el plano bidimensional (PC1 y PC3) obtenido del análisis de componentes principales (PCA). MC_R09, BE_R10, SC_R10, RN_R09, AR_A08 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno. (Ej. MC_R09_0: 0 mg L⁻¹ día⁻¹, MC_R09_1: 1,1 mg L⁻¹ día⁻¹, MC_R09_2: 3,1 mg L⁻¹ día⁻¹, MC_R09_3: 10,6 mg L⁻¹ día⁻¹, MC_R09_4: 30,4 mg L⁻¹ día⁻¹)

acilados (97 y 96% respectivamente) de manera positiva y por la T y la coordenadas b_{10}^* (93 y 93% respectivamente) de manera negativa. Como se puede observar en la Figura III-6, todos los vinos tras los 6 meses de envejecimiento sufren un desplazamiento hacia la izquierda respecto al vino original (MC_R09, AR_A08, RN_R09, BE_R10, SC_R10), mostrando en todos los casos una disminución en la primera dimensión del PCA. Esto se traduce en que tras el periodo de envejecimiento en botella, las muestras aumentan en tonalidad (0.15 puntos más) y coordenada b_{10}^* (11.98), mientras que sufren un descenso en la concentración de antocianos glicosilados (-46.51 mg L⁻¹ de media) y de antocianos acilados (-10.53 mg L⁻¹ de media). Por otra parte, las distintas dosis de oxígeno (dosis 0 a dosis 4) han provocado también un desplazamiento hacia la izquierda aunque en menor medida (la dosis 4 se encuentra siempre más a la izquierda del plano que las menores dosis de O₂ y en especial más a la izquierda que la dosis 0). Esto demuestra que mayores concentraciones de oxígeno dispensadas en la etapa de embotellado favorecen la formación de tonos amarillos y provoca una mayor pérdida de antocianos glicosilados y acilados, aunque en menor medida que las transformaciones sufridas exclusivamente por el tiempo de envejecimiento.

La componente 2 explica aproximadamente el 17% de la varianza original y está principalmente caracterizada por el pH (76%), la IC (76%) y por la concentración de antocianos copigmentados (56%) de manera positiva. El comportamiento en esta dimensión no es tan claro como en el caso de la 1, ya que en este caso cuatro de los cinco vinos de este clúster sufren un desplazamiento positivo (hacia arriba) y otro de los vinos negativo (SC_R10 y SC_R10_4). A la vista de los resultados de la Tabla III-5 y la caracterización de la dimensión el desplazamiento se debe principalmente al cambio en la IC, con un aumento de la IC en la mayoría de los vinos (salvo SC_R10). Este aumento de color debido a la presencia de oxígeno durante el embotellado ya había sido apuntado por otros autores [20, 23, 43]. Dicho cambio en la IC parece ser debida en parte a un descenso de la concentración de anhídrido sulfuroso libre y a un aumento de pigmentos antociánicos más estables (SPP y LPP) en detrimento de los antocianos decolorables por el anhídrido sulfuroso: acilados y glicosilados. También cabe destacar que los mayores cambios (mayores desplazamientos) se producen en los vinos con menores IPT (BE_R10, RN_R09). Estos resultados parecen apoyar los obtenidos por Gambuti y col. [22] que concluyeron que la IC sufría mayores cambios en los vinos con menor concentración de compuestos polifenólicos (IPTs).

Finalmente, la componente 3 que explica aproximadamente un 16% de la varianza original esta principalmente caracterizada por la concentración de piranoantocianos

(62%) y por la coordenada a_{10}^* (57%) de manera negativa. De manera semejante a lo que ocurre en la componente dos la mayoría de los vinos tienen el mismo comportamiento, (desplazamiento negativo en la componente), salvo los vinos AR_A08 y SC_R10 (Figura III-7). Este desplazamiento se traduce en una disminución en la concentración de piranoantocianos y en la coordenada a_{10}^* . Sin embargo, el oxígeno ha provocado comportamientos distintos mostrando en algunos casos un desplazamiento negativo (hacia abajo) frente a la muestra envejecida sin oxígeno (MC_R09_0 y MC_R09_4, SC_R10_0 y SC_R10_4, RN_R09_0 y RN_R09_4) y otras donde el desplazamiento es positivo (BE_R10_0 y BE_R10_4, AR_A08_0 y AR_A08_4). Esta diferencia indica una evolución distinta debida a la presencia de diferentes dosis de oxígeno dispensados en la etapa de embotellados durante el envejecimiento en la concentración de piranoantocianos según el tipo de vino.

En conclusión, los vinos de este clúster durante el envejecimiento sufren un aumento de los tonos amarillos (medido por la T y coordenada b_{10}^*), un aumento en la concentración de LPP y SPP, un ligero aumento en la IC, una pérdida de tonos rojos (medido por la coordenada a_{10}^*) y una gran pérdida de antocianos de bajo peso molecular (en especial glicosilados y acilados) durante el envejecimiento. Mientras que los piranoantocianos y los MV-F resultan ser mucho más resistentes a la oxidación, tal y como apuntaban Monagas y col. [7]. El oxígeno ha provocado una acentuación de todos los procesos, sin embargo, en el caso de los piranoantocianos se han observado dos comportamientos diferentes, existiendo vinos que experimentan un aumento respecto al vino inicial con las dosis más bajas de oxígeno y vinos que presentan una pérdida con todas las dosis de oxígeno estudiadas. Estos resultados apoyan a los obtenidos por Wirth y col. [2], que concluyeron que la formación de piranoantocianos es mayor con OTRs más bajas.

3.2.3. Evolución del clúster 2.

La evolución de los cinco vinos pertenecientes al clúster 2 (CH_R10, BO_B10, RM_R10, GC_B10, **CD_C10**) se observa en la Figura III-8 y III-9. Los incrementos o disminuciones en los parámetros de color y en la composición antocianica para el clúster se muestran en la Tabla III-5 mostrada anteriormente.

Las muestras de este clúster, caracterizadas por una alta concentración de MV-F, de piranoantocianos, de LPP, un alto valor de la coordenada a_{10}^* , una alta IC y por una baja T y todas ellas con un IPT superior a la media, al igual que el clúster 1 sufren

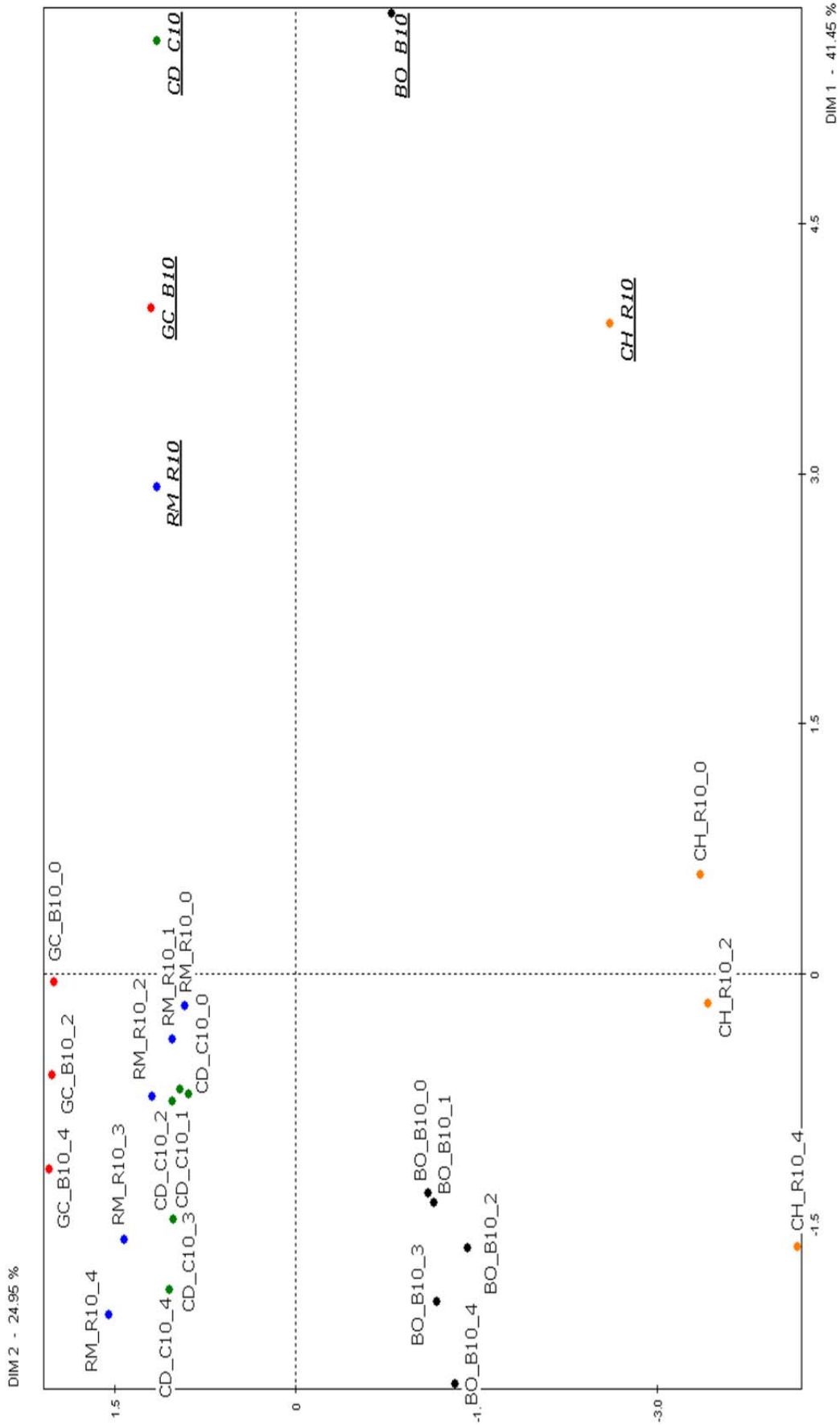
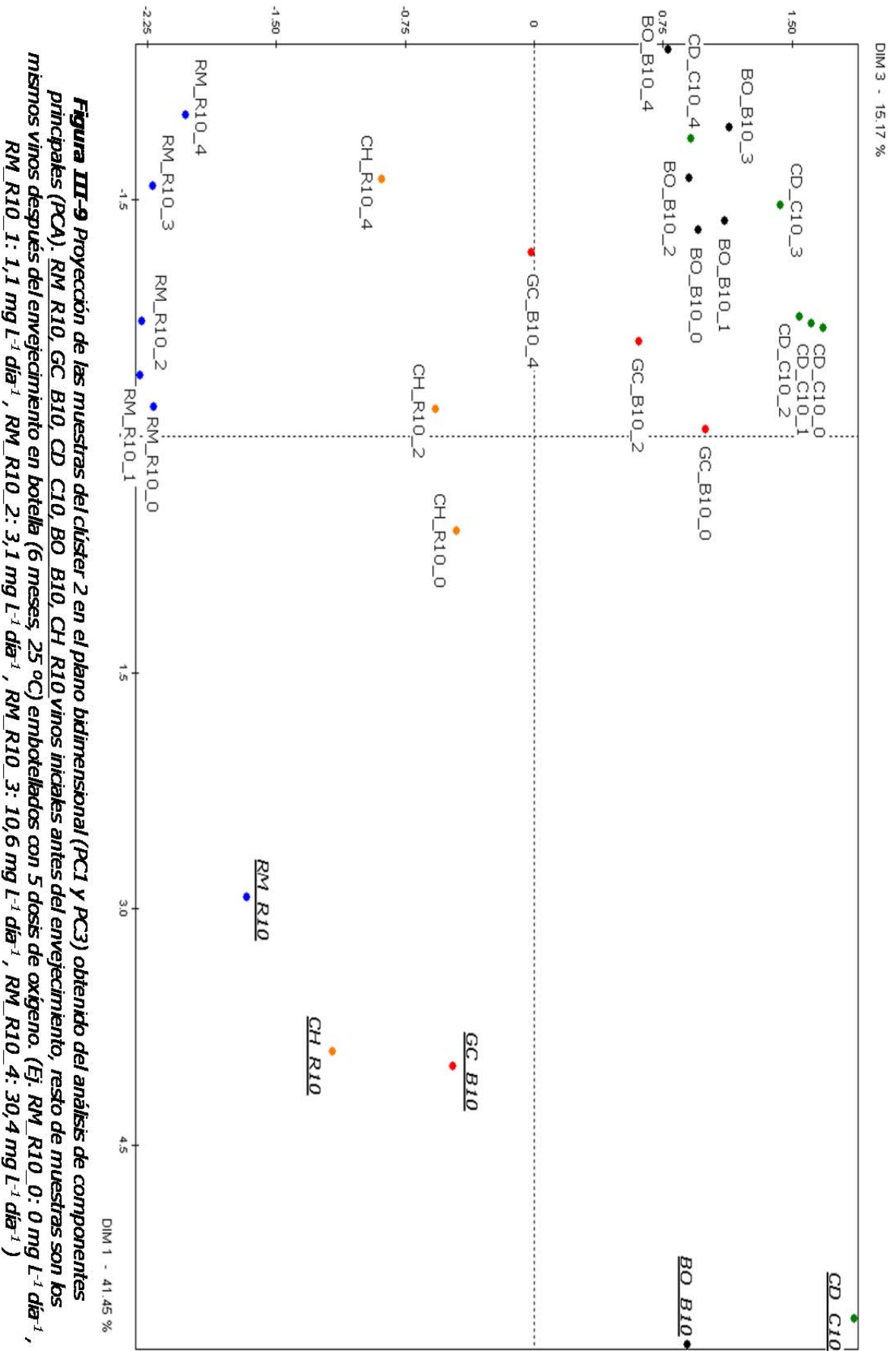


Figura III-8 Proyección de las muestras del clúster 2 en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del análisis de componentes principales (PCA). RM_R10, GC_B10, BO_B10, CH_R10 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno. (Ej. RM_R10_0: 0 mg L⁻¹ día⁻¹, RM_R10_1: 1,1 mg L⁻¹ día⁻¹, RM_R10_2: 3,1 mg L⁻¹ día⁻¹, RM_R10_3: 10,6 mg L⁻¹ día⁻¹, RM_R10_4: 30,4 mg L⁻¹ día⁻¹)



sustanciales cambios durante el envejecimiento. Tras el PCA y según la ley de Kaiser se consideraron las 3 primeras componentes principales que explican aproximadamente el 82% de la varianza original. La primera componente que explica aproximadamente el 42% de la varianza original esta principalmente caracterizada por la concentración de antocianos glicosilados, acilados y MV-F (96, 93, y 93% respectivamente) de manera positiva y por las coordenadas b_{10}^* y la T (86 y 62% respectivamente) de manera negativa. Como se puede observar en la Figura III-8, todos los vinos tras los 6 meses de envejecimiento sufren un desplazamiento hacia la izquierda respecto al vino original, indicando que las muestras tras el periodo de envejecimiento tienen mayor tonalidad (+0.13), mayor coordenada b_{10}^* (+10.48) y por el contrario la concentración de antocianos glicosilados (-61.70 mg L⁻¹ de media), acilados (-13.40 mg L⁻¹ de media) y MV_F (-0.14 mg L⁻¹ de media) disminuye. Al observar el efecto del oxígeno se puede concluir que causa el mismo efecto aunque en menor medida, ya que en todos los casos las dosis más altas de oxígeno (dosis 4) se desplazan a la izquierda respecto a las dosis más bajas (dosis 0). Esto muestra de nuevo cómo el oxígeno favorece la formación de tonos amarillos y provoca una mayor pérdida de antocianos de bajo peso molecular (especialmente de antocianos glicosilados y acilados).

Por otro lado, la componente 2 explica aproximadamente el 25% de la varianza original y esta principalmente correlacionada con la coordenada a_{10}^* (88%) y la IC (74%) de manera positiva y por el pH (89%) y la T (-71%) de manera negativa. En este caso el desplazamiento es bastante limitado (Figura III-8) y sólo observable con las dosis más altas de oxígeno (dosis 4), por lo que para esta PC2 los mayores cambios parecen deberse principalmente al efecto del oxígeno. Además, existen dos tipos de comportamientos, un desplazamiento negativo y hacia menores valores de PC2, (CH_R10 y BO_B10) que implica un descenso en los tonos rojos (coordenada a_{10}^*) y un descenso en la IC (ya que la T aumenta en todos) que se produce en los vinos con menores IPTs del clúster (CD_C10, BO_B10 y CH_R10) y que no han tenido una semi-crianza en barrica. Contrariamente, los vinos GC_B10 y RM_R10, con mayores IPTs y con una semi-crianza en barrica, sufren un aumento de la coordenada a_{10}^* con las dosis más altas de oxígeno. Estos resultados son consistentes con los observados para el clúster 1 y parecen apoyar de nuevo los obtenidos por Gambuti y col. [22], que concluyeron que la IC se veía más afectada en los vinos con menor IPT.

Finalmente, la componente 3, que explica aproximadamente el 16% de la varianza original, está principalmente caracterizada por la concentración de SPP (93%) de manera positiva y por la concentración de piranoantocianos (73%) y la IC (54%) de

manera negativa. En este caso no todos los vinos muestran el mismo tipo de desplazamiento durante el envejecimiento, sin embargo la presencia de mayores dosis de O₂ (dosis 4-dosis 0) sí que ha provocado el mismo efecto en todos los casos, ya que se observa un desplazamiento hacia abajo en esta componente (Figura III-9), excepto para el vino RM_R10 que presenta un ligero desplazamiento hacia arriba en esta PC3. A la vista de los resultados de la Tabla III-5 parece que la variación en la concentración de piranoantocianos es la variable principal responsable de este desplazamiento. Esto significa que el oxígeno ha provocado en estos vinos una disminución en la concentración de piranoantocianos, los cuales habían sufrido distinta evolución durante el envejecimiento en función del tipo de vino.

En conclusión, los vinos de este clúster sufren un aumento de los tonos amarillos, (medido por la T y coordenada b₁₀*), un aumento en la concentración de LPP y una gran pérdida de antocianos de bajo peso molecular (antocianos glicosilados y acilados especialmente) durante el envejecimiento. Además, se han observado comportamientos diferentes en cuanto a la evolución de la IC y la coordenada a₁₀* según la concentración inicial de polifenoles (medido por IPTs) de los vinos. Igualmente, parece que mayores concentraciones de oxígeno generan una disminución en la concentración de piranoantocianos, sin embargo la etapa de envejecimiento (6 meses 25 °C) genera diferentes efectos sobre estos compuestos, siendo éstos independientes de la concentración de polifenoles totales iniciales.

3.2.4. Evolución del clúster 3.

La evolución de los seis vinos pertenecientes al clúster 3 (CZ_D08, SO_C07, RB_R06, CT_B07, AY_C05, MG_V05) se observa en la Figura III-10 y III-11. Los incrementos o disminuciones en los parámetros de color y en la composición antocianica para el clúster se muestran en la Tabla III-5 mostrada anteriormente.

Las muestras de este clúster pertenecientes a las añadas más viejas y con un IPT superior a la media, están caracterizadas por un alto valor de T y de la coordenada b₁₀* y por una baja concentración de MV-F, de antocianos acilados, de antocianos glicosilados y de antocianos copigmentados e igualmente sufren sustanciales cambios durante el envejecimiento. Tras el PCA y según la ley de Kaiser se consideraron las 3 primeras componentes principales, que explican aproximadamente el 82% de la varianza original. La primera componente explica aproximadamente el 37% de la varianza original y está principalmente caracterizada por la concentración de antocianos acilados, MV-F y piranoantocianos (80, 71 y 79% respectivamente) de manera positiva

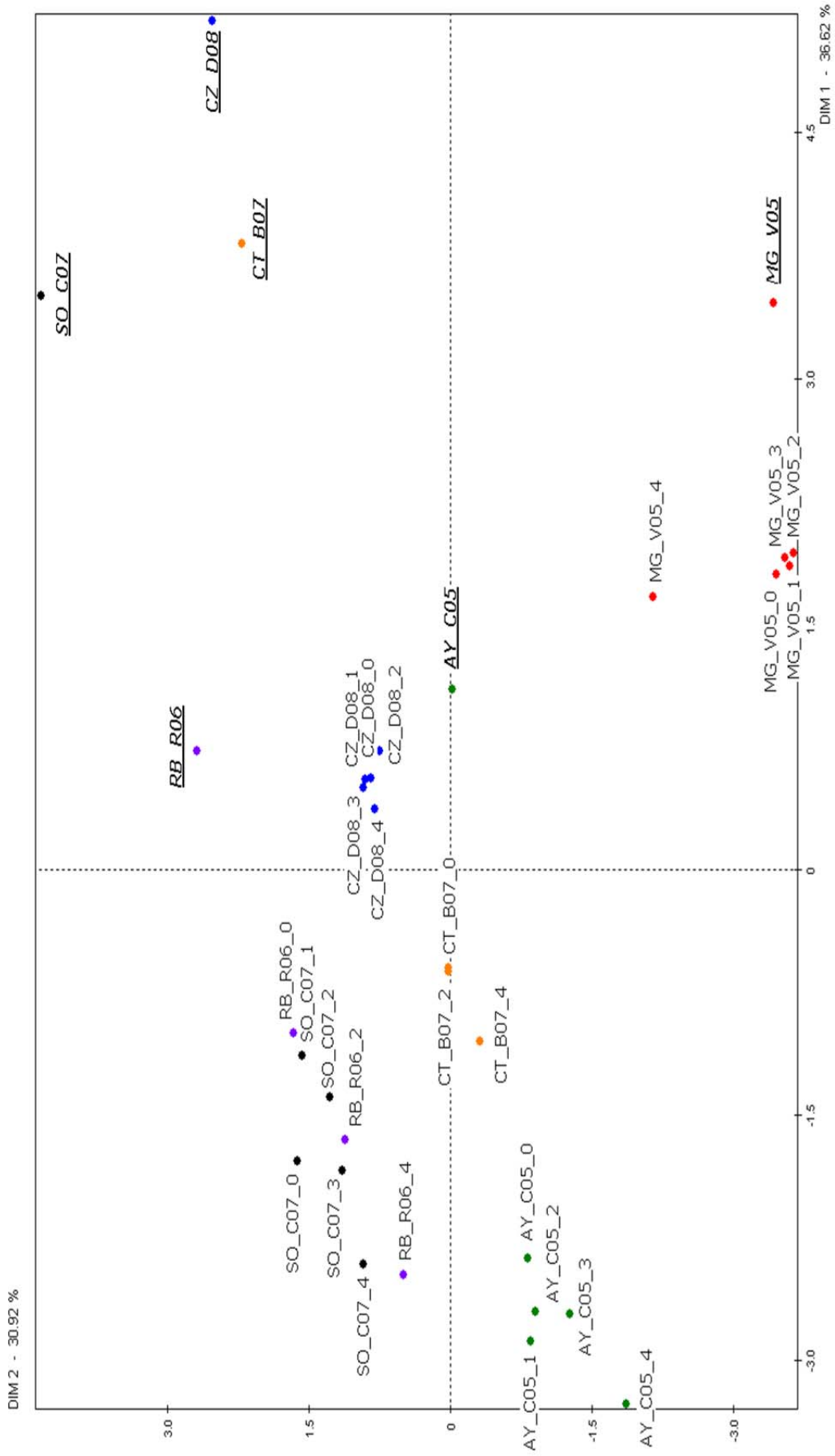


Figura III-10 Proyección de las muestras del clúster 3 en el plano bidimensional (PC1 y PC2) obtenido del análisis de componentes principales (PCA). RB_R06, SO_C07, CZ_D08, AY_C05, MG_V05, CT_B07 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno. (Ej. SO_C07_0: 0 mg L⁻¹ día⁻¹, SO_C07_1: 1,1 mg L⁻¹ día⁻¹, SO_C07_2: 3,1 mg L⁻¹ día⁻¹, SO_C07_3: 10,6 mg L⁻¹ día⁻¹, SO_C07_4: 30,4 mg L⁻¹ día⁻¹)

Evolución del color y la composición antocianica de vinos tintos durante el periodo de envejecimiento en botella.
Efecto de distintas concentraciones de oxígeno.

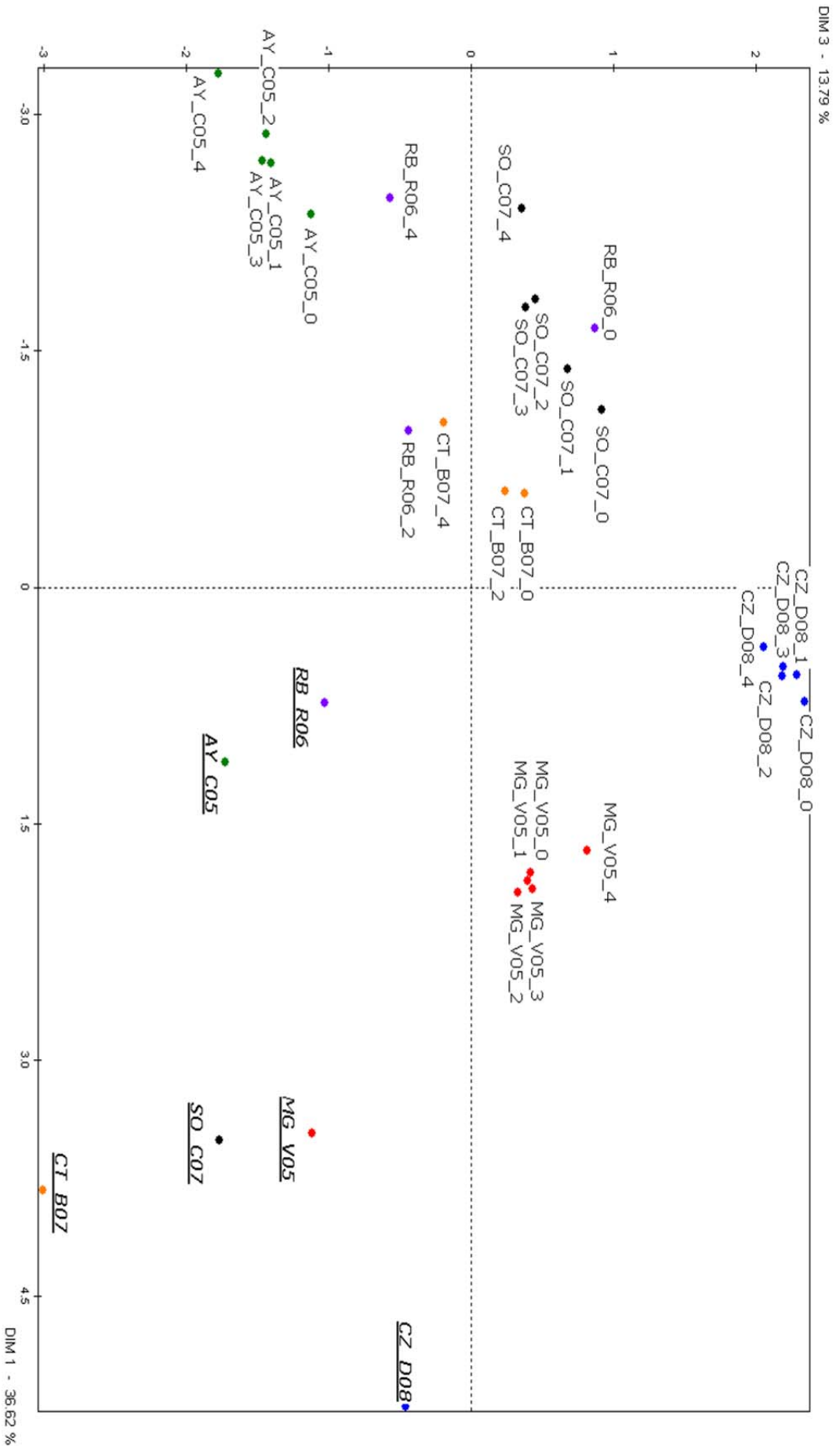


Figura III-11 Proyección de las muestras del cluster 3 en el plano bidimensional (PC1 y PC3) obtenido del análisis de componentes principales (PCA). RB, R06, SO, C07, CZ, D08, AY, C05, MG, V05, CT, B07 vinos iniciales antes del envejecimiento, resto de muestras son los mismos vinos después del envejecimiento en botella (6 meses, 25 °C) embotellados con 5 dosis de oxígeno. (Ej. SO_C07_0: 0 mg L⁻¹ día⁻¹, SO_C07_1: 1,1 mg L⁻¹ día⁻¹, SO_C07_2: 3,1 mg L⁻¹ día⁻¹, SO_C07_3: 10,6 mg L⁻¹ día⁻¹, SO_C07_4: 30,4 mg L⁻¹ día⁻¹)

y por la T (89%) de manera negativa. El desplazamiento en esta componente es común para todos los vinos, observándose un desplazamiento a la izquierda en todos los casos. Este desplazamiento indica un aumento de la T y una disminución en la concentración de los antocianos acilados, piranoantocianos y MV-F. En cuanto al efecto de la presencia de diferentes concentraciones de oxígeno, sólo en los vinos con menores IPTs (RB_R06 y CT_B07) parece observarse un efecto claro, observándose de nuevo un incremento de la T y una mayor pérdida de antocianos con dosis de oxígeno creciente. El efecto en los demás vinos es bastante limitado ya que las muestras aparecen proyectadas muy juntas entre sí, indicando pocas diferencias entre ellas. Estos resultados ponen de manifiesto de nuevo que los vinos más envejecidos tienen una materia colorante más estable [42] y que los vinos con menor IPT son los más susceptibles a experimentar cambios [22].

La componente 2, que explica aproximadamente el 31% de la varianza original, está principalmente caracterizada por la concentración de antocianos glicosilados (75%) positivamente y por la IC, la concentración de SPP y las coordenadas a_{10}^* y b_{10}^* (88, 83, 79, 74% respectivamente) de manera negativa. El desplazamiento observado en esta dimensión es común para todos los vinos, produciéndose un desplazamiento negativo (hacia abajo), siendo éste mayor en los vinos con menor IPT (RB_R06 y CT_B07).

A la vista de los resultados de la Tabla III-5 el principal responsable de este desplazamiento parece ser la pérdida de antocianos glicosilados. De nuevo el oxígeno parece acusar los efectos producidos durante el envejecimiento sobre todo en los vinos con menor concentración polifenólica (menores IPTs).

Merece especial atención el vino MG_V05, donde las menores dosis de oxígeno (dosis 0-dosis3) han provocado una pequeña disminución de la IC (a diferencia de los demás vinos del clúster), así como un incremento de los tonos amarillos y tonos rojos (Tabla III-6). Sin embargo, la dosis más alta de oxígeno (dosis 4: 30.4 mg L⁻¹) ha provocado un fuerte descenso en la IC y lo que es más importante, ha reducido el color amarillo medido por la T y la coordenada b_{10}^* . Este hecho, puede ser explicado por la precipitación de materia colorante, ya que la muestra sometida a la dosis más alta de oxígeno tras el envejecimiento mostró un precipitado en la botella. Los pigmentos poliméricos aumentan su tamaño durante el envejecimiento hasta un momento que resultan tan grandes que resultan insolubles y precipitan. A la vista de que los principales responsables del color de estos vinos son piranoantocianos, SPP y LPP, la pérdida de LPP

Tabla III-6. Parámetros de color y composición antocianica de la serie de vinos MG_V05. Letras diferentes muestran diferencias significativas ($P < 0,05$).

| Vino | IPtS | pH | SO ₂ L (mg L ⁻¹) | SO ₂ C (mg L ⁻¹) | IC (UA) | T | a ₁₀ * | b ₁₀ * | SPP (UA) | LPP (UA) | copigmenta. (UA) | glicosilados (mg L ⁻¹) | acilados (mg L ⁻¹) | pirano. (mg L ⁻¹) | MV-F (mg L ⁻¹) |
|----------|-------|-------|--|--|------------|-------|-------------------|-------------------|-------------|-------------|---------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| MG_V05 | 83.3a | 3.65a | 8.0a | 25.6a | 19.28a | 0.79b | 46.53c | 26.62c | 1.17a | 0.28c | 1.12b | 4.03a | 4.28a | 5.74a | 0.00b |
| MG_V05_0 | 80.6b | 3.62b | 6.4b | 23.4a | 16.49b | 0.81a | 48.32b | 33.23a | 0.75b | 0.57a | 1.76a | 1.26b | 3.80b | 3.92b | 0.25a |
| MG_V05_1 | 80.7b | 3.62b | 0.0c | 16.2b | 16.49b | 0.81a | 48.60b | 32.78a | 0.75b | 0.63a | 1.79a | 1.50b | 3.91b | 4.12b | 0.26a |
| MG_V05_2 | 81.5b | 3.63b | 0.0c | 16.2b | 16.64b | 0.83a | 48.2b | 33.21a | 0.80b | 0.59a | 1.67a | 1.21bc | 3.87b | 4.01b | 0.27a |
| MG_V05_3 | 80.6b | 3.62b | 0.0c | 16.2b | 16.19b | 0.82a | 48.62b | 33.62a | 0.80b | 0.65a | 1.64a | 1.01c | 3.72b | 3.98b | 0.25a |
| MG_V05_4 | 81.0b | 3.62b | 0.0c | 8.0c | 9.61c | 0.79b | 49.85a | 30.19b | 0.79b | 0.42b | 1.54a | 0.90c | 2.84c | 3.93b | 0.25a |

parece ser la responsable de la pérdida de IC y el descenso del % de color amarillo respecto a las dosis más bajas.

Finalmente, la componente 3 que explica aproximadamente el 14% de la varianza original esta principalmente caracterizada por la concentración de antocianos copigmentados (78%) de manera positiva y por la concentración de anhídrido sulfuroso libre (58%) de manera negativa. En este caso todos los vinos han sufrido un desplazamiento negativo en esta componente (Figura III-11), indicando que en estos vinos el proceso de envejecimiento ha provocado un aumento en la concentración de antocianos copigmentados. Este resultado es llamativo, ya que los antocianos copigmentados tienen mayor importancia en los vinos jóvenes [31] como los de los clúster 1 y 2 mientras que los vinos de este clúster, que pertenecen a las añadas más viejas, parecen sufrir un aumento en más del doble de la concentración de estas asociaciones. En cuanto al efecto oxígeno parece que la concentración de antocianos copigmentados se ve favorecida con las menores dosis de oxígeno, ya que el desplazamiento de las muestras sometidas a las menores dosis de oxígeno es más acusado. De nuevo, el desplazamiento producido por las distintas dosis de oxígeno es más claro en los vinos con menor IPT. Igualmente el vino MG_V05, debido a la precipitación de materia colorante, presenta una evolución diferente respecto a los vinos de este clúster.

En resumen, los vinos de este clúster durante el envejecimiento sufren un aumento de los tonos amarillos, (medido por la T y coordenada b_{10}^*), un aumento en la concentración de LPP y una pérdida de antocianos de bajo peso molecular (especialmente antocianos glicosilados y acilados que desaparecen prácticamente) lo que es común a todos los clústers. Además los vinos de este clúster, a pesar de pertenecer a las añadas más viejas, ven incrementada la concentración de antocianos copigmentados en contra de la hipótesis de partida. También es el único clúster donde la concentración de MV-F no se ha visto reducida durante el envejecimiento, sino que parece permanecer constante. Finalmente, los vinos de este clúster han sido los que menores variaciones en sus características de color, hecho que pone de manifiesto otra vez que los vinos más envejecidos tienen una materia colorante más estable [42].

Por otro lado, a la vista de los resultados obtenidos en este clúster y los anteriores parece que las menores dosis de oxígeno favorecen la formación de piranoantocianos, antocianos copigmentados y una mayor formación de LPP. En esta línea, Wirth y col. [20] concluyeron igualmente que existe una mayor formación de pigmentos poliméricos

y piranoantocianos con OTRs más bajas. Sin embargo, esta mayor formación de pigmentos en las dosis más bajas de oxígeno no se traduce en una mayor IC respecto a las dosis más altas, sino justo al contrario. Este hecho es atribuido principalmente a una mayor pérdida de anhídrido sulfuroso con las dosis más altas de oxígeno, lo que propicia una mayor liberación de antocianos pigmentados los cuales ligados al anhídrido sulfuroso son incoloros.

4. CONCLUSIONES

El color de los vinos de este ensayo ha resultado estar vinculado principalmente a la concentración de piranoantocianos, SPP y LPP. Además, todas las familias de antocianos de bajo peso molecular (especialmente antocianos glicosilados y acilados) se oponen al aumento de los tonos amarillos, sin embargo tanto los SPP como los LPP parecen contribuir al aumento de los mismos.

De manera general, el envejecimiento ha provocado un aumento de la T, de la coordenada b_{10}^* , una drástica disminución/desaparición de la concentración de anhídrido sulfuroso y un aumento en la concentración de LPP. Sin embargo, se han encontrado comportamientos diferentes en función principalmente de la concentración inicial de polifenoles totales y de la añada de los vinos. Así, vinos más envejecidos son menos reactivos y su color resulta mucho más estable. De la misma manera vinos con mayor IPT resultan tener un color más estable. El oxígeno, de manera general, parece acentuar los cambios observados durante el envejecimiento.

Existe una degradación de todas las familias de antocianos durante el envejecimiento aunque los piranoantocianos y los MV-F resultan ser más resistentes. El oxígeno favorece la degradación de todas las familias de antocianos. Sin embargo, en determinados vinos (independientemente del IPT y de la añada) se produce una formación de piranoantocianos, pero sólo con las dosis de oxígeno más bajas.

Por otro lado, se ha observado la formación o aumento en la concentración de los antocianos copigmentados en vinos muy envejecidos, mostrando la contribución de estos compuestos al color de estos vinos, no siendo exclusivos de los vinos jóvenes.

Finalmente, resulta interesante que la precipitación de materia colorante provoca una disminución de los tonos amarillos y un aumento de los tonos rojos, "rejuveneciendo" el color del vino a costa de una pérdida acusada de IC. Además esto corrobora la implicación del oxígeno en la formación de LPP y la contribución de éstos pigmentos poliméricos al aumento de los tonos amarillos de los vinos

5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Lawless, H. T., & Heymann, H. (1998). *Descriptive analysis. Sensory evaluation of food. Principles and practices.* Chapman and Hall: New York.
- [2] De Simón, B. F., Cadahia, E., Sanz, M., Poveda, P., Perez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., & Gonzalez-Herta, C. (2008). Volatile compounds and sensorial characterization of wines from four Spanish denominations of origin, aged in spanish Rebollo (*Quercus pirenaica* Willd.) oak wood barrels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9046-9055.
- [3] Morrot, G., Brochet, F., & Dubourdieu, D. (2001). The color of odors. *Brain and Language*, 79, 309-320.
- [4] Sánchez-Iglesias, M., González-San José, M. L., Pérez-Magariño, S., Ortega-Heras, M., & Gonzalez-Huerta, C. (2009). Effect of micro-oxygenation and Wood type on the phenolic composition and color of an aged red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 11498-11509.
- [5] Villamor, R., Haberson, J., & Ross, C. (2009). Influence of tannin concentration, storage temperature, and time on chemical and sensory properties of Cabernet sauvignon and Merlot wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 60, 442-449.
- [6] Puértolas, E., Saldaña, G., Condon, S., Álvarez, I., & Raso, J. (2010). Evolution of polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*, 119, 1063-1070.
- [7] Monagas, M., Gómez-Cordovés, C., & Bartolomé, B. (2005). Evolution of polyphenols in red wines from *Vitis vinifera* L. during aging in the bottle – I. Anthocyanins and pyranoanthocyanins. *European Food Research and Technology*, 220, 607-614.
- [8] Sáenz-Navajas, M. P., Tena, M. T., & Fernández-Zurbano, P. (2009). Study of hydroxycinnamic acids and malvidin 3-monoglucoside derivatives using capillary zone electrophoresis and ultra-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 115, 766-774.
- [9] Sun, B., Barradas, T., Leandro, C., Santos, C., & Spranger, I. (2008). Formation of new stable pigments from condensation reaction between malvidin 3-monoglucoside and (-)-epicatechin mediated by acetaldehyde: Effect of tartaric acid concentration. *Food Chemistry*, 110, 334-351.
- [10] De Freitas, V., & Mateus, N. (2006). Chemical transformations of anthocyanins yielding a variety of colours (Review). *Environmental Chemistry Letters*, 4, 175-183.
- [11] Pérez-Magariño, S., & González-San José, M. (2004). 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*, 52, 1181-1189.
- [12] Bakker, J., & Timberlake, C. F. (1997). Isolation, identification, and characterization of new color-stable anthocyanins occurring in some red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 35-43.
- [13] Fulcrand, H., Benabdeljalil, C., Rigaud, J., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1998). A new class of wine pigments generated by reaction between pyruvic acid and grape anthocyanins. *Phytochemistry*, 47, 1401-1407.

- [14] Sarni-Manchado, P., Fulcrand, H., Souquet, J. M., Cheynier, V., & Moutounet, M. (1996). Stability and color of unreported wine anthocyanin-derived pigments. *Journal of Food Science*, 61, 938-941.
- [15] Fulcrand, H., Cameira-DosSantos, P. J., Sarni-Manchado, P., Cheynier, V., & Favre-Bonvin, J. (1996). Structure of new anthocyanin-derived wine pigments. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions*, 7, 735-739.
- [16] Wildenradt, H. L., & Singleton, V. L. (1974). The production of acetaldehyde as a result of oxidation of phenolic compounds and its relation to wine aging. *American Journal of Enology and Viticulture*, 25, 119-126.
- [17] Danilewicz, J. C. (2003). Review of reaction mechanisms of oxygen and proposed intermediate reduction products in wine: Central role of iron and copper. *American Journal of Enology and Viticulture*, 54, 73-85.
- [18] Escribano-Bailón, T., Álvarez-García, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Heredia, F. J., & Santo-Buelga, C. (2001). Color and stability of pigments derived from the acetaldehyde-mediated condensation between malvidin 3-glucoside and (+)-catechin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1213-1217.
- [19] Rentzsch, W., Schwarz, M., & Winterhalter, P. (2007). Pyranoanthocyanins – an overview on structures, occurrence, and pathways of formation. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 526-534.
- [20] Wirth, J., Morel-Salmi, C., Souquet, J. M., Dieval, J. B., Aagaard, O., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2010). The impact of oxygen exposure before and after bottling on the polyphenolic composition of red wines. *Food Chemistry*, 123, 107-116.
- [21] Caillé, S., Samson, A., Wirth, J., Diéval, J. B., Vidal, S., & Cheynier, V. (2010). Sensory characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen exposures pre and post bottling. *Analytica Chimica Acta*, 660, 35-42.
- [22] Gambuti, A., Rinaldi, A., Ugliano, M., & Moio, L. (2013). Evolution of phenolic compounds and astringency during aging of red wine: effect of oxygen exposure before and after bottling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 1618-1627.
- [23] Wirth, J., Caillé, S., Souquet, J. M., Samson, A., Dieval, J. B., Vidal, S., Fulcrand, H., & Cheynier, V. (2012). Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory characteristics and phenolic composition of Grenache rosé wines. *Food Chemistry*, 132, 1861-1871.
- [24] O.I.V. Recueil des methodes internationales d'analyse des vins et des mouts. Vienne, 2005.
- [25] Glories, Y. (1984). La couleur des vins rouges. 1- équilibres des anthocyanes et des tanins. In *Connaissance Vigne Vin*, 195-217.
- [26] Ribéreau-Gayon, P. (1970). Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique*, 52, 627-631.
- [27] Resolution OENO 1/2006 (2006). Determination of the chromatic characteristics of wine according to CIELab. Paris, France.
- [28] Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., Vila-Crespo, J. (2009). Characterisation and classification of Spanish Verdejo Young White wines by volatile and sensory analysis with chemometric tools. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1927-1935.

- [29] C.I.E., 2004. Colorimetry, 2nd ed. Central Bureau of the Commission Internationale de L'Éclairage, Viena, Publication C.I.E. No. 15, 2.
- [30] Habertson, J. F., Picciotto, E. A., & Adams, D. O. (2003). 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*, 54, 301-306.
- [31] Boulton, R. (2001). The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: a critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 67-87.
- [32] Bakker, J., Bridle, P., Honda, P., Kuwano, H., Saito, N., Terehara, N., & Timberlake, C. (1997). Isolation and identification of a new anthocyanin occurring in some red wines. *Phytochemistry*, 44, 1375-1382.
- [33] Zamora, F. (2003). Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos. Eds. Mundi Prensa, Madrid, España. pp. 217-225.
- [34] Jaffré, J., Valentin, D., Dacremont, C., & Peyron, D. (2009). Burgundy red wines: Representation of potential for aging. *Food Quality and Preference*, 20, 505-513.
- [35] Hernández, T., Estrella, I., Dueñas, M., de Simón, B. F., & Cadahia, E. (2007). Influence of wood origin in the polyphenolic composition of a Spanish red wine aging in bottle, after storage in barrels of Spanish, French and American oak wood. *European Food Research and Technology*, 224, 695-705.
- [36] Jensen, J. S., Demiray, S., Egebo, M., & Meyer, A. S. (2008). Prediction of wine color attributes from phenolic profiles of red grapes (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 1105-1115.
- [36] Revilla, O., & González-San José, M. L. (2003). Compositional changes during the storage of red wines treated with pectolytic enzymes: low molecular-weight phenols and flava-3-ol derivative levels. *Food Chemistry*, 80, 205-214.
- [37] Revilla, I., & González-San José, M. L. (2001). Effect of different oak Woods on aged wine color and anthocyanin composition. *European Food Research and Technology*, 213, 281-285.
- [38] Sáenz-Navajas, M.P., Echavarri, F., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2011). Pigment composition and color parameters of commercial Spanish red wine samples: Linkage to quality perception. *European Food Research and Technology*, 232, 877-887.
- [39] Negueruela, I., Echavarri, J. F., & Pérez, M. M. (1995). A study of correlation within enological colorimetric indexes and CIE colorimetric parameters in red wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 353-356.
- [40] García-Puente, E., Alcalde-Eon, C., Santos-Buelga, C., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2006). Behaviour and characterisation of the colour during red wine making and maturation. *Analytica Chimica Acta* 2006, 563, 215-222.
- [41] Perez-Magariño, S., & González-San José, M. L. (2006). Polyhenols and colour variability of red wines made from grapes harvested at different ripeness grade. *Food Chemistry*, 96, 197-208.
- [42] McRae, J.M., Damberg, R.G., Kassara, S., Parker, M., Jeffery, D. W., Herderich, M.J., & Smith, P.A. (2012). Phenolic compositions of 50 and 30 year sequences of Australian red wines: the impact of wine age. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 10093-10102.

- [43] Etaio, I., Pérez-Elortondo, M. A., Gaston, E., & Schlich, P. (2009). Sensory attribute evolution in bottled young red wines from Rioja Alavesa. *European Food Research and Technology*, 228, 695-705.
- [44] García-Falcón, M.S., Pérez-Lamela, C., Martínez-Carballo, E., & Simal-Gándara, J. (2007). Determination of phenolic compounds in wines: Influence of bottle storage of young red wines on their evolution. *Food Chemistry*, 105, 248-259.
- [45] Atanasova, V., Fulcrand, H., Cheynier, V., & Moutounet, M. (2002). Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making. *Analytica Chimica Acta*, 428, 15-27.
- [46] Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., & Teissedre, P.L. (2011). Chemical and sensory evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with wine age. *Food Chemistry*, 126, 1971-1977.
- [47] Giovanelli, G., & Brenna, O. V. (2007). Oxidative stability of red wine stored in packages with different oxygen permeability. *European Food Research and Technology*, 226, 169-179.

Conclusiones generales



CONCLUSIONES

Sección II.

La fracción no volátil es la principal responsable de la generación de diferencias sensoriales en boca en los vinos tintos, siendo fundamental el papel de los compuestos químicos que causan la astringencia. No obstante, la fracción volátil juega un papel importante en las sensaciones orosensoriales superando el papel desempeñado por el dulzor y el amargor. La existencia de interacciones químico-físicas y cognitivas/perceptuales indican que la comprensión de la percepción sensorial global del vino requiere no sólo del conocimiento del contenido del vino en moléculas sensoriales activas, sino también de una mejor comprensión de las interacciones sensoriales entre la fracción volátil y no volátil del vino.

La sensación de astringencia del vino parece ser debida principalmente a la concentración de proantocianidinas poliméricas, y secundariamente, a ciertos ácidos fenólicos, algunos flavanoles, la relación entre los ácidos *t/c*-aconíticos y ciertos flavanoles.

Se ha puesto de relieve la existencia de interacciones extremadamente complejas entre los compuestos no volátiles del vino capaces de generar importantes diferencias sensoriales en boca. Particularmente notable es el potencial antagonismo entre pares de isómeros y la presencia de interacciones sensoriales del tipo dulce-astringente.

Los modelos elípticos que explican la percepción de calidad evaluada en boca a partir de la composición química no volátil sugieren que existen niveles máximos y mínimos de concentración susceptibles de generar vinos de calidad, a diferencia de los modelos vectoriales tradicionales que generan modelos "cuanto más mejor".

Sección III.

Se ha puesto de manifiesto un patrón general en la evolución de las propiedades aromáticas de los vinos tintos durante el envejecimiento en botella y sometidos a diferentes regímenes de oxígeno inicial. Este patrón implica ligeros aumentos en fruta roja, fruta pasa, madera, láctico y fuertes aumentos de notas de verduras cocidas y especias. Existen desviaciones del patrón general relacionadas con diferencias en la composición polifenólica y con las características sensoriales iniciales de los vinos.

Las propiedades evaluadas en boca se han visto poco afectadas durante el experimento de envejecimiento en botella (6 meses 25 °C), observándose ligeros aumentos de la astringencia sensorial, ligeras disminuciones en la intensidad global y persistencia y una variación del amargor que depende de las características de cada vino

El envejecimiento en botella (6 meses 25 °C) ha provocado un aumento de la tonalidad, de la proantocianidinas precipitables con proteína, de la concentración de pigmentos de alto peso molecular y una disminución en la concentración de ácido tartárico, de acetaldehído, del grado medio de polimerización, de la concentración de todas las familias de polifenoles de bajo peso molecular y una drástica disminución/desaparición de la concentración de anhídrido sulfuroso. Sin embargo, se han encontrado evoluciones diferentes en función de la concentración inicial de polifenoles totales, del pH y de la añada de los vinos estudiados.

El efecto de la presencia de diferentes dosis de oxígeno suministradas en el momento del embotellado sobre los parámetros químicos es bastante limitado y los vinos con menor índice de polifenoles totales y de mayor pH resultan ser los más influenciados. El oxígeno en general, parece acentuar los cambios observados durante el envejecimiento.

Los vinos más envejecidos resultan ser menos reactivos y su color resulta mucho más estable que el de los vinos jóvenes. De igual modo, los vinos con mayor índice de polifenoles totales resultan tener un color más estable.

Existe una degradación de todas las familias de antocianos durante el envejecimiento, aunque los piranoantocianos y los dímeros del tipo malvidina-flavanol resultan ser más resistentes. El oxígeno favorece la degradación de todas las familias de antocianos.

La precipitación de materia colorante provoca una disminución de los tonos amarillos y un aumento de los tonos rojos, "rejuveneciendo" el color del vino a costa de una pérdida acusada de la intensidad de color.

La vinculación de los cambios observados en las sensaciones evaluadas en boca con los cambios observados en la matriz no volátil parece difícil de establecer y parece depender en gran medida de numerosas y complejas interacciones que pueden estar teniendo lugar tanto a nivel físico-químico como cognitivo.

Anexos



ANEXOS

Anexo I. Consignas proporcionadas a los panelistas para el test de clasificación libre no verbal.

TEST DE CLASIFICACIÓN LIBRE

En la mesa se presentan **14 copas de vino**. Cada copa está codificada con un número de tres cifras. Le pedimos que **se introduzca en la boca** los vinos y que **CONSTITUYA** diferentes grupos de vino **basándose en la similitud de sus sensaciones en boca (sabor, aroma, sensaciones táctiles, intensidad, persistencia...)**. (Dos vinos que se asemejan se situarán en un mismo grupo mientras que dos vinos diferentes se situarán en dos grupos distintos).

- ⊕ Puede hacer **tantos grupos como desee** y poner **tantos vinos como desee en cada grupo**
- ⊕ Un grupo puede, eventualmente, estar constituido por un solo vino
- ⊕ En **primer lugar** le pedimos que pruebe las copas de **izquierda a derecha**. A continuación puede proceder **libremente**
- ⊕ Puede **probar cada vino tantas veces como desee** y puede utilizar todo el tiempo que necesite para realizar este test

Le pedimos que no quite la cubierta de plástico de las copas
Tenga en cuenta que **sólo hay 10 mL de vino** en cada copa, de modo que le recomendamos que se suministre el vino de manera que pueda hacer esta y la siguiente prueba.

Una vez constituidos los grupos, los panelistas recibieron las siguientes instrucciones;

Ahora le pedimos que **caracterice cada uno de los grupos** que acaba de constituir respondiendo a los siguientes puntos: (las respuestas se entregarán en el folio adjunto*)

⊕ **Para cada uno de los grupos constituidos:**

1. Anote los **códigos** de las copas que componen cada grupo
2. Indique los criterios de similitud que le han permitido formar los grupos (**de 1 a 3 términos** que definan el grupo)

Puede volver a probar los vinos si lo desea, pero **no debe modificar los grupos establecidos**

⇒ Le rogamos que **no comunique** las consignas de este test al resto de participantes

GRACIAS POR SU PARTICIPACIÓN

Anexo II. Folio entregado para anotar los resultados en la prueba de clasificación.

* SUJETO.....

FECHA.....

| GRUPO | CÓDIGOS DE LOS VINOS | ATRIBUTOS (1-3) |
|-------|----------------------|-----------------|
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| 5 | | |
| 6 | | |
| 7 | | |
| 8 | | |
| 9 | | |
| 10 | | |
| 11 | | |
| 12 | | |
| 13 | | |
| 14 | | |

Anexo III. Protocolo de enjuague seguido por los panelistas en las evaluaciones sensoriales.

PROTOCOLO DE ENJUAGUE ENTRE MUESTRAS

1. Introducir el vino en la boca
2. Escupir después de 10 segundos
3. Enjuagase la boca con agua desionizada (mantener en la boca durante 20 seg)
4. Enjuagase la boca con pectina (mantener en la boca durante 10 seg)
5. Enjuagase la boca con agua desionizada (mantener en la boca durante 20 seg)
6. Enjuagase una segunda vez la boca con agua desionizada (20 seg)

COMENZAR CON EL SIGUIENTE VINO

Anexo IV. Lista para describir las características sensoriales que mejor describían cada grupo.

Para finalizar, le pedimos que **caracterice cada uno de los grupos** que acaba de constituir respondiendo a los siguientes puntos (las respuestas se entregarán en el folio adjunto):

- ❖ Para cada uno de los grupos constituidos:
 1. Anote los **códigos** de las copas que componen cada grupo
 2. Indique los criterios de similitud que le han permitido formar los grupos.
Para ello deberá indicar **1 ó 2 términos de los propuestos en la lista**, que definan mejor las características del grupo de vinos establecido.

Puede volver a probar los vinos si lo desea, pero **NO DEBE MODIFICAR** los grupos establecidos.

Lista de términos:

- Astringencia
- Acidez
- Amargor
- Dulzor
- Persistencia
- Equilibrio
- Intensidad Aromática
- Intensidad Global
- Frutas blancas/amarillas
- Frutas rojas/negras
- Cítricos
- Frutas Exóticas
- Fruta pasa
- Frutos secos
- Floral
- Vegetal/verdura
- Especias
- Animal (p.ej. cuero, sudor, almizcle...)
- Madera
- Sotobosque (p.ej. champiñón, moho, humus/tierra)

Le rogamos que no comunique las instrucciones de este test al resto de participantes

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN

Anexo V. Protocolo utilizado en el análisis sensorial de las muestras de vino del capítulo 2 sección 2.

Anota la intensidad de dulzor, acidez, amargor, astringencia, intensidad global y persistencia para el vino presentado.

| | | | | | | | | | | |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| DULCE | <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 |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| ACIDO | <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 |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| AMARGO | <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 |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| ASTRINGENTE | <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 |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| PERSISTENCIA | <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 débil | | Débil | | Medio | | Fuerte | | Muy fuerte | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | |
| INTENSIDAD GLOBAL | <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 VI. Protocolo utilizado en las pruebas triangulares del capítulo 2 sección 2.

EVALUACIÓN SENSORIAL: PRUEBA TRIANGULAR

Código de Sujeto

Sesión N°:

Fecha:

Se os presentan **TRES VINOS**, dos de los cuales son iguales y uno es diferente. Por favor pruebe las muestras de izquierda a derecha, identifique la muestra **DIFERENTE** e indique característica.

| Test | Código de la muestra diferente y característica de distinción | | | | |
|------|---|----------------------|----------------------|----------------------|-------|
| 1 | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | _____ |
| 2 | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | _____ |
| 3 | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | _____ |
| 4 | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | _____ |
| 5 | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | _____ |
| 6 | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | <input type="text"/> | _____ |

Muchas gracias por su colaboración

Anexo VII. Protocolo utilizado en las sesiones de entrenamiento específico del entrenamiento sensorial de los capítulos 2 y 3 de la sección 2.

Código de Sujeto:

Fecha:

Sesión X

Parte A

Se os presentan cinco disoluciones. 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 |

PARTE B

Anota la intensidad de dulzor, acidez, amargor, astringencia, persistencia e intensidad global para el vino presentado.

| | | | | | | | | | | |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 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 |
| ACIDO | 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 débil | | Débil | | Medio | | Fuerte | | Muy fuerte | |
| INTENSIDAD GLOBAL | 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 VIII. Protocolo utilizado en las sesiones de evaluación de la calidad por expertos del capítulo 3 de la sección II.

Bienvenido a esta sesión de análisis sensorial

En la mesa tiene **16 copas de vino**. Cada copa está codificada con un número de tres cifras.

Le pedimos que **pruebe las copas de vino** de izquierda a derecha e indique su **CALIDAD** en la escala que se le presenta para cada vino.

Antes de pasar al siguiente vino le pedimos que enjuague la boca primero con pectina y finalmente con agua



Código sujeto.....

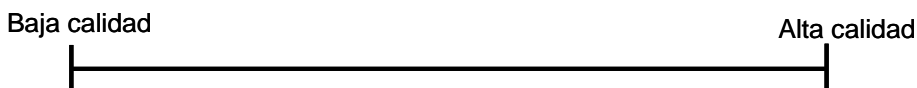
Fecha.....

Tipo de evaluación: EN BOCA (con pinza en la nariz)

CÓDIGO VINO.....



CÓDIGO VINO.....



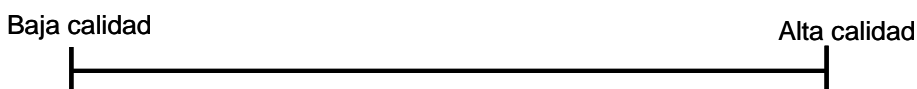
CÓDIGO VINO.....



CÓDIGO VINO.....



CÓDIGO VINO.....



CÓDIGO VINO.....



CÓDIGO VINO.....

Baja calidad

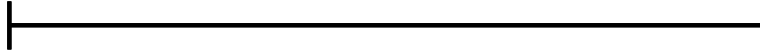
Alta calidad



CÓDIGO VINO.....

Baja calidad

Alta calidad



CÓDIGO VINO.....

Baja calidad

Alta calidad



CÓDIGO VINO.....

Baja calidad

Alta calidad



CÓDIGO VINO.....

Baja calidad

Alta calidad



CÓDIGO VINO.....

Baja calidad

Alta calidad



CÓDIGO VINO.....

Baja calidad

Alta calidad



CÓDIGO VINO.....

Baja calidad

Alta calidad



CÓDIGO VINO.....

Baja calidad

Alta calidad



CÓDIGO VINO.....

Baja calidad

Alta calidad



Anexo IX. Protocolo utilizado en las pruebas triangulares de la sección 3.**EVALUACIÓN SENSORIAL: PRUEBA TRIANGULAR****Código de Sujeto****Sesión Nº:****Fecha:**

Se os presentan **TRES VINOS**, dos de los cuales son iguales y uno es diferente. Por favor, pruebe las muestras de izquierda a derecha, identifique la muestra **DIFERENTE** e indique la característica.

| Test | Código de las muestras | Código de la muestra diferente y característica de distinción |
|------|--|---|
| 1 | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> _____ |
| 2 | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> _____ |
| 3 | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> _____ |
| 4 | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> _____ |
| 5 | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> _____ |
| 6 | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> _____ |
| 7 | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> _____ |
| 8 | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> | <input type="text"/> _____ |

Anexo X. Lista de descriptores aromáticos utilizados en el análisis descriptivo de los vinos de la sección III.

| Lista de descriptores aromáticos | | | |
|--|---|--|--|
| <input type="checkbox"/> FRUTAL | <input type="checkbox"/> FLORAL | <input type="checkbox"/> ESPECIAS | <input type="checkbox"/> QUEMADO / MADERA |
| <input type="checkbox"/> FRUTAS BLANCAS | <input type="checkbox"/> FRUTAS PASAS/SECAS | <input type="checkbox"/> ANIS / HIJOJO | <input type="checkbox"/> QUEMADO |
| <input type="checkbox"/> Manzana | <input type="checkbox"/> Ciruela | <input type="checkbox"/> Canela | <input type="checkbox"/> Caramelo |
| <input type="checkbox"/> Membrillo | <input type="checkbox"/> Dátil | <input type="checkbox"/> Clavo | <input type="checkbox"/> Café torrefacto |
| <input type="checkbox"/> Pera | <input type="checkbox"/> Higo seco | <input type="checkbox"/> Curry | <input type="checkbox"/> Pan tostado |
| <input type="checkbox"/> FRUTAS AMARILLAS | <input type="checkbox"/> FRUTOS SECOS | <input type="checkbox"/> Enebro | <input type="checkbox"/> Laurel |
| <input type="checkbox"/> albaricoque / melocotón / Nectarina | <input type="checkbox"/> Almendria | <input type="checkbox"/> Laurel | <input type="checkbox"/> Mentaol/Fresco |
| <input type="checkbox"/> Melón | <input type="checkbox"/> Avellana | <input type="checkbox"/> Miel | <input type="checkbox"/> Nuez moscada |
| <input type="checkbox"/> CÍTRICOS | <input type="checkbox"/> Nuez | <input type="checkbox"/> Rosa | <input type="checkbox"/> Pimenta |
| <input type="checkbox"/> Bergamota | <input type="checkbox"/> FRUTAS EXÓTICAS | <input type="checkbox"/> Tilo | <input type="checkbox"/> Regaliz |
| <input type="checkbox"/> Limón | <input type="checkbox"/> Coco | <input type="checkbox"/> Violeta | <input type="checkbox"/> Torrillo |
| <input type="checkbox"/> Naranja | <input type="checkbox"/> Lichi | <input type="checkbox"/> VEGETAL | <input type="checkbox"/> Vanillia |
| <input type="checkbox"/> Pomelo | <input type="checkbox"/> Mango | <input type="checkbox"/> VERDURAS | <input type="checkbox"/> ANIMAL |
| <input type="checkbox"/> FRUTAS ROJOS | <input type="checkbox"/> Maracuyá | <input type="checkbox"/> Alcachofa | <input type="checkbox"/> Cuero |
| <input type="checkbox"/> Cereza | <input type="checkbox"/> Piña | <input type="checkbox"/> Alubia verde | <input type="checkbox"/> Fumé / "Avecream" |
| <input type="checkbox"/> Fresa | <input type="checkbox"/> Plátano / Caramelo inglés | <input type="checkbox"/> Apio | <input type="checkbox"/> Almizcle |
| <input type="checkbox"/> Frambuesa | <input type="checkbox"/> Frutas cocidas / confitadas | <input type="checkbox"/> Col | <input type="checkbox"/> Pipi de gato |
| <input type="checkbox"/> Grosella | <input type="checkbox"/> Almendra amarga | <input type="checkbox"/> Espárrago | <input type="checkbox"/> Pelo mojado |
| <input type="checkbox"/> FRUTAS NEGRAS | <input type="checkbox"/> Cereza en alcohol/Kirsch | <input type="checkbox"/> Oliva | <input type="checkbox"/> Transpiración / Sudor |
| <input type="checkbox"/> Arándano | <input type="checkbox"/> Moscatel | <input type="checkbox"/> Pimiento | <input type="checkbox"/> SOTOBOSQUE |
| <input type="checkbox"/> Casis/Grosella negra | <input type="checkbox"/> Sidra | <input type="checkbox"/> Patata Cocida | <input type="checkbox"/> Champiñón |
| <input type="checkbox"/> Mora | <input type="checkbox"/> Manzana cocida | <input type="checkbox"/> Heno / Hojas secas | <input type="checkbox"/> Humus / Tierra |
| | | <input type="checkbox"/> Pino / Resina | <input type="checkbox"/> Moho |
| | | <input type="checkbox"/> Hierba | <input type="checkbox"/> Silex/Pedernal |
| | | <input type="checkbox"/> Tabaco fresco | <input type="checkbox"/> Viragre |
| | | | <input type="checkbox"/> Pegamento imedio |
| | | | <input type="checkbox"/> Levadura |
| | | | <input type="checkbox"/> Mantequilla |
| | | | <input type="checkbox"/> Lacteo |
| | | | <input type="checkbox"/> Chocolate |
| | | | <input type="checkbox"/> Caucho |
| | | | <input type="checkbox"/> Azufre |
| | | | <input type="checkbox"/> Cartón / Polvo |
| | | | <input type="checkbox"/> Alcohol |
| | | | <input type="checkbox"/> Aquitrán / Asfalto |

Anexo XI. Estándares presentados durante el entrenamiento del panel de evaluación sensorial de la Sección III. Término, referencia (química o natural) y cantidades utilizadas para cada término.

| descriptor | referencia | cantidad/concentración |
|------------------------------------|---|---|
| FRUTA | | |
| FRUTAS BLANCAS | | |
| Manzana | Manzana a trozos, | ¹ Media unidad en trozos |
| Membrillo | Membrillo a trozos | ¹ Media unidad en trozos |
| Pera | Néctar de pera, Granini | ¹ 30 mL |
| FRUTAS AMARILLAS | | |
| Albaricoque /Melocotón / Nectarina | Zumo de melocotón, Granini | ¹ 30 mL |
| Melón | Melón a trozos | Rodaja a trozos |
| CÍTRICOS | | |
| Bergamota | <i>Caramelos de bergamota, Confiserie Stanislas</i> | ¹ 2 unidades en 10 mL de agua |
| Limón | Zumo de limón diluido en agua | ¹ Zumo diluido en agua (50:50) |
| Naranja | Zumo de naranja diluido en agua | ¹ Zumo diluido en agua (50:50) |
| Pomelo | Zumo de pomelo diluido en agua | ¹ Zumo diluido en agua (50:50) |
| FRUTAS NEGRAS | | |
| Arándanos | Mermelada de arándanos, Carrrefour | ¹ Una cucharada |
| Casis / Grosella negra | Agua aromatizada de casis, Volvic | ¹ 30 mL |
| Mora | Licor de mora, Lost Castle | ¹ 30 mL |
| FRUTAS ROJAS | | |
| Cereza | Nº 18, Le Nez du Vin | ² 30 mL |
| Fresa | Caramelo de fresa disuelto en agua + un pure liofilizado de fresa | ¹ 30 mL |
| Frambuesa | Mermelada de frambuesa, Carrefour | ¹ Una cucharada |
| Grosella | Grosellas naturales | ¹ 15 unidades troceadas |
| FRUTAS PASAS/SECAS | | |
| Dátil | Dátiles secos, Borges | ¹ 3 unidades troceadas |
| Higo seco | Higos seco, Borges | ¹ 2 unidades troceadas |
| Ciruela | Ciruela seca, Borges | ¹ 3 unidades troceadas |
| FRUTOS SECOS | | |
| Almendra | Almendra tostada, Borges | ¹ 3 unidades troceadas |
| Avellana | Avellana tostada, Borges | ¹ 3 unidades troceadas |
| Nuez | Nuez tostada, Borges | ¹ 3 unidades troceadas |
| FRUTAS EXÓTICAS | | |
| Coco | Coco rayado, Royal | ¹ Una cucharada |
| Lichi | Lichis naturales | ¹ 2 unidades a trozos |
| Mango | Zumo de Mango, Compal | ¹ 30 mL |
| Maracuyá | Zumo de maracuyá, Compal | ¹ 30 mL |
| Piña | Zumo de piña, Granini | ¹ 30 mL |
| Plátano / Caramelo inglés | Acetato de isoamilio | ² 30 mL |
| OTRAS FRUTAS | | |
| Cereza en alcohol / Kirsch | Licor de cereza (Miura) + cereza confitada (Bebe) | ¹ 10 mL de licor + 1 cereza |
| Moscatel | Moscatel, Goya | ¹ 20 mL |
| Sidra | Sidra, Saizar | ¹ 30 mL |
| Frutas cocidas / confitadas | Macedonia de frutas confitadas (Vahine) | ¹ 50 g |
| Manzana cocida | Manzana asada | ¹ Media a trozos |
| Almendra amarga | Nº 21, Le Nez du Vin | ² 30 mL |
| FLORAL | | |
| Acacia | Nº 25, La Nariz del Vino ² | ² 30 mL |
| Azahar | Extracto de azahar, Vahiné | 140 gotas en 30 mL de agua |
| Geranio | Aceite esencial, Todo Aromas | ² 30 mL |
| Jazmin | Aceite esencial, La Casa de los Aromas ² | ² 30 mL |
| Lila | Lila natural | ¹ flor rota |
| Madreselva | Aceite esencial, Todo Aromas | ² 30 mL |
| Manzanilla | Manzanilla, Carrefour | ¹ 1 bolsita infusionada en 50 mL |
| Miel | Miel de Flores, San Francisco | ¹ 2 cucharadas en 10 mL de agua |
| Rosa | Rosa natural | ¹ 4 pétalos y tallos cortados |

Anexo XI. Continuación

| descriptor | referencia | cantidad/concentración |
|------------------------|--|---|
| Tilo | Tila, Carrefour | ¹ 1 bolsita infusionada en 50 mL |
| Violeta | N°22, Le Loto des Odeurs | ² 30 mL |
| ESPECIAS | | |
| Anis / Hinojo | Anis, Carrefour agricultura ecológica | ¹ 1 bolsita infusionada en 50 mL |
| Canela | Canela en polvo, Carrefour | ¹ media cucharadita |
| Clavo | Granos de clavo | ¹ 2 unidades |
| Curry | Curry, Carmelita | ¹ media cucharadita |
| Enebro | Granos de enebro | ¹ 6 unidades trituradas |
| Laurel | Hojas de laurel | ¹ 2 hojas troceadas |
| Menta / Fresco | Caramelos de menta | ¹ 4 unidades en 10 mL de agua |
| Nuez moscada | Nuez moscada, Carmelita | ¹ 1 unidad triturada en agua |
| Pimienta | Pimienta negra en polvo, Carrefour | ¹ media cucharadita |
| Regaliz | Regaliz | ¹ Palo (2 cm x 1 cm) |
| Tomillo | Tomillo en polvo, Carrefour | ¹ media cucharadita |
| Vainilla | Vainillina, Sigma-Aldrich | ¹ 30 g L ⁻¹ |
| VEGETAL | | |
| VERDURAS | | |
| Alcachofa | Alcachofa cocida en trozos | ¹ 30 mL |
| Alubia verde | Agua de alubia verde | ¹ 5 mL |
| Apio | Hoja de apio | ¹ 1 hoja en trozos |
| Coliflor | Agua de cocción de coliflor | ¹ 5 mL en 5 mL de agua |
| Espárragos | Agua de espárragos en conserva, Carretilla | ¹ 1 mL (diluído 1/10) |
| Oliva | Caldo de olivas diluido en agua, Carrefour | ¹ 5 mL |
| Pimiento | Pimiento en trozos | ¹ 1 unidad en trozos |
| OTROS VEGETALES | | |
| Heno/hoja seca | N° 38, La Nariz del Vino | ² 30 mL |
| Pino/resina | Acículas de pino ¹ | ¹ 20 acículas de pino |
| Hierba | Hierba cortada | ² 100 µL |
| Tabaco fresco | Tabaco fresco, Chesterfield | ¹ ½ cigarro |
| Patata cocida | Trozo patata cocida | ¹ media patata cocida |
| OTROS | | |
| Alcohol | Etanol, Sigma | ¹ diluído 1/2 |
| Alquitrán/asfalto | Tela asfáltica y alquitrán | un trozo (8 cm x 1 cm) |
| Azufre | N° 6, La Nariz del Vino ² , <i>Les défauts</i> ² | ² 30 mL |
| Cartón/polvo | Cartón y polvo de aspiradora | ¹ polvo aspiradora y trozos carton |
| Caucho | N° 36, La Nariz del Café ² , <i>Passion révélation</i> ² | ² 30 mL |
| Chocolate | Pepitas de chocolate, Vahiné | ¹ 1 cucharadita |
| Levadura | Levadura vínica | ¹ 5 g en 50 mL de agua caliente |
| Mantequilla | Mantequilla, Carrefour | ¹ 10 g |
| Láctico | Nata líquida, President | ¹ 30 mL |
| Silex/pedernal | bis (2-metil-1,3,4-tiadiazolil)-5,5'-disulfano ² | |
| Disolvente | | |
| Pegamento | Acetato de etilo | ² 30 mL |
| Vinagre | Vinagre, El encierro | ¹ 1 mL (diluído 1/10) |
| SOTOBOSQUE | | |
| Champiñón | Jugo de champiñón en conserva, Carrefour | ¹ 1 mL (diluído 1/10) |
| Humus/tierra | Tierra húmeda | ¹ 10 g |
| Moho | N° 11, La Nariz del Vino ² , <i>Les défauts</i> ² | ² 30 mL |
| ANIMAL | | |
| Cuero | Cuero + 4-etil-fenol, Sigma | ¹ 2 10 mg L ⁻¹ |
| Fumé / "Avecrem" | Gallina blanca, Avecrem de carne | ¹ una pastilla en agua |
| Almizcle | Pelleta de ciervo | ¹ trozo |
| Orina de gato | Arena con pis de gato | un bote de 120 mL lleno |
| Perro mojado | Pelo de perro húmedo | ¹ pelo humedo de perro |
| Sudor | Camiseta sudada | ¹ trozo de camiseta sudada |

Anexo XI. Continuación.

| descriptor | referencia | cantidad/concentración |
|-----------------------|---|--|
| TOSTADO/MADERA | | |
| TOSTADO | | |
| Caramelo | Caramelo líquido, Royal | ¹ 30 mL |
| Café torrefacto | Café torrefacto | ¹ 1 cucharadita |
| Pan tostado | Pan tostado | ¹ ½ rebanada en trozos tostada |
| MADERA | | |
| Madera verde / nueva | Extracto de virutas de roble en alcohol | ¹ 5 g en 60 mL de etanol-H ₂ O (50:50) |
| Humo de madera | Nº 54, Le Nez du Vin ² | ² 30 mL |

¹En un frasco de topacio de 60 mL. ²Frasco de cristal de topacio (60 mL) con un soporte de papel absorbente (5 x 11 cm) impregnado con 5 gotas de disolución odorante.

Anexo XII. Formato utilizado durante la fase de entrenamiento general.

Código de Sujeto:

Fecha:

Sesión 2**Parte A**

Se os presentan 2 vinos y 12 referencias. El objetivo de esta parte es, en el caso que lo creas oportuno, asociar a cada vino una o varias referencias.

Lo primero que se os pide es oler los 2 vinos y a continuación podréis oler los vinos o las referencias libremente.

| Vino | Referencias asociadas |
|------|-----------------------|
| A | |
| B | |

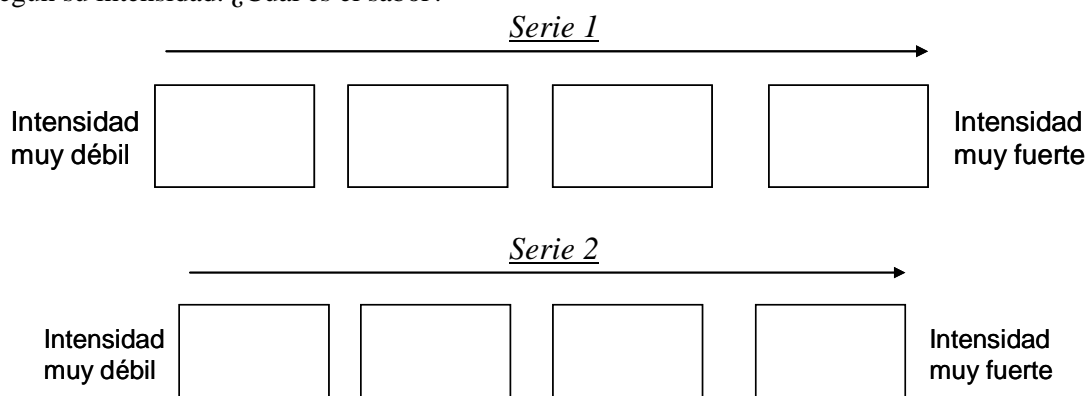
Parte B

A partir de la lista de descriptores, se os pide que primeramente intentéis encontrar a qué categoría de aroma pertenece cada referencia y a continuación intentar de encontrar a qué descriptor corresponde cada referencia.

| Réf. N° | Categoría | Descriptor |
|---------|-----------|------------|
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| 5 | | |
| 6 | | |
| 7 | | |
| 8 | | |
| 9 | | |
| 10 | | |
| 11 | | |
| 12 | | |

Parte C

Se os presentan cuatro disoluciones acuosas. Os pedimos que las probéis y que las clasifiquéis según su intensidad. ¿Cuál es el sabor?

**Parte D**

Finalmente, os pedimos que rodeéis con un círculo el sabor/sensación predominante en los vinos que se os han presentado anteriormente.

Vino A : Dulce Ácido Amargo Astringente*

Vino B : Dulce Ácido Amargo Astringente*

Anexo XIII. Formato utilizado durante la fase de entrenamiento específico.

Código de Sujeto:

Fecha:

Sesión 6**PARTE A**

A partir de la lista de descriptores, se os pide que primeramente intentéis encontrar a qué categoría de aroma pertenece cada referencia y a continuación intentar de encontrar a qué descriptor corresponde cada referencia.

| Ref. N° | Categoría | Descriptor |
|---------|-----------|------------|
| 1 | | |
| 2 | | |
| 3 | | |
| 4 | | |
| 5 | | |
| 6 | | |
| 7 | | |
| 8 | | |
| 9 | | |
| 10 | | |
| 11 | | |
| 12 | | |

Parte B

Se os presentan 2 series de disoluciones. 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 |

PARTE C

Se os presentan **TRES VINOS**. Anota la **INTENSIDAD AROMÁTICA** para cada uno de los vinos.

A continuación, marca un **máximo de 5 términos** de la lista de manera que describáis, a vuestro parecer, el aroma de los vinos.

VINO A

| | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 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 |

VINO B

| | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 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 |

VINO C

| | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 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 |

Anexo XIII. Continuación.**Parte D**

Anota la intensidad de dulzor, acidez, amargor, astringencia, intensidad global y persistencia para el vino presentado.

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>DULCE</i> | 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 |
| <i>ÁCIDO</i> | 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 |
| <i>AMARGO</i> | 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 |
| <i>ASTRINGENTE</i> | 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 |
| <i>PERSISTENCIA</i> | 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 débil | | Débil | | Medio | | Fuerte | | Muy fuerte | |
| <i>INTENSIDAD GLOBAL</i> | 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 | |

Parte D

Anota la intensidad de dulzor, acidez, amargor, astringencia, intensidad global y persistencia para el vino presentado.

| | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>DULCE</i> | 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 |
| <i>ÁCIDO</i> | 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 |
| <i>AMARGO</i> | 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 |
| <i>ASTRINGENTE</i> | 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 |
| <i>PERSISTENCIA</i> | 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 débil | | Débil | | Medio | | Fuerte | | Muy fuerte | |
| <i>INTENSIDAD GLOBAL</i> | 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 XIV. Protocolo utilizado en el análisis sensorial de las muestras de vino de la sección III.

PROTOCOLO ANÁLISIS SENSORIAL DE MUESTRAS

1. Oler el vino orthonasalmente (directamente con la nariz en la copa, sin beber)
2. Anotar la intensidad aromática en la escala
3. Anotar un máximo de 5 descriptores aromáticos que encuentres en el vino
4. Introducirse el vino en la boca
5. Anotar las sensaciones de dulzor, acidez, amargor, astringencia, intensidad global y persistencia en sus escalas
6. Enjuagarse la boca con el protocolo adjunto
7. Comenzar con el siguiente vino.

CÓDIGO VINO :

CÓDIGO SUJETO :

Parte A


| | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <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 |

Anota la **INTENSIDAD AROMÁTICA**

Marca un **máximo de 5 términos** en la lista para describir el aroma del vino presentado

Lista de descriptores aromáticos

| | | | | | |
|--|--|--|---|--|--|
| <p><input type="checkbox"/> FRUTAL</p> <p><input type="checkbox"/> FRUTAS BLANCAS</p> <p><input type="checkbox"/> Manzana <input type="checkbox"/> Membrillo <input type="checkbox"/> Pera</p> <p><input type="checkbox"/> FRUTAS PASAS/SECAS</p> <p><input type="checkbox"/> Ciruela <input type="checkbox"/> Dátil <input type="checkbox"/> Higo seco</p> <p><input type="checkbox"/> FRUTAS AMARILLAS</p> <p><input type="checkbox"/> albaricoque / melocotón / Nectarina <input type="checkbox"/> Melón</p> <p><input type="checkbox"/> CITRICOS</p> <p><input type="checkbox"/> Bergamota <input type="checkbox"/> Limón <input type="checkbox"/> Naranja <input type="checkbox"/> Pomelo</p> <p><input type="checkbox"/> FRUTAS ROJOS</p> <p><input type="checkbox"/> Cereza <input type="checkbox"/> Fresa <input type="checkbox"/> Frambuesa <input type="checkbox"/> Grosella</p> <p><input type="checkbox"/> FRUTAS NEGRAS</p> <p><input type="checkbox"/> Arándano <input type="checkbox"/> Casis/Grosella negra <input type="checkbox"/> Mora</p> | <p><input type="checkbox"/> FRUTAS PASAS/SECAS</p> <p><input type="checkbox"/> Ciruela <input type="checkbox"/> Dátil <input type="checkbox"/> Higo seco</p> <p><input type="checkbox"/> FRUTOS SECOS</p> <p><input type="checkbox"/> Almendra <input type="checkbox"/> Avellana <input type="checkbox"/> Nuez</p> <p><input type="checkbox"/> FRUTAS EXÓTICAS</p> <p><input type="checkbox"/> Coco <input type="checkbox"/> Lichi <input type="checkbox"/> Mango <input type="checkbox"/> Maracuyá <input type="checkbox"/> Piña <input type="checkbox"/> Plátano / Caramelo inglés</p> <p><input type="checkbox"/> Frutas cocidas / confitadas</p> <p><input type="checkbox"/> Almendra amarga</p> <p><input type="checkbox"/> Cereza en alcohol/Kirsch</p> <p><input type="checkbox"/> Moscatel</p> <p><input type="checkbox"/> Sidra</p> <p><input type="checkbox"/> Manzana cocida</p> | <p><input type="checkbox"/> FLORAL</p> <p><input type="checkbox"/> Acacia <input type="checkbox"/> Azahar <input type="checkbox"/> Geranio <input type="checkbox"/> Jazmin <input type="checkbox"/> Lila <input type="checkbox"/> Madreselva <input type="checkbox"/> Manzanilla <input type="checkbox"/> Miel <input type="checkbox"/> Rosa <input type="checkbox"/> Tilo <input type="checkbox"/> Violeta</p> <p><input type="checkbox"/> VEGETAL</p> <p><input type="checkbox"/> VERDURAS</p> <p><input type="checkbox"/> Alcachofa <input type="checkbox"/> Alubia verde <input type="checkbox"/> Apio <input type="checkbox"/> Col <input type="checkbox"/> Espárrago <input type="checkbox"/> Oliva <input type="checkbox"/> Pimiento <input type="checkbox"/> Patata Cocida</p> <p><input type="checkbox"/> Heno / Hojas secas</p> <p><input type="checkbox"/> Pino / Resina</p> <p><input type="checkbox"/> Hierba</p> <p><input type="checkbox"/> Tabaco fresco</p> | <p><input type="checkbox"/> ESPECIAS</p> <p><input type="checkbox"/> Anís / Hinojo <input type="checkbox"/> Canela <input type="checkbox"/> Clavo <input type="checkbox"/> Curry <input type="checkbox"/> Enebro <input type="checkbox"/> Laurel <input type="checkbox"/> Mentol/Fresco <input type="checkbox"/> Nuez moscada <input type="checkbox"/> Pimienta <input type="checkbox"/> Regaliz <input type="checkbox"/> Tomillo <input type="checkbox"/> Vainilla</p> <p><input type="checkbox"/> ANIMAL</p> <p><input type="checkbox"/> Cuero <input type="checkbox"/> Fumé/ "Avecream" <input type="checkbox"/> Almicle <input type="checkbox"/> Pipi de gato <input type="checkbox"/> Pelo mojado <input type="checkbox"/> Transpiración / Sudor</p> | <p><input type="checkbox"/> QUEMADO / MADERA</p> <p><input type="checkbox"/> QUEMADO</p> <p><input type="checkbox"/> Caramelo <input type="checkbox"/> Café torrefacto <input type="checkbox"/> Pan tostado</p> <p><input type="checkbox"/> MADERA</p> <p><input type="checkbox"/> Madera verde / nueva <input type="checkbox"/> Humo de madera</p> <p><input type="checkbox"/> SOTOBOSQUE</p> <p><input type="checkbox"/> Champiñon <input type="checkbox"/> Humus / Tierra <input type="checkbox"/> Moho</p> | <p><input type="checkbox"/> OTROS</p> <p><input type="checkbox"/> Alcohol <input type="checkbox"/> Alquitrán / Asfalto <input type="checkbox"/> Azufre <input type="checkbox"/> Cartón / Polvo <input type="checkbox"/> Caucho <input type="checkbox"/> Chocolate <input type="checkbox"/> Levadura <input type="checkbox"/> Mantequilla <input type="checkbox"/> Lacteo <input type="checkbox"/> Silex/Pedernal <input type="checkbox"/> Vinagre <input type="checkbox"/> Pegamento imedio</p> |
|--|--|--|---|--|--|



Anexo XIV. Continuación.**Parte B**

Anota la intensidad de dulzor, acidez, amargor, astringencia, intensidad global y persistencia para el vino presentado

| | | | | | | |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>DULCE</i> | <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 |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>ÁCIDO</i> | <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 |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>AMARGO</i> | <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 |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <i>ASTRINGENTE</i> | <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 |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| <i>INTENSIDAD GLOBAL</i> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Muy débil | débil | Medio | Fuerte | Muy Fuerte | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | |
| <i>PERSISTENCIA</i> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Muy corta | corta | Media | Larga | Muy Fuerte | |

Anexo XV. Cálculo y distribuciones observadas y esperadas de los términos combinados propuestos obtenidos a partir de la FC del análisis descriptivo de las muestras del capítulo 1 de la sección III.

En un primer momento se calculan las distribuciones de resultados más probables para un descriptor si la elección de términos se realizara por causas puramente aleatorias. Calculadas estas distribuciones, se compara mediante pruebas chi-cuadrado con las distribuciones obtenidas experimentalmente. Se estudia caso a caso separando las distribuciones según el valor de significatividad y según la distribución, diferenciando los siguientes casos:

- a. Términos con una distribución significativamente SUPERIOR a la esperada aleatoriamente.
- b. Términos con una distribución no significativamente distinta a la esperada, pero con una Frecuencia Máxima superior a la probabilística. Son muestras que han recibido un número total de citas cercano a la media. También han sido incluidos en este caso
- c. Términos con una distribución que no significativamente distinta a la esperada.
NS
- d. Términos con una distribución significativamente INFERIOR a la esperada.

En este caso, se conservan menos de la tercera parte de los términos, pero el 66% de las citas totales. También se muestra que los términos clasificados como INFERIOR apenas retienen citas y pueden considerarse como ruido. Los términos clasificados como NS están en una zona intermedia y solo se consideraran, en su caso, para construir términos combinados.

En este caso las pruebas de chi-cuadrado de los 34 términos que con una distribución superior a la esperada pero con una frecuencia máxima superior a la probabilística se muestra en la siguiente tabla.

Anexo XV. Continuación

Pruebas de chi-cuadrado para los términos significativos

| | término | Frec Max | Suma | Chi ² | p(Chi) |
|----|------------------|----------|------|------------------|-----------|
| 1 | Frutas negras | 14 | 707 | 5643,94 | 0 |
| 2 | Alcohol | 17 | 716 | 4940,87 | 0 |
| 3 | Madera | 12 | 565 | 4174,16 | 0 |
| 4 | Frutos rojos | 10 | 485 | 3364,5 | 0 |
| 5 | Espicias | 10 | 396 | 1711,88 | 0 |
| 6 | Frutas pasas | 10 | 348 | 1312,34 | 1,35E-281 |
| 7 | Madera verde | 10 | 331 | 894,49 | 4,14E-191 |
| 8 | Vainilla | 12 | 355 | 865,39 | 28,02 |
| 9 | Caramelo | 10 | 325 | 726,18 | 1,07E-154 |
| 10 | Cuero | 12 | 317 | 628,07 | 1,74E-133 |
| 11 | Pan tostado | 12 | 323 | 615,78 | 7,85E-131 |
| 12 | Regaliz | 9 | 283 | 443,361 | 1,33E-93 |
| 13 | Oliva | 22 | 301 | 385,84 | 3,32E-81 |
| 14 | Mora | 8 | 277 | 380,54 | 4,62E-80 |
| 15 | Verduras | 9 | 259 | 369,35 | 1,19E-77 |
| 16 | Ciruela | 7 | 251 | 304,64 | 1,00E-63 |
| 17 | Mentol/fresco | 13 | 244 | 260,35 | 3,29E-54 |
| 18 | Otros | 18 | 86 | 253,29 | 1,08E-52 |
| 19 | Lácteo | 10 | 28 | 209,51 | 2,61E-43 |
| 20 | Vegetal | 8 | 249 | 202,24 | 9,41E-42 |
| 21 | Humo de madera | 20 | 260 | 186,36 | 2,34E-38 |
| 22 | Frutos secos | 7 | 207 | 86,8017 | 3,15E-17 |
| 23 | Pimienta | 7 | 202 | 74,96 | 9,44E-15 |
| 24 | Tomillo | 7 | 73 | 55,85 | 8,70E-11 |
| 25 | Azufre | 8 | 143 | 48,83 | 2,39E-09 |
| 26 | Café torrefacto | 13 | 180 | 40,6 | 1,13E-07 |
| 27 | Patata cocida | 10 | 161 | 34,64 | 1,77E-06 |
| 28 | Mantequilla | 10 | 237 | 34,27 | 2,10E-06 |
| 29 | Fresa | 9 | 153 | 28,14 | 3,41E-05 |
| 30 | Animal | 7 | 147 | 28,02 | 3,60E-05 |
| 31 | Cereza | 8 | 145 | 26,25 | 7,97E-05 |
| 32 | Pegamento imedio | 7 | 110 | 14,15 | 0,0146 |
| 33 | Chocolate | 8 | 108 | 12,4 | 0,0296 |
| 34 | Tabaco fresco | 7 | 109 | 10,16 | 0,0707 |

Selección de términos combinados

Aunque tener 34 términos favorece una descripción detallada de los vinos, es algo inmanejable a efectos de “comunicación” de resultados. Por este motivo, se desea hacer una selección de términos combinados que mantengan esencialmente toda la información de los 34 términos por separado.

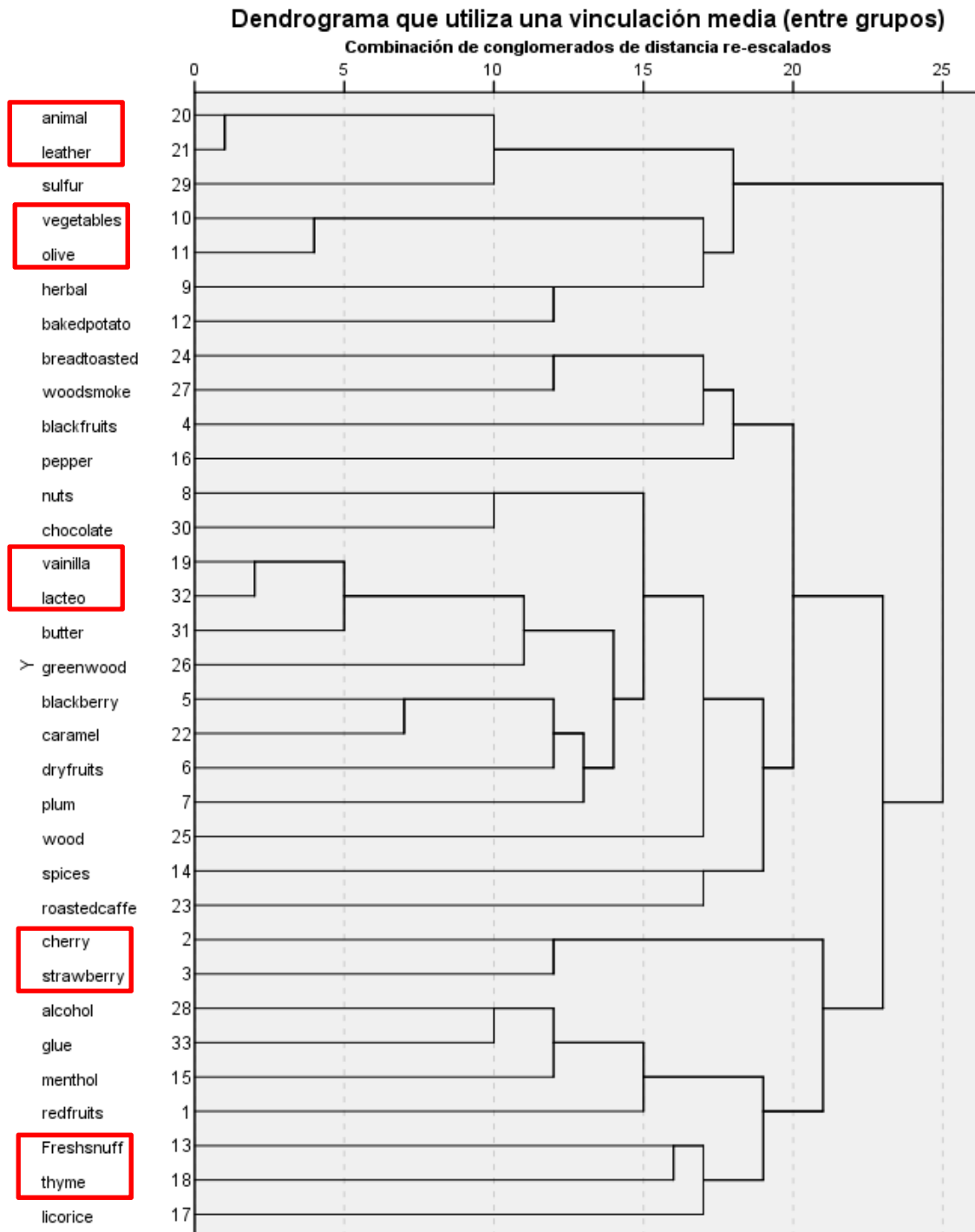
La selección de términos combinados se hace en función de dos criterios:

- Familias aromáticas naturales (tal y como se han definido en la ficha de cata)

Anexo XV. Continuación

- Análisis clúster de variables, que permitirá ver algunas asociaciones entre términos.

Dendrograma obtenido del análisis clúster (HCA) (vinculación inter-grupos correlación de Pearson).



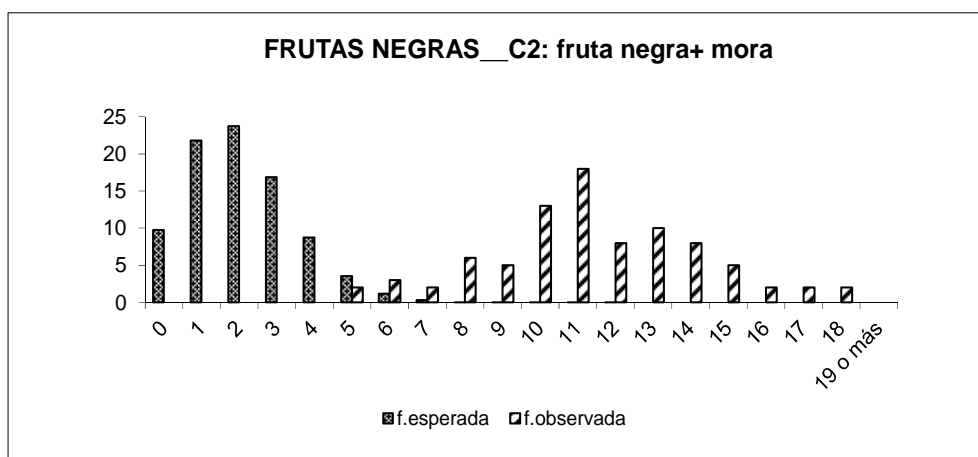
Anexo XV. Continuación

El árbol sugiere agrupar los términos que se encuadran en rojo, teniendo esto en cuenta además de la clasificación de los atributos tal y como aparece en la lista proporcionada a los panelistas, los TERMINOS PROPUESTOS son los siguientes:

1. FRUTA NEGRA_C2: Frutas negras + mora
2. FRUTOS ROJOS_C3: Frutos rojos + fresa + cereza
3. FRUTA PASA_C2: Fruta pasa + ciruela
4. FRUTOS SECOS_C1: frutos secos
5. MADERA_C3: Madera + madera verde + humo de madera
6. TOSTADO_C3: pan tostado + café + caramelo
7. ESPECIAS_C4: Especias + Regaliz + pimienta + vainilla
8. VERDURAS_C4: Verdura+vegetal+oliva+patata cocida
9. HERBAL_C3: tabaco fresco + tomillo+ mentol/fresco
10. ANIMAL_C2: animal + cuero
11. LÁCTICO_C2: mantequilla + lácteo
12. Chocolate_C1
13. Pegamento_C1
14. Azufre_C1

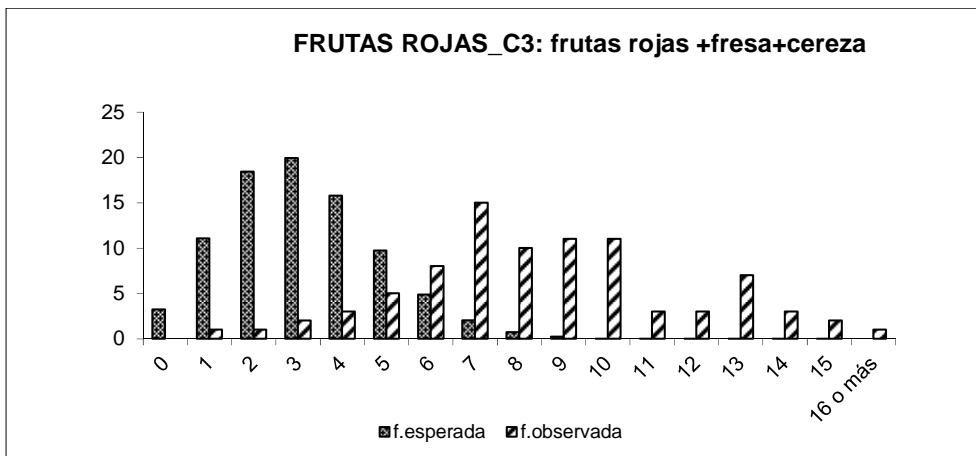
Distribuciones esperadas y observadas para los términos combinados

Frutas negras

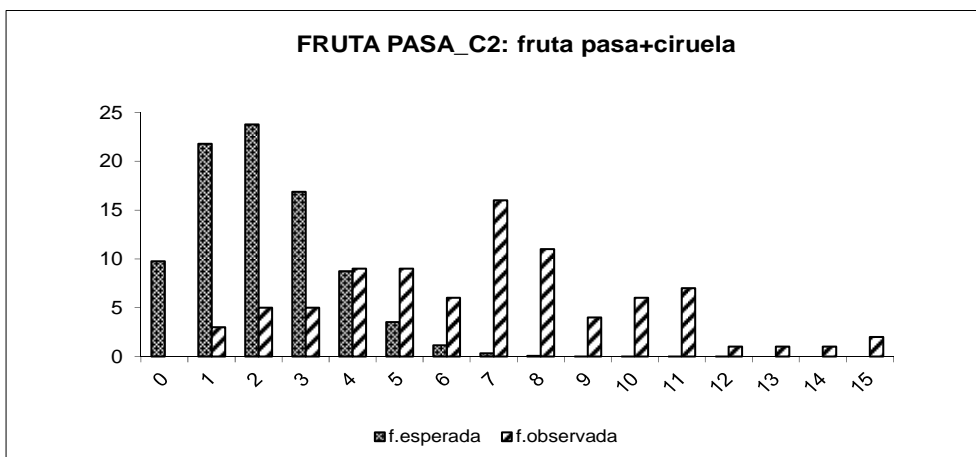


Anexo XV. Continuación

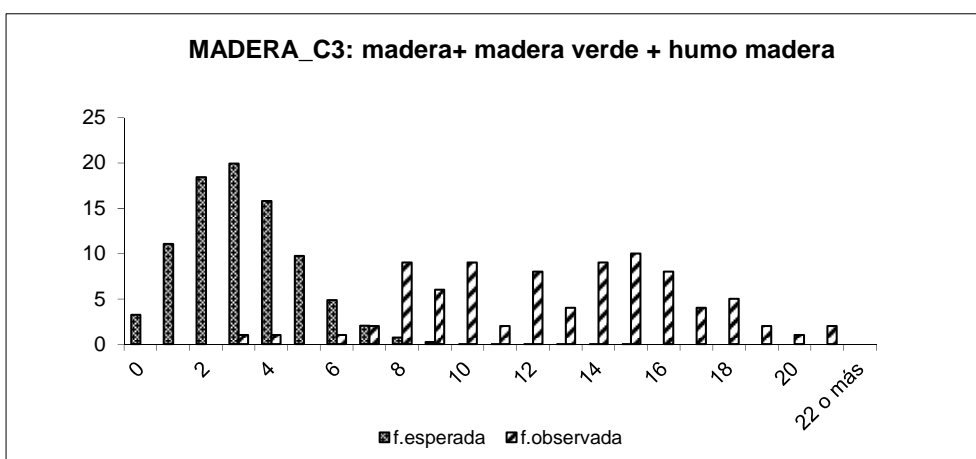
Frutas rojas



Frutas pasas

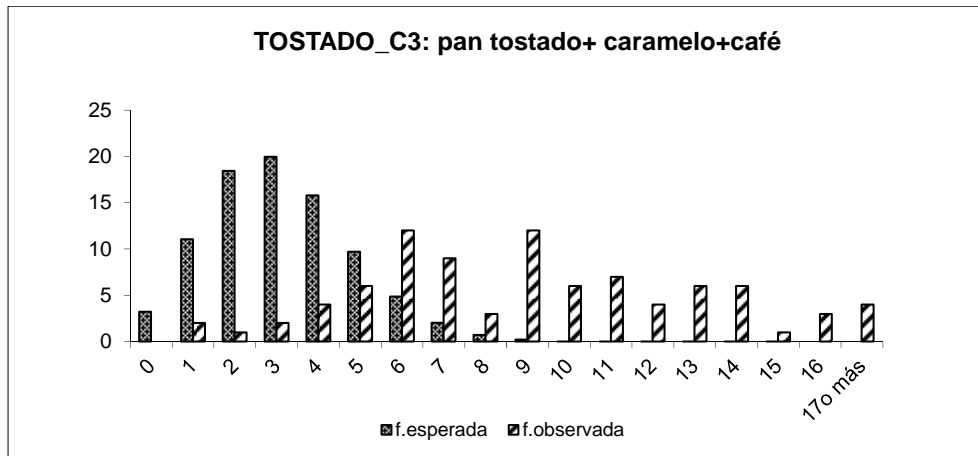


Madera

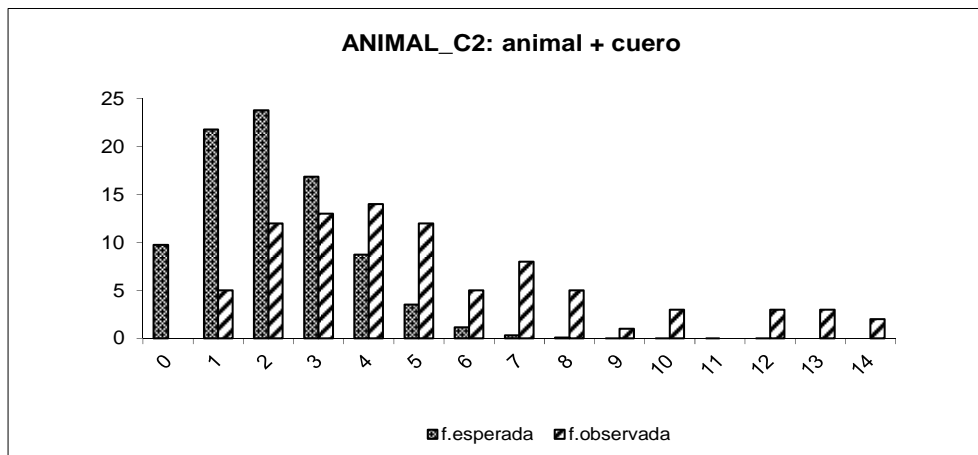


Anexo XV. Continuación

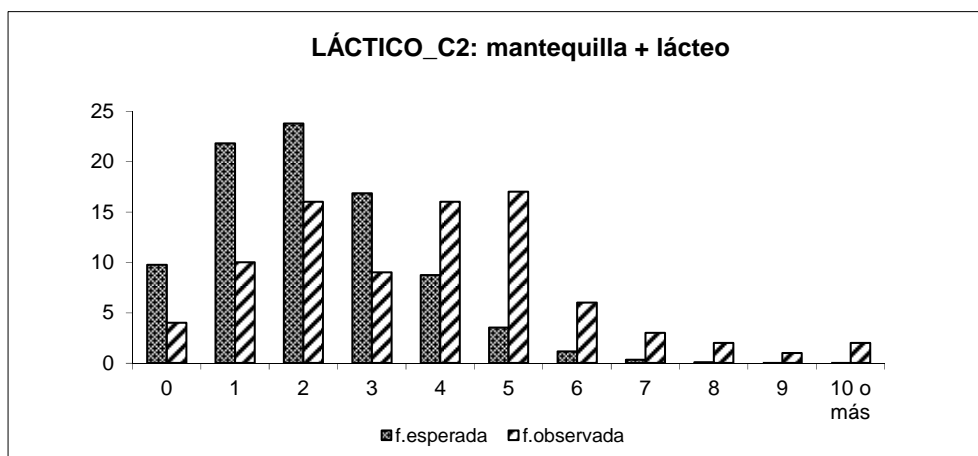
Tostado



Animal

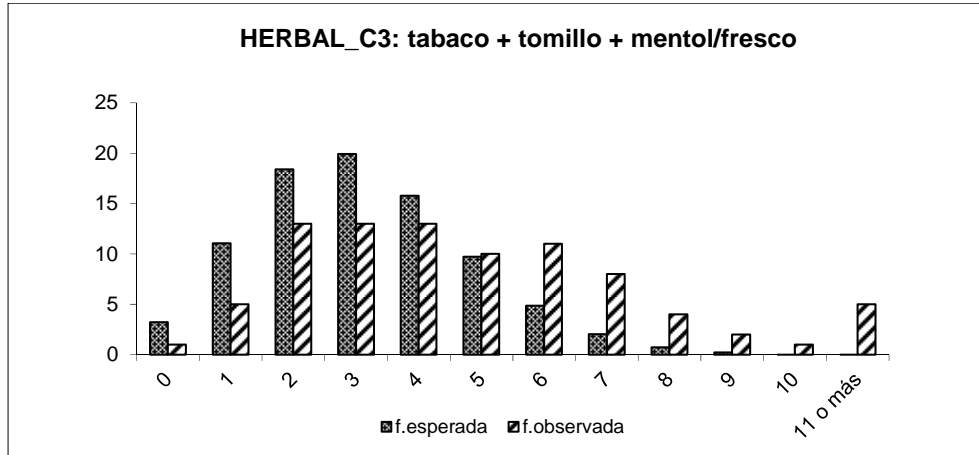


Láctico

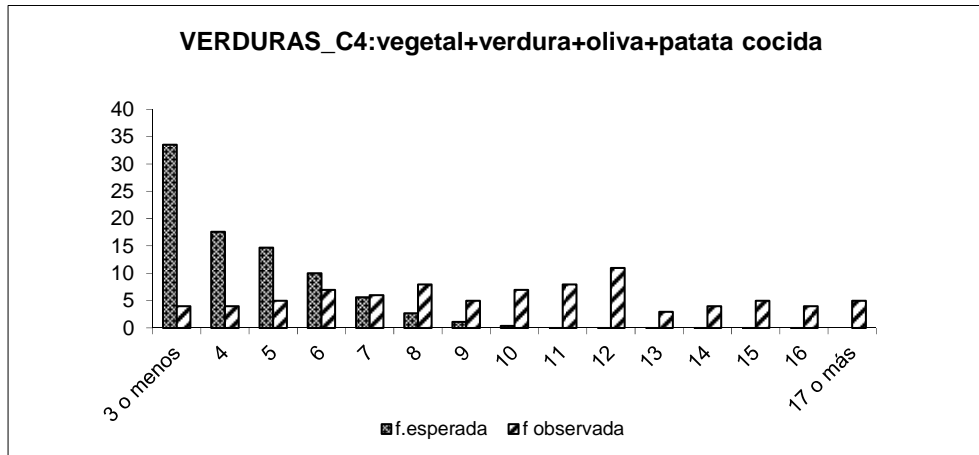


Anexo XV. Continuación

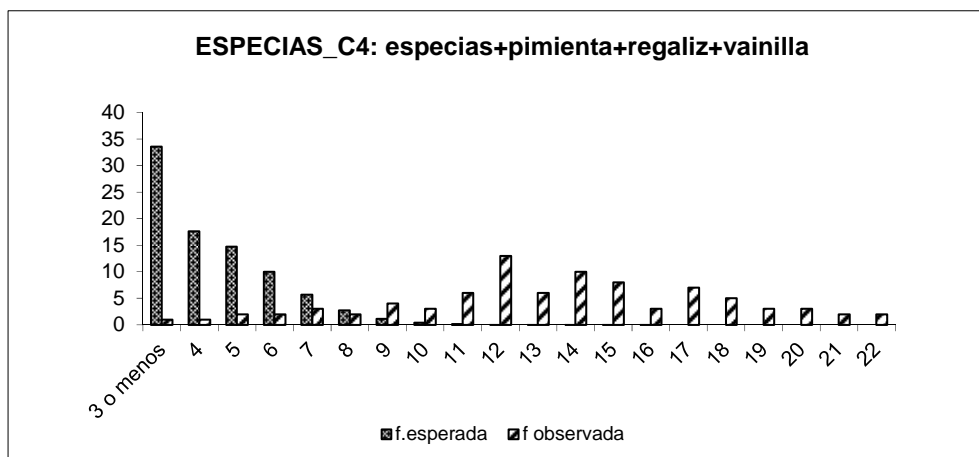
Herbal



Verdura cocida



Espicias



Publicaciones





Contribution of non-volatile and aroma fractions to in-mouth sensory properties of red wines: Wine reconstitution strategies and sensory sorting task

María-Pilar Sáenz-Navajas^a, Eva Campo^{b,*}, José Miguel Avizcuri^a, Dominique Valentin^c, Purificación Fernández-Zurbano^a, Vicente Ferreira^b

^a Department of Chemistry, University of La Rioja, Madre de Dios 51, E-26006 Logroño, La Rioja, Spain

^b Laboratory for Aroma Analysis and Enology, Aragón Institute of Engineering Research (I3A), Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

^c UMR CSG 5170 CNRS INRA UB. CESC, 15 Rue Hugues Picardet, 21000 Dijon, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 August 2011

Received in revised form

25 November 2011

Accepted 20 December 2011

Available online 30 December 2011

Key words:

Wine

Aroma

Orthonasal

Retronasal

Perceptual interactions

Astringency

Bitterness

Fruitiness

Proanthocyanidins

ABSTRACT

This work explores to what extent the aroma or the non-volatile fractions of red wines are responsible for the overall flavor differences perceived in-mouth. For this purpose, 14 samples (4 commercial and 10 reconstituted wines), were sorted by a panel of 30 trained assessors according to their sensory in-mouth similarities. Reconstituted wines were prepared by adding the same volatile fraction (coming from a red wine) to the non-volatile fraction of 10 different red wines showing large differences in perceived astringency. Sorting was performed under three different conditions: (a) no aroma perception: nose-close condition (NA), (b) retronasal aroma perception only (RA), and (c) allowing retro- and involuntary orthonasal aroma perception (ROA). Similarity estimates were derived from the sorting and submitted to multidimensional scaling (MDS) followed by hierarchical cluster analysis (HCA). Results have clearly shown that, globally, aroma perception is not the major driver of the in-mouth sensory perception of red wine, which is undoubtedly primarily driven by the perception of astringency and by the chemical compounds causing it, particularly protein precipitable proanthocyanidins (PAs). However, aroma perception plays a significant role on the perception of sweetness and bitterness. The impact of aroma seems to be more important whenever astringency, total polyphenols and protein precipitable PAs levels are smaller. Results also indicate that when a red-black fruit odor nuance is clearly perceived in conditions in which orthonasal odor perception is allowed, a strong reduction in astringency takes place. Such red-black fruit odor nuance seems to be the result of a specific aroma release pattern as a consequence of the interaction between aroma compounds and the non-volatile matrix.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Sensory interactions have been widely demonstrated to occur in simple model solutions with compounds naturally present in wine [1,2] as well as in more complex systems [3,4]. In general, sensory studies carried out with real edible products agree in finding that (a) interactions are product-dependent due to the presence of chemo-physic bindings among molecules responsible for the release of different patterns of the volatile fraction, and (b) perceived flavor during consumption is the result of interactions at the cognitive level. Thus, working with complex matrices similar to the real product is essential for gaining knowledge about flavor interactions, as highlighted in the literature [5]. Recently, a relatively simple methodology for obtaining reconstituted wine samples

similar to real wines has been developed [6], which has made it possible to assess the existence and effects of chemo-physic [7] and cognitive [6] interactions in wine samples. These studies found that wine non-volatile matrix exerts a powerful influence on the release of odorants, strong enough even to make a white wine aroma to smell as a red wine and vice versa, and also to create certain differences in the perceived aroma among red wines [7]. On the contrary, it was observed that fruity aroma extracts from white wines were able to increase sweetness and decrease astringency and bitterness in all wine types, determining also global intensity and persistence but only in white wines [6]. However, the effects caused by aroma extracts from red wines on their in-mouth flavor properties were less clear. In fact, replacing the aroma fraction of a given red wine by the aroma fraction extracted from a very different wine did not cause any consistent effect on its taste properties, astringency and persistence, which suggests that the aroma fraction plays only a secondary role, if any, on these sensory attributes. This result is in apparent contrast to the experimental fact observed in the process

* Corresponding author.

E-mail address: emcampo@unizar.es (E. Campo).

of red wine dearomatization: dearomatized red wines present little to no sapid structure, with a manifest loss of the gustative equilibrium, which suggests that aroma composition is actually a major contributor to the in-mouth sensory perception. We can think on two possible non-exclusive explanations for this apparent contradiction. The first one would be related to the need of the presence of a certain minimal, but not critical, amount of aroma compounds for finding a balanced in-mouth sensory profile. In that case, the small changes represented by replacing one red wine aroma composition by a second one, also coming from a red wine, would not be enough to create changes as strong as those observed in completely dearomatized samples. The second one would be that the changes on the in-mouth sensory perceptions introduced by changing aroma composition would have gone undetected by the quantitative descriptive methodology used in the reference [6]. Descriptors measured in mouth were limited to taste attributes, astringency, total intensity and persistence. Should the changes be related to attributes such as “mouthfulness”, “body”, “roundness”, “minerality” which are often used by professional tasters to define wine in mouth properties, or to aroma perception in mouth, they had gone undetected. Because of this, a non-verbal sensory strategy known as sorting task has been chosen this time, as this strategy provides a general assessment of the degree of similarity between samples not requiring a previous predefinition of sensory attributes.

Sorting task is a simple procedure widely employed in sensory analysis in which participants are asked to examine samples and to group them according to a similar property (odor, flavor, color, etc.). The sorting procedure is based on categorization, a cognitive process naturally used in everyday life that does not necessarily require a quantitative evaluation of the stimuli. This task has been proved to be especially well adapted for the evaluation of food products as it is rapid and produces little fatigue and boredom, although some short term memory problems can occur when a large number of products has to be evaluated [8,9]. The tests are usually followed by a brief characterization of the established groups by a few attributes in order to have a coarse description of the products. The data treatment is most often based on multidimensional scaling (MDS) and can also include the study of correlations between MDS dimensions and physicochemical and/or sensory attributes of the samples [10,11]. Despite a few differences, perceptual maps obtained from sorting tasks are globally comparable with those obtained from classical descriptive analysis [12,13] and seem to be reproducible [14,15]. This strategy has been used on a variety of beverages such as drinking water [15,16], beer [8] or wine [17,18].

The present study was designed to determine to what extent the non-volatile fraction of red wines is responsible for flavor

similarities/differences perceived in mouth. To accomplish such goal, a set of wine samples composed of 4 commercial red wines and 10 reconstituted wines containing very different non-volatile matrices but identical aroma composition, was submitted to a sorting task. Participants were asked to sort samples according to the overall flavor perceived in-mouth. The sorting task was carried out under three different evaluation conditions: (a) with no aroma perception (NA), (b) allowing retronasal aroma perception (RA), and (c) allowing both retro- and orthonasal aroma perception (ROA).

The initial working hypothesis was that volatile composition plays a primary role in global in-mouth perception and consequently that samples sharing aroma composition should be perceived as more similar in the conditions allowing aroma perception (RA and ROA) than in the nose-close (NA) condition.

2. Materials and methods

2.1. Pilot study

This first study was aimed to obtain a general picture of the grouping of samples (wines and reconstitutes) in a MDS space derived from a sensory sorting task and to compare it to the positioning of these same samples in the principal components plot derived from non-volatile quantitative data.

2.1.1. Samples

A total of 14 wine samples were employed in the present study (see Table 1). Four of the samples (numbered 1–4 in the table) were commercial red wines. The other 10 samples (numbered 5–14 in the table, samples 5 and 11 being replicates) were reconstituted wines prepared by mixing the non-volatile fraction (odorless taster fraction) of nine commercial wines presenting strong differences in astringency with the volatile aroma fraction of a single red wine (sample 1, Muga Reserva 2004). The non-volatile fractions were prepared by lyophilization and further liquid–liquid extraction, whereas the volatile extracts were prepared by solid phase extraction as described elsewhere [6] but with the following modifications. The extraction was performed with SPE cartridges (in 6 mL reservoirs) filled with 2000 mg LiChrolut EN resins that were put in an extraction unit (VAC ELUT 20 Station from Varian) and conditioned by passing slowly 20 mL of ethanol and 30 mL of a hydroalcoholic solution (12% ethanol (v/v), 5 g L⁻¹ tartaric acid, pH adjusted to 3.0 with NaOH 0.1 M). After this, 500 mL of wine were loaded. Then, a rinse step for removing apolar astringent molecules (flavonol-type molecules) was introduced. Therefore, 17.5 mL of water (pH 3) were firstly passed and then 75 mL of a solution of water/ethanol (70/30, v/v). The cartridge was then rinsed with

Table 1
The fourteen samples (four original wines and 10 reconstituted wines) employed in the experiment.

| Sample number | Sample code | Type of sample | Wine | |
|---------------|-------------|--------------------|--|----------------------------------|
| 1 | W.Mug (1) | Wine | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja | |
| 2 | W.Val (2) | Wine | Finca Valpiedra Reserva 2005, D.O. Ca Rioja | |
| 3 | W.Neo (3) | Wine | Neo Reserva 2007, D.O. Ribera del Duero | |
| 4 | W.Est (4) | Wine | Estola crianza 2005, D.O. Mancha | |
| Sample number | Sample code | Type of sample | Non-volatile fraction | Volatile fraction |
| 5 | R.Mug1 (5) | Reconstituted wine | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja |
| 6 | R.Val (6) | Reconstituted wine | Valpiedra Reserva 2005, D.O. Ca Rioja | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja |
| 7 | R.Neo (7) | Reconstituted wine | Neo Reserva 2007, D.O. Ribera del Duero | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja |
| 8 | R.Est (8) | Reconstituted wine | Estola Crianza 2005, D.O. Mancha | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja |
| 9 | R.Mon (9) | Reconstituted wine | La Montesa Reserva 2001, D.O. Ca Rioja | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja |
| 10 | R.Gan (10) | Reconstituted wine | Fincas de Ganuza Reserva 2003, D.O. Ca Rioja | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja |
| 11 | R.Mug2 (11) | Reconstituted wine | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja |
| 12 | R.San (12) | Reconstituted wine | San Róman 2005, D.O. Toro | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja |
| 13 | R.Car (13) | Reconstituted wine | Carmelo Rodero Reserva 2004, D.O. Ribera del Duero | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja |
| 14 | R.One (14) | Reconstituted wine | Les Ones 2002, D.O. Ca Priorat | Muga Reserva 2004, D.O. Ca Rioja |

16 mL of the hydroalcoholic solution and volatile compounds were finally eluted with 16 mL of ethanol using positive pressure to avoid air contact. Finally, the extract was spiked with BHA at 10 mg L^{-1} in order to avoid possible oxidations, and it was eventually stored in vials with no headspace and sealed at a temperature of -25°C until sample preparation.

The final reconstituted wines were prepared by mixing 16 mL of ethanolic volatile extract (corresponding to the volatile extract of 500 mL of wine), 100 mL of non-volatile extract (corresponding to 500 mL of wine), and 51.5 mL of ethanol and bringing the mixture to 500 mL with bottled mineral water, Solan de Cabras®. The final ethanol content of samples was 13.5 (v/v). This methodology has been shown to be very useful to provide the same aroma composition to different non-volatile wine matrices [6,7].

The whole process was performed in triplicate and the sample (500 mL) coming from each of the three reconstitutions was mixed up in order to obtain 1500 mL for each of the 10 homogenized reconstituted wines. Two out of these 10 reconstituted samples were replicates (samples 5 and 11), so they were also mixed in order to obtain identical samples and avoid an eventual bottle effect. Thus, 10 reconstituted wines (one in duplicate) were obtained containing exactly the same aroma composition, different non-volatile matrixes, and the same ethanol content (adjusted to 13.5% (v/v)). These 10 reconstituted wines, together with four of the original commercial wine samples (herein retaining their original aroma), were then subjected to both chemical and sensory analyses.

2.1.2. Chemical analyses

Conventional enological parameters of wines were determined in accordance with official OIV practices. Malic and lactic acids were determined by enzymatic methods in accordance with official AOAC analysis methods [19]. Total polyphenol index (TPI) was estimated as absorbance at 280 nm and color intensity (CI) as the sum of absorbances at 420 nm, 520 nm, and 620 nm [20]. The analysis of reducing sugars, ethanol content, pH, titratable and volatile acidities were determined by Infrared Spectrometry with Fourier Transformation (IRFT) with a WineScan™ FT 120 (FOSS®, Barcelona), which was previously calibrated with the official OIV methods. The protein precipitable proanthocyanidins (PAs) were estimated using ovalbumin as the precipitation agent and tannic acid solutions as standards in accordance with a previously described method [21]. All experiments were carried out at room temperature ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) and in triplicate.

2.1.3. Sorting task

2.1.3.1. Participants. A total of 35 experienced panelists (18 women and 17 men) aged between 24 and 56 years (mean age = 34 years) participated in the pilot study. Panelists were staff members and students from La Rioja University (Spain) and the Institute for Vine and Wine Sciences (Logroño, Spain). They were part of a wine tasting panel weekly trained in sensory descriptive analysis. They had therefore long experience in sensory analysis (at least six months), although none of them had experience in sorting task procedures.

Prior to experiments, panelists participated in two 1-h preliminary sessions, during which they become familiar with: (a) samples similar to those used in the study (pools of reconstituted wines together with commercial wines were presented). Without being aware of it, in these sessions, panelists evaluated reconstituted and regular wines and openly discussed about sample taste and aroma properties. None of them made any remark about an eventual difference in the nature of samples; (b) with the volume of sample (15 mL), and (c) with the use of a specific lid on the glasses during wine tasting that avoided orthonasal perception. During these previous sessions panelists were not able to differentiate between commercial and reconstituted wines and they could easily carry

out the in-mouth sensory evaluation of samples with the lid and with 15 mL of sample.

2.1.3.2. Sample evaluation. Each panelist participated in one 45-min session. Participants were provided with the 14 samples of the study (15 mL) in dark ISO [22] approved wine glasses coded with different three-digit numbers and arranged in random order. Participants were asked to sort the 14 wines on the basis of similarity attending to the global sensations perceived in mouth (aroma, mouth-feel, taste, intensity, persistence. . .). As a memory aid, paper and pencil were provided for their personal notes. Panelists could make as many groups as they wished. Upon completion, they recorded the three-digit codes of the samples of each group on a paper sheet.

The use of a sip and spit protocol between each sample was imposed to subjects in order to avoid sensory carry-over effects (especially astringency carry-over). Therefore, 10 s after wine was sipped, it was expectorated. Ten seconds later, apple pectin solution (1 g L^{-1}) was sipped, which was spat out after another 10 s. Between wine-rinse combinations, subjects rinsed twice with deionized water for 20 s as described by Colonna et al. [23]. All wines were served at room temperature and were evaluated in individual booths. The sessions took place in a ventilated and air-conditioned tasting room (at around 20°C). Panelists were not informed about the nature of the samples.

2.1.4. Data analysis

2.1.4.1. Chemical data. Principal component analysis (PCA) was performed on the chemical variables data set. Hierarchical cluster analysis (HCA) with the Ward criterion was then applied to the factorial coordinates of the samples in the space defined by PCA. The terms that best characterized each of the clusters were identified by using the test-value parameter [24]. Analyses were carried out with SPAD software (version 5.5, CISIA-CERESTIA, Montreuil, France).

2.1.4.2. Sorting task data. Encoding free sorting data. For each subject, results are encoded in an individual similarity matrix (wines \times wines), in which 1 stands for two wines set in the same group and 0 for two wines put in different groups. These individual matrices are summed across subjects; the resulting co-occurrence matrix represents the global similarity matrix where larger numbers indicate higher similarity between samples. The assumption underlying this method is that samples grouped together are more similar than samples sorted into different groups.

Multidimensional scaling and cluster analysis. The resulting co-occurrence matrix was submitted to an MDS analysis in order to derive a spatial representation of wines [11]. A non-parametric scaling algorithm was used (alternating least-square scaling). This procedure seeks iteratively a solution preserving the rank-order of the perceived similarities between products. The quality of fit was measured by the stress value, which is based on the sum of the squares of distances between objects observed in the raw data and objects observed in the p -dimensional MDS space. The stress varies from 0 (perfect fit) to 1 (worst possible fit), a value below 0.2 is generally considered as a good agreement between the initial and final configurations [25]. MDS analysis was performed with the software SAS/STAT version 6.0 (SAS Institute Inc., Cary, New York, USA). Coordinates of samples in the retained MDS configuration were submitted to a hierarchical cluster analysis with the Ward criterion (RECIP algorithm) by means of SPAD software (version 5.5, CISIA-CERESTIA, Montreuil, France). HCA makes it possible to check the spatial arrangement of MDS data and refine the interpretation of the map by identifying the wines that belong to a same cluster [24].

2.2. Large scale study

A second larger scale study was carried out two months after the pilot study in light of preliminary results. This second study included changes in both (a) the preparation of the extract and (b) the sensory strategy. First, we aimed to evaluate if repeating the sorting task with reconstituted wines prepared from extracts closer to original wines from a chemical viewpoint (including a correction of volatile acidity), would lead to similar results as in the pilot study. This would either confirm or contest preliminary results by an independent study performed with the same samples under the same conditions (RA evaluation). Secondly, in this new study the sorting task was made under two additional evaluation conditions in order to explore if aroma composition may modulate global in-mouth perception. A total of 30 (18 women and 12 men aged between 24 and 45 years; mean age = 30 years) from the 35 former panelists participating in the pilot study carried out the experiments.

First, examination of chemical data from reconstituted extracts employed in the pilot study brought out that the volatile acidity of such samples was at levels below 0.1 g L^{-1} as a consequence of rinsing the extract with a hydroalcoholic solution. For this reason, in the new protocol, after the elution of volatile compounds with ethanol, the eluted extract was spiked with acetic acid in order to correct the loss of this compound to final volatile acidity around 0.30 g L^{-1} . Second, we wanted to confirm preliminary results by repeating the sensory sorting task with reconstituted samples prepared from extracts whose volatile acidity had been corrected. Additionally, we wondered whether distances in the MDS map among samples sharing a common aroma would be the same or not under evaluation conditions with different levels of accessibility to aroma information for subjects. For this purpose, panelists carried out three different sorting tasks taking place at least one day apart. For all participants, each of the three sessions was devoted to perform the task, in the order presented below, exclusively under one of these conditions;

- session 1: with nasal occlusion by using nose-clips (no aroma perception available, NA)
- session 2: without nasal occlusion but avoiding orthonasal perception by using a plastic lid (like those used for take-away coffee) that covered the wine glass (only retronasal perception of odorants available, RA). This evaluation condition was equivalent to that performed during the pilot study.
- session 3: without nasal occlusion, without lid, and avoiding direct sniffing of the wine sample, thus allowing retronasal + involuntary orthonasal perception of odorants available (ROA).

Panelists were provided with the same 14 wine samples served in dark ISO [22] approved wine glasses coded with different three-digit numbers in each of the three sessions and arranged in random order. In informal tests carried out in our laboratory it was decided that 15 mL of sample was enough to perform a two-step sensory analysis (sorting task and further description of the groups made). Participants were given specific instructions not to finish the content of the wine glass when evaluating samples to perform the sorting, as a second task (unspecified in the instructions sheet) should be performed after completion of the groups.

Once the groups were established, panelists were asked to write down on a piece of paper the codes of the wines sorted in each group. With the aim to help understanding the grouping strategies followed by panelists under each condition, participants were asked to also select a few terms from a list to describe the sensory properties that better characterized the wines in each group. This

list included the following descriptors: red fruits, spicy, woody, vegetal/vegetables, animal, yellow fruits, white fruits, citrus fruits, nuts, dried fruits, undergrowth, floral and black fruits; astringent, sweet, acid, and bitter; balanced, globally intense and aromatically intense. For this additional task, participants were able to taste again the remaining content of the samples, but not to modify the groups already established.

2.2.1. Data analysis

2.2.1.1. Chemical data. PCA was calculated on the chemical variables data set as explained in the pilot study section. Additionally, simple lineal regressions were calculated with the software SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) in order to check for simple correlations between chemical variables.

2.2.1.2. Sorting task data. Multidimensional scaling. Data were submitted to an MDS and HCA following the same strategy as for the pilot study.

Analysis of vocabulary. Each panelist described each group of wines with one to two terms from the list. For each panelist, the terms given for a group of samples were associated to each wine of the group. The underlying assumption within this approach is that all the samples belonging to the same group were described by the terms in the same way. Thus, the frequency of quotation of each term was calculated and only terms cited by at least by 15% of the panel (>5 panelists) were considered.

3. Results

3.1. Pilot study

Fig. 1 shows the clustering of samples according to chemical data of non-volatile components. The cluster analysis of this data set yielded exactly the same two clusters observed in the sorting task. In both figures, Cluster 1 (*) has been highlighted by an ellipse. A test value was used in order to examine which chemical variables contribute most to the building of the clusters. According to this parameter, the first cluster (*) was significantly characterized

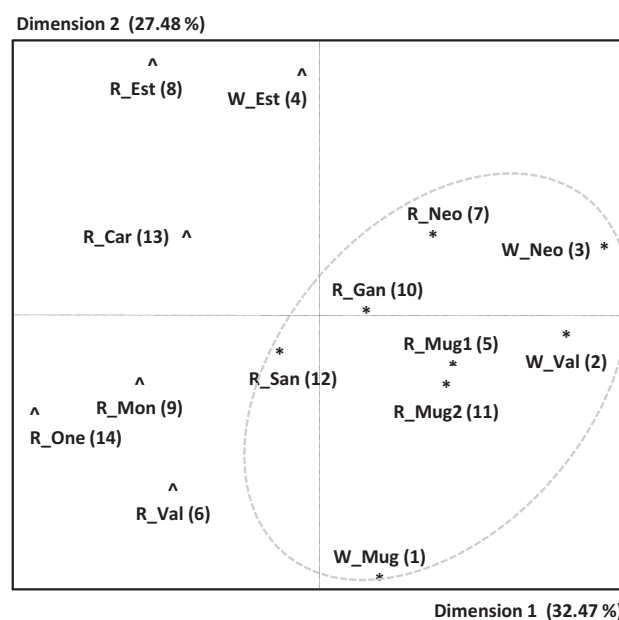


Fig. 1. Principal component analysis obtained from non-volatile data. Wines with the same icon (* or \wedge) belong to the same cluster according to HCA.

Table 2
Chemical composition of the studied wines samples.

| Wine | Reducing sugars (RS) (g L ⁻¹) | pH | Titratable acidity (TA) (g L ⁻¹) ^c | Lactic acid (LA) (g L ⁻¹) | % Alcohol content (v/v) (Et) | TPI ^a | Color intensity (CI) | Protein-precipitable (PAs) | Volatile acidity (VA) (g L ⁻¹) ^b |
|-------------|---|------|---|---------------------------------------|------------------------------|------------------|----------------------|----------------------------|---|
| W_Mug (1) | 2.84 | 3.47 | 6.35 | 1.46 | 13.9 | 77.4 | 15.8 | 0.90 | 0.49 |
| W_Val (2) | 3.00 | 3.50 | 5.10 | 1.63 | 14.1 | 73.7 | 12.3 | 0.83 | 0.58 |
| W_Neo (3) | 1.72 | 3.77 | 5.19 | 1.82 | 13.5 | 73.8 | 13.1 | 0.99 | 0.55 |
| W_Est (4) | 3.40 | 3.59 | 5.20 | 1.38 | 12.3 | 50.6 | 7.30 | 0.43 | 0.61 |
| R_Mug1 (5) | 3.10 | 3.57 | 5.94 | 1.48 | 13.5 | 83.5 | 16.5 | 1.01 | 0.29 |
| R_Val (6) | 1.13 | 3.43 | 4.55 | 1.62 | 13.5 | 69.4 | 11.8 | 0.78 | 0.25 |
| R_Neo (7) | 1.80 | 3.89 | 5.19 | 1.77 | 13.5 | 80.2 | 12.6 | 1.11 | 0.37 |
| R_Est (8) | 3.44 | 3.70 | 4.68 | 1.30 | 13.5 | 49.3 | 8.3 | 0.48 | 0.41 |
| R_Mon (9) | 1.45 | 3.51 | 4.96 | 0.68 | 13.5 | 55.5 | 8.0 | 0.34 | 0.23 |
| R_Gan (10) | 2.30 | 3.41 | 5.42 | 0.80 | 13.5 | 65.6 | 11.6 | 0.59 | 0.29 |
| R_Mug2 (11) | 3.10 | 3.57 | 5.84 | 1.48 | 13.5 | 83.5 | 16.5 | 1.01 | 0.29 |
| R_San (12) | 1.82 | 3.55 | 4.19 | 0.62 | 13.5 | 65.9 | 10.6 | 1.09 | 0.28 |
| R_Car (13) | 3.23 | 3.67 | 5.16 | 1.11 | 13.5 | 67.7 | 13.2 | 0.92 | 0.36 |
| R_One (14) | 1.61 | 3.39 | 5.43 | 0.39 | 13.5 | 57.3 | 9.4 | 0.85 | 0.24 |

^a Total polyphenol index.

^b Expressed as grams of acetic acid per liter.

^c Expressed as grams of tartaric acid per liter.

($P < 0.001$) by high Total phenolic content (TPI) and color intensity. For wines belonging to this cluster, a significant correlation ($P < 0.05$) among TPI and the protein precipitable (PAs) content was also observed. This last parameter has been found in a wide range of works to be significantly correlated to the sensory astringency perceived in red wines [21,26].

The similarity matrix obtained from the sensory sorting task resulted in the MDS representation shown in Fig. 2. Two dimensions were retained giving rise to a stress value acceptably low [25] (< 0.05). According to cluster analysis, panelists recognized two main groups: Cluster 1 (sample code: *), formed by eight samples (R_San, R_Neo, R_Gan, R_Mug1, R_Mug2, W_Val, W_Neo and W_Mug) and Cluster 2 (sample code: ^) formed by six samples (R_Est, W_Est, R_Car, R_Mon, R_Val and R_One). Two first important observations must be made: (a) samples sharing a common volatile composition are not clustered in the same group; and (b) the clusters are in both

cases exactly the same. Both observations suggest that aroma is not a criterion used by participants to sort the wines.

3.2. Large scale study

3.2.1. Chemical analysis

Non-volatile composition of the studied wine samples is presented in Table 2. Reducing sugar contents were typical of dry wines and ranged from 1.1 to 3.4 g L⁻¹. The pH values (average = 3.6), and the titratable acidity (average = 5.2 g L⁻¹) were in all samples relatively high and low, respectively, since original wines were mainly elaborated with the cultivar Tempranillo (>70% in all cases). The ethanol content of the four original wines ranged from 14.1% to 12.3% (v/v) presenting W_Mug and W_Est the highest (14.1%) and lowest (12.3%) levels of alcohol, respectively, while all reconstituted samples contained 13.5% (v/v) of ethanol. As for the phenolic composition it is important to note that TPI was significantly correlated to both color index ($F = 13.006$; $P = 0.004$) and protein-precipitable PAs ($F = 20.586$; $P = 0.001$). Concerning volatile acidity, all wine extracts employed for reconstitution purposes were spiked with identical acetic acid contents (average concentration of 0.30 mg L⁻¹) to obtain wine models with an acetic content closer to commercial wine samples. In order to check that the addition of external acetic acid did not evoke any strange sensory nuance, we performed a triangle test confronting a reconstituted Muga vs. a reconstituted Muga spiked with 0.30 mg L⁻¹ of this compound. Results (4 correct answers from 15 responses; no significant) indicated that the correction of volatile acidity in reconstituted samples did not introduce any relevant change from a sensory viewpoint.

In order to verify that major differences between the original and their corresponding reconstituted wines with respect to the global non-volatile composition did not exist, a PCA followed by cluster analysis was calculated on the 14 samples and the chemical variables (Fig. 3). In general, non-volatile composition was kept in the reconstituted wines with regard to the studied parameters, since three out of the four pairs of reconstituted-original wine samples are plotted together in the dendrogram derived from cluster analysis (highlighted with a dotted line in the figure), except for R_Val that is situated far apart from W_Val as can be seen in Fig. 3. This fact could be attributed to a loss of non-volatile material during the reconstitution process, possibly due to sugar, salt and polyphenol precipitations. As can be seen in Table 2, R_Val presents lower

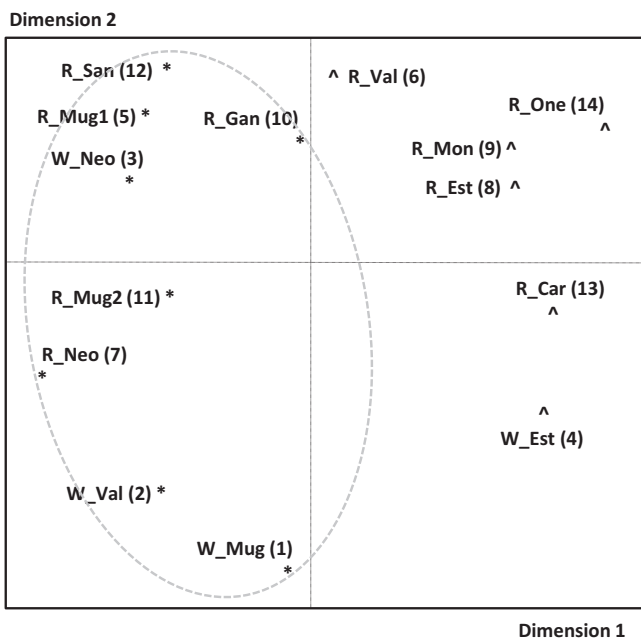


Fig. 2. MDS plane obtained from the sorting task in the pilot study. Wines with the same icon (* or ^) belong to the same cluster according to HCA.

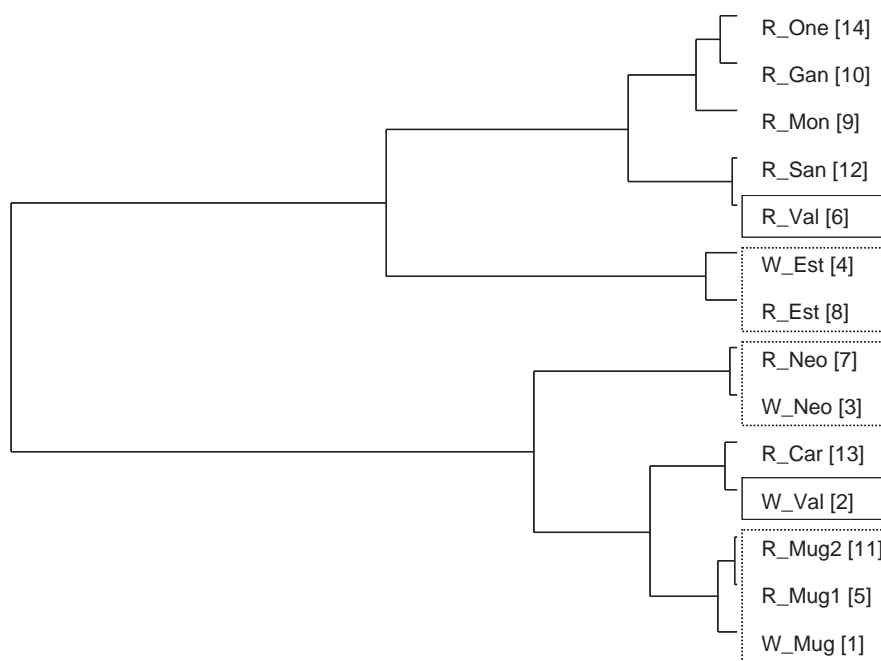


Fig. 3. Clusters yielded from PCA–HCA calculated on the eight chemical parameters measured in the 14 wine samples.

contents in all the measured variables than its corresponding original wine, W_Val.

3.2.2. Sorting task analysis

In the three conditions (NA, RA and ROA) three dimensions were required to reach stress values below 0.2, which is indicative of a good fit to the similarity data [25]. The plots are given in Fig. 4a–c. The overall panel reproducibility was explored using the relative positions of the duplicate pair in the MDS charts. Cluster analysis derived from the MDS coordinates of samples revealed that duplicate samples (R_Mug1 and R_Mug2) were clustered together under the three conditions (data not shown). However, duplicates were much closer in the NA, than in the RA or ROA conditions (see Fig. 4a–c), which indicates that the panel was less reproducible in these situations.

It is important to note that the number of times that the two replicates were sorted together was higher in the NA condition (9 times, 30% of panelists) than in the RA and ROA conditions, with 5 and 6 times, respectively. These last values are in fact below the chance level, which suggests that subjects find more difficulties in identifying these samples as equivalent in the two conditions in which aroma can be perceived.

In an attempt to understand the strategy followed by the panel in the sorting task, wine coordinates in the 3-D MDS plot for each condition were correlated to both non-volatile composition (Table 2) and verbal descriptions given by subjects after the sorting task (Table 3). Results of the correlation study are summarized in Table 4. As can be seen, there is an important association ($P \leq 0.01$) between Dimension 1 and “sensory astringency” in the three conditions. Similarly, the first dimension in the three conditions is always significantly correlated to the content in “protein-precipitable PAs” ($P < 0.05$). According to these results it seems that the main factor driving the classification—independently of the evaluation condition—is the perception of astringency, which depends directly on the protein precipitable PAs content. This observation is in agreement with results from the pilot study (see Figs. 1 and 2).

In the case of the NA condition, the first dimension is also slightly correlated to both, reducing sugar content and to sweetness perception. The second dimension is correlated to volatile acidity and

the third dimension to the perception of sensory bitterness. This means that most of the latent information retained in the 3-D MDS configuration of the NA condition can be explained in terms of the perception of the basic taste descriptors astringency, sweetness and bitterness. On the contrary, in both open-nose conditions (RA and ROA) none of the verbal descriptions provided by the panel were significantly correlated to the second or third dimension.

4. Discussion

If our initial working hypothesis was true, reconstituted samples which share a common aroma should be grouped together in the MDS plots of all the studies in which aroma perception was accessible. Results from the preliminary study (pilot study) certainly suggest that this is not the case, as the clustering of wines according to the non-volatile chemical composition (Fig. 1) and to the sorting task (Fig. 2) are actually equivalent. Correlation data confirmed that panelists sorted samples according to sensory parameters mainly related to the perception of astringency such as protein precipitable PAs. The larger scale experiment mostly confirms those previous results using a similar strategy (the RA condition), but with samples in which volatile acidity had been corrected.

Such large scale experiment should provide additional clues about the role of aroma perception on the in-mouth sensory properties. In particular, if the initial working hypothesis held true, we should expect an increasing grouping effect due to the communality of aroma when passing from NA condition (no aroma perception, no grouping effect) to RA condition (retronasal only aroma perception, grouping effect) and to ROA condition (ortho and retronasal aroma perception, strongest grouping effect). Experimental results derived from MDS and cluster analysis, however, clearly indicate that these requirements are not fulfilled, as differences among reconstituted samples are not minimized in the RA or in the ROA conditions. In fact, what is observed is rather the opposite: the addition of the same aroma composition to different non-volatile fractions is making samples to be perceived as even more different among them. This fact can be firstly confirmed because reconstituted wines are grouped together a significant ($F=2.43$; $P=0.092$) lower number of times under the ROA condition (average

Table 3
Common descriptor choices (number of subjects: citation frequency, CF) cited by more than 15% of the panel.

| Sample | No aroma perception (NA) | Retronasal aroma perception (RA) | Retro- and orthonasal perception (ROA) |
|--------|---|---|---|
| W_Mug | 12 astringent, 11 sour, 9 bitter | 16 astringent, 9 sour, | 13 sour, 11 astringent, 5 bitter |
| W_Val | 8 sour, 7 astringent, 6 sweet, 5 bitter | 7 red-black fruit, 6 bitter, 6 sour | 9 sour, 9 bitter, 6 red-black fruit, 6 astringent |
| W_Neo | 17 astringent, 10 bitter, 7 sour | 21 astringent, 6 sour, 6 woody, 5 bitter, 5 red-black fruit | 10 sour, 8 astringent, 7 bitter, 5 sweet, 5 red-black fruit |
| W_Est | 10 astringent, 8 sour, 7 bitter, 7 sweet | 9 astringent, 8 sour, 5 bitter, 5 sweet | 8 sour, 5 astringent, 5 bitter, 5 balance |
| R_Mug1 | 14 astringent, 12 sour, 6 bitter, 5 sweet | 21 astringent, 6 sour, 6 bitter, 5 woody | 14 astringent, 12 sour, 5 bitter |
| R_Val | 14 sour, 9 astringent, 6 bitter | 11 astringent, 6 sour, 6 bitter | 11 sour, 8 bitter, 6 astringent |
| R_Neo | 16 astringent, 9 sour, 6 bitter | 18 astringent, 8 bitter, 6 red-black fruit | 15 astringent, 7 sour |
| R_Est | 12 astringent, 9 sour, 9 bitter, 5 sweet | 9 astringent, 7 bitter, 5 woody | 7 astringent, 6 bitter, 6 sour, 5 woody |
| R_Mon | 10 astringent, 7 sour, 6 bitter, 5 sweet | 6 sour, 6 astringent, 5 woody | 8 sour, 8 astringent, 5 bitter, 5 woody |
| R_Gan | 13 sour, 10 astringent, 7 bitter | 12 astringent, 8 bitter, 6 sour | 14 astringent, 7 sour, 6 bitter |
| R_Mug2 | 20 astringent, 9 sour, 8 bitter | 13 astringent, 7 sour, 7 bitter | 15 astringent, 10 sour, |
| R_San | 17, astringent, 7 sour, 7 bitter | 24 astringent, 9 bitter | 19 astringent, 5 persistence |
| R_Car | 12 bitter, 10 astringent, 8 sour, 8 sweet | 15 astringent, 7 bitter | 13 astringent, 6 woody, 5 sour |
| R_One | 14 astringent, 12 sour, 8 bitter | 14 astringent, 8 sour, 8 bitter | 9 sour, 9 bitter, 8 astringent, 7 red-black fruit |

Table 4
Significant correlations ($P < 0.1$) between both sensory and chemical variables and MDS-coordinates in Dimensions 1, 2 and 3 (ns: not significant).

| Variable | Dimension 1 | | | Dimension 2 | | | Dimension 3 | | |
|--------------------------|-------------|-------|-------|-------------|----|-----|-------------|-------|-------|
| | NA | RA | ROA | NA | RA | ROA | NA | RA | ROA |
| Protein precipitable PAs | <0.001 | 0.002 | 0.002 | ns | ns | ns | ns | 0.084 | ns |
| Reducing sugars | 0.099 | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | 0.063 |
| Volatile acidity | ns | 0.091 | ns | 0.025 | ns | ns | ns | ns | ns |
| Lactic acid | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | 0.015 | ns |
| Titrateable acidity | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | 0.067 | ns |
| Sensory sweetness | 0.073 | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns | ns |
| Sensory bitterness | ns | ns | ns | ns | ns | ns | 0.039 | ns | ns |
| Sensory astringency | 0.01 | 0.002 | 0.001 | ns | ns | ns | ns | ns | ns |

number of panelists having grouped together two pairs of reconstituted samples = 5.8 times) than under the NA and ROA conditions (average = 6.7 times in both conditions). The number of clusters (figures not shown) yielded by HCA under the different conditions increases from two in the NA case to four in the ROA. Moreover, the reconstituted wines in this last condition were classified more separately. A potential clue to understand these bizarre results comes from the fact that the panel is finding increasing difficulty to correctly group the duplicate samples (R_Mug1 and R_Mug2) in the RA and ROA conditions. Two plausible explanations can be put forwards. The first is that panelists have problems to deal with a more complex amount of sensory information as they receive both olfactory and gustatory information. Such difficulty would be higher in the ROA condition, in which olfactory receptors are activated at two different time spans (corresponding to the ortho and retronasal perceptions), which would lead to an increased level of cross-modal interactions [27]. A second possibility could originate on the higher difficulty linked to the task of sorting samples most of which have a common aroma composition. Such difficulty would be higher if aroma has actually an active role on in-mouth perception.

It could be argued that our results may be biased by other effects related to the sensory methodology. As session 1 (NA) was exclusively directed toward palate features, participants could have unconsciously learnt and focus on such palate emphasis under the other conditions, neglecting somehow retronasal aspects. Another potential limitation would be linked to the forced “sip & spit” protocol that could also make participants to excessively focus on palate sensations, which helps explaining the low number of aromatic descriptors given in Table 3. Thirdly, it is possible that 15 mL of sample was a small volume for panelists to provide with concrete aroma descriptors, thus it would be feasible that a repeat sampling could have resulted in an increase in use of aromatic descriptors by participants. However, the fact that the pilot study, in which only one condition was tested, led to similar conclusions, as well as the agreement with the results from the previous report [6] in which the forced “sip & spit” procedure was not used, and the null

communality effect observed by samples sharing aroma composition, make us think that such potential biases are not altering the general nature of results. In-mouth sensory properties are primarily driven by non-volatile composition. However, the no existence of correlation between sweetness and bitterness with the dimensions of the MDS spaces of RA and ROA conditions (Table 4), indicates that aroma perception is exerting a significant, albeit non predominant, role on the in-mouth sensory perception.

An additional way to further explore the effect of aroma composition is to look at the Euclidean distance between the wine and the corresponding reconstituted wine sample on the MDS space for each of the pairs W_Val/R_Val; W_Est/R_Est; and W_Neo/R_Neo as they contain the same non-volatile matrix but different aroma composition. In case that aroma exerts a null role on in mouth sensory properties, the perceived dissimilarity within each pair should remain constant among conditions. These distance data are summarized in Table 5 and show different trends. The Est pair, the least astringent and poorest in PAs, shows a consistent increase of the dissimilarity with increasing aroma perception, which suggests that aroma is exerting an effective role on in mouth sensory properties in this case. In the Neo pair, the most astringent and richest in PAs, no increase is observed from NA to RA, but a strong increase is again noted from RA (or NA) to ROA, which suggests that aroma is exerting an effect but only when orthonasal perception may take place (ROA). This is fully consistent with the descriptions

Table 5
Euclidean distances among original (W) and reconstituted (R) wine pairs in the MDS space for the three evaluation conditions (NA, RA and ROA).

| Pair | NA | RA | ROA |
|--------------------|------|------|------|
| W_Val/R_Val | 2.77 | 3.79 | 1.21 |
| W_Neo/R_Neo | 1.92 | 1.51 | 2.24 |
| W_Est/R_Est | 0.7 | 1.49 | 2.13 |
| Average distance | 1.80 | 2.26 | 1.86 |
| Standard deviation | 1.04 | 1.32 | 0.57 |

Acknowledgments

The research was funded by *Instituto de Estudios Riojano, Consejería de Educación Cultura y Deportes del Gobierno de La Rioja* (FOMENTA 2008/07 project) and MYCYT/FEDER (projects AGL2010-22355-C02-01 and AGL2010-22355-C02-02). MPSN and JMA acknowledge University of La Rioja and Navarra Government, respectively, for their F.P.I. research scholarships. E.C. acknowledges MICINN for Juan de la Cierva Program funding.

References

- [1] R.J. Stevenson, *Chemical Senses* 35 (2010) 3.
- [2] A. Welge-Lussen, J. Drago, M. Wolfensberger, T. Hummel, *Brain Research* 1038 (2005) 69.
- [3] P.R. Jones, R. Gawel, I.L. Francis, E.J. Waters, *Food Quality and Preference* 19 (2008) 596.
- [4] A.L. Robinson, S.E. Ebeler, H. Heymann, P.K. Boss, P.S. Solomon, R.D. Trengove, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57 (2009) 10313.
- [5] M.R. Bajec, G.J. Pickering, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48 (2008) 858.
- [6] M.P. Saenz-Navajas, E. Campo, P. Fernandez-Zurbano, D. Valentin, V. Ferreira, *Food Chemistry* 121 (2010) 1139.
- [7] M.P. Saenz-Navajas, E. Campo, L. Cullere, P. Fernandez-Zurbano, D. Valentin, V. Ferreira, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010) 5574.
- [8] S. Chollet, M. Lelievre, H. Abdi, D. Valentin, *Food Quality and Preference* 22 (2011) 507.
- [9] B. Patris, V. Gufoni, S. Chollet, D. Valentin, *Impact of Training on Strategies to Realize a Beer Sorting Task: Behavioral and Verbal Assessments, Vietnam National University-Ho Chi Minh City Publishing House, Ho Chi Minh (Vietnam), 2007.*
- [10] J.B. Kruskal, M. Wish, *Multidimensional Scaling*, Sage Publications, Beverly Hills and London, 1978.
- [11] S.S. Schiffmann, M.L. Reynolds, F.W. Young, *Introduction to Multidimensional Scaling: Theory, Methods and Applications*, New York, Academic Press, 1981.
- [12] P. Faye, D. Bremaud, M.D. Daubin, P. Courcoux, A. Giboreau, H. Nicod, *Food Quality and Preference* 15 (2004) 781.
- [13] A. Saint-Eve, E.P. Kora, N. Martin, *Food Quality and Preference* 15 (2004) 655.
- [14] R. Cartier, A. Rytz, A. Lecomte, F. Poblete, J. Krystlik, E. Belin, N. Martin, *Food Quality and Preference* 17 (2006) 562.
- [15] M. Falahee, A.W. MacRae, *Food Quality and Preference* 8 (1997) 389.
- [16] M. Falahee, A.W. MacRae, *Food Quality and Preference* 6 (1995) 327.
- [17] E. Campo, J. Cacho, V. Ferreira, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (2008) 2477.
- [18] W.V. Parr, D. Valentin, J.A. Green, C. Dacremont, *Food Quality and Preference* 21 (2010) 56.
- [19] AOAC, *Official Methods of Analysis*, 2002.
- [20] P. Ribereau-Gayon, *Chimie Analytique* 52 (1970) 627.
- [21] M.C. Llaudy, R. Canals, J.M. Canals, N. Rozes, L. Arola, F. Zamora, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (2004) 742.
- [22] ISO NORM, 3591, *Sensory analysis: Apparatus wine tasting glass*, International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 1977.
- [23] A.E. Colonna, D.O. Adams, A.C. Noble, *Australian Journal of Grape and Wine Research* 10 (2004) 26.
- [24] L. Lebart, A. Morineau, M. Piron, *Statistique exploratoire multidimensionnelle*, Dunod, Paris, 1995, pp. 177-184.
- [25] T.F. Cox, M.A.A. Cox, *Multidimensional Scaling*, Chapman and Hall, 2001.
- [26] M.P. Saenz-Navajas, Y.S. Tao, M. Dizy, V. Ferreira, P. Fernandez-Zurbano, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58 (2010) 12407.
- [27] J.H.F. Bult, R.A. de Wijk, T. Hummel, *Neuroscience Letters* 411 (2007) 6.



Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines

María-Pilar Sáenz-Navajas^{a,b}, José-Miguel Avizcuri^a, Vicente Ferreira^b, Purificación Fernández-Zurbano^{a,*}

^a Department of Chemistry, University of La Rioja, Institute for Wine and Vine Research (ICVV: UR-CSIC-GR), Madre de Dios 51, 26006 Logroño, La Rioja, Spain

^b Laboratory for Analysis and Enology, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Zaragoza, 50009 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 October 2011

Received in revised form 24 January 2012

Accepted 14 March 2012

Available online 28 March 2012

Keywords:

Sensory analysis

Non-volatile

Wine

Astringency

Taste

Polyphenols

Antagonism

ABSTRACT

The main goal of the present study is to provide an insight on the role played by non-volatile molecules on the different in-mouth attributes, particularly astringency. For achieving such goal, the main in-mouth sensory attributes of 34 oaked Spanish red wines were measured by a trained panel. The wine content in 30 sensory-active molecules was analysed by different HPLC based methodologies together with classical enological parameters and two proanthocyanidin indexes. Fourteen compounds (aconitic acids, polymeric proanthocyanidins, caftaric, caffeic and coumaric acids and seven quercetins) were found to be at concentrations above reported taste thresholds and to have a reasonably high range of occurrence. Two highly statistically significant models for astringency were built with those compounds. Even if the models could not be fully validated by sensory addition experiments, the research has demonstrated that wine astringency is driven by polymeric proanthocyanidins and by certain phenolic acids, the *trans/cis*-aconitic acid and flavonol profiles. The research has highlighted the existence of extremely complex interactions between non-volatile compounds on the in-mouth sensory perception. Particularly remarkable is the lack of additivity and potential antagonism found between the pairs *cis/trans*-aconitic acids, between aconitic and caffeic acids and between quercetin-3-*O*-galactoside and quercetin-3-*O*-glucoside. Also remarkable was the sweetness \times astringent interaction and the matrix-dependence of the sensory responses elicited by flavonols. These results suggest the need for new paradigms and experimental procedures for fully decoding the real sensory relevance of individual non-volatile compounds in the overall wine flavour.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Wine consumption has mostly a hedonic objective, which implies that wine organoleptic properties play an outstanding role on wine quality perception. This fact increases the interest in finding the key chemical molecules responsible for the alluring sensory properties of wines (Blackman, Rutledge, Tesic, Saliba, & Scollary, 2010; Ferreira, San Juan, & Escudero, 2009; Ferrer-Gallego, Garcia-Marino, Hernandez-Hierro, Rivas-Gonzalo, & Escribano-Bailon, 2010; Parpinello, Versari, Chinnici, & Galassi, 2009; Rodriguez-Nogales, Fernandez-Fernandez, & Vila-Crespo, 2009).

The importance of both volatile and non-volatile molecules in wine sensory properties has been especially demonstrated in works dealing with sensory interactions. These studies have shown that sensory properties of wine are the result of perceptual interactions between sense modalities and/or interactions between wine molecules, that can impact the odorant volatility, flavour release, and overall perceived flavour intensity and wine quality (Polásková, Herszage, & Ebeler, 2008; Sáenz-Navajas, Campo,

Culleré, et al., 2010; Sáenz-Navajas, Campo, Fernández-Zurbano, Valentin, & Ferreira, 2010). At present, a great amount of works dealing with aroma compounds and their implication in wine sensory perceptions have been published, thus the work in this field is quite advanced (Campo, Ferreira, Escudero, Marques, & Cacho, 2006; Escudero, Campo, Farina, Cacho, & Ferreira, 2007; Ferreira et al., 2009). There are also a wide range of investigations performed with the aim of looking for non-volatile compounds with sensory properties (Blackman et al., 2010; Vidal, Courcoux, et al., 2004; Vidal, Francis, et al., 2004). However, the real contribution of these non-volatile molecules to the global sensory properties of wines is still far from being clear.

Among non-volatile molecules, phenolic compounds with high molecular weight have been repeatedly described to play a very important role in the overall quality of red wine, especially those eliciting astringency. This could be explained by the fact that this mouth-feel attribute has been linked to quality judgements of wine experts (Buratti, Ballabio, Benedetti, & Cosio, 2007; Lattey, Bramley, & Francis, 2010; Sáenz-Navajas, Martín-López, Ferreira, & Fernández-Zurbano, 2011; Varela & Gambaro, 2006). Most works dealing with quantitative chemical data point out that proanthocyanidins (polymerised flavanols) could be the main contributors to

* Corresponding author. Tel.: +34 941299662; fax: +34 94199621.

E-mail address: puri.fernandez@unirioja.es (P. Fernández-Zurbano).

perceived astringency in wine due to their ability to precipitate salivary proteins (Fernandez, Kennedy, & Agosin, 2007; Fontoin, Saucier, Teissedre, & Glories, 2008; Kallithraka, Bakker, Clifford, & Vallis, 2001; Kennedy, Ferrier, Harbertson, & Gachons, 2006; Llaudy et al., 2004; Vidal et al., 2003). However, there are investigations (Ishikawa & Noble, 1995; Sáenz-Navajas, Ferreira, Dizy, & Fernández-Zurbano, 2010; Sáenz-Navajas, Tao, Dizy, Ferreira, & Fernández-Zurbano, 2010) showing that neither the analyzed proanthocyanidin content nor the chemical methods developed for measuring astringency by protein precipitation (Kennedy et al., 2006; Llaudy et al., 2004) are enough for explaining the different perceived astringency in wines. This fact has been attributed to the ability of smaller compounds to form complexes with salivary proteins but not to precipitate (de Freitas & Mateus, 2001; Kallithraka et al., 2001) what leads to a reduced lubrication and increased friction caused by particles, either resulting from precipitation of salivary protein or from flocculation. In this context, a number of studies support the hypothesis that astringency arises from rupture of the lubricating saliva film that lines the oral cavity (de Wijk & Prinz, 2005; Prinz & Lucas, 2000), rather than from a mere precipitation of salivary proteins. These works are in accordance with recent research that demonstrated the potential implication of non-volatile molecules with low molecular weight in the astringency of red wines (Hufnagel & Hofmann, 2008a, 2008b; Sáenz-Navajas, Ferreira, et al., 2010; Sáenz-Navajas, Tao, et al., 2010).

Being aware of the importance of gaining knowledge about the real impact of non-volatile molecules on the in-mouth sensory properties of wines in order to provide further insights into wine sensory perception, the main aim of the present work is to measure the influence of certain non-volatile compounds on in-mouth perception, especially in astringency, by means of quantitative data. More specifically, the concrete aims of this work are firstly to study correlations between in-mouth sensory properties and non-volatile composition and then to evaluate the real sensory impact of non-volatile compounds in red wine samples. To accomplish such goal, a set of 34 oaked Spanish red wines were submitted to in-mouth sensory descriptive analysis by a trained panel. In addition, sensory-active molecules were identified and quantified by HPLC-DAD-MS and UV-Vis methodologies and conventional oenological parameters were also determined in the same set of samples. The potential implication of the analysed non-volatile molecules in the in-mouth sensory properties was investigated by means of statistical tools and further confirmed with sensory analysis by spiking real wine samples.

2. Materials and methods

2.1. Wine samples

Thirty-four Spanish aged red wines from 13 different Spanish Denominations of Origin have been evaluated. The detailed list of samples, including sample information and basic compositional data obtained following standard operating procedures, is shown in Table 1.

All wines were aged in oak barrels and their price ranged from 6 to 14 euros/bottle in the Spanish market. They were selected on the basis of sales records to obtain a random sample representative of the Spanish high-standard red wine market.

2.2. Descriptive sensory analysis by a trained panel

A total of 35 students or staff members from the University of La Rioja (Spain) were recruited on the basis of their interest and their

availability during 20 weeks (one 60-min session per week). They were not paid for their participation.

Panellists attended 16 1-h descriptive sensory training sessions over a period of four months, during which panellists worked in subgroups and were trained in in-mouth properties (sweetness, acidity, bitterness, astringency, global intensity and persistence). During training, different reference standards representative of taste and astringency terms were presented. Therefore, solutions containing different concentrations of table sugar (0–12 g l⁻¹) for sweetness, tartaric acid (0–1.5 g l⁻¹) for acidity, quinine sulphate (0–10 mg l⁻¹) for bitterness and potassium and aluminium sulphate (0–5 g l⁻¹) for astringency stimuli were presented to the panel to aid with recognition, and discrimination between the different oral sensations.

For the selection of panellists, the participants were provided with six solutions containing the four stimuli (sweetness, acidity, bitterness, and astringency) in random order (two of them were presented in duplicate) and instructed to identify sensations. Only panellists that correctly identified all attributes were kept for the study. According to this criterion and to attendance reasons, the sensory data provided by 28 panellists (9 males and 19 females from 21 to 62 years old, average age 29) were considered in the study.

Trained panellists attended four formal sessions for the characterization of the 34 wine samples. In each formal session, one sample in duplicate was presented to monitor panel reproducibility. The number of samples presented in each session ranged between nine and ten. Ten milliliters wine samples were presented in dark (ISO NORM 3591, 1977) approved wineglasses labelled with 3-digit random codes and covered by plastic Petri dishes according to a random arrangement. Panellists were asked to rate sweetness, acidity, bitterness, and astringency on a 10-point scale (0 = “absence”, 1 = “very low” and 9 = “very high”). In-mouth global intensity and global persistence were measured on a 9-point scale (1 = “very low” and 9 = “very high”) since for these last concepts the 0 has no meaning. Trained panellists rated samples using a sip and spit protocol as described elsewhere (Colonna, Adams, & Noble, 2004).

All wines were served at room temperature and evaluated in individual booths. Panellists were not informed about the nature of the samples to evaluate.

2.3. Chemical analysis

2.3.1. Reagents

All chemicals used were of analytical reagent grade. All chromatographic solvents were of HPLC grade. Ultrapure water was obtained from a Milli-Q purification system (Millipore, Molsheim, France). TSK Toyopearl gel HW-50F was purchased from Tosohaas (Montgomery-ville, PA, USA), and methanol, formic acid, ethanol, acetonitrile and sulphuric acid from Scharlab. Quinine sulphate dihydrate (98%) was obtained from Alfa Aesor. Potassium and aluminium sulphate and tannic acid were purchased from Panreac. Ovalbumin (V-grade), L-tartaric acid, catechin, epicatechin, trans-aconitic acid, cis-aconitic acid, myricetin, kaempferol, vanillin, protocatechuic acid ethyl ester, protocatechuic acid, gallic acid, caffeic acid, and quercetin were purchased from Sigma-Aldrich. Quercetin-3-O-glucoside, quercetin-3-O-galactoside, quercetin-3-O-glucuronide, kaempferol-3-O-glucoside, isorhamnetin-3-O-glucoside, myricetin-3-O-glucoside, myricetin, kaempferol, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate, epigallocatechin, procyanidins B1 and B2, ferulic and p-coumaric acids were provided from Extrasynthèse. Vanillic acid and trifluoroacetic acid (TFA) were supplied by Fluka.

2.3.2. Analysis of non-volatile composition by GPC-HPLC-DAD-MS

This analysis was carried out using the method described elsewhere (Sáenz-Navajas, Tao, et al., 2010). In accordance with the

Table 1
Wine properties including origin, vintage year, varietal composition, oak aging time, pH, volatile acidity (VA), titratable acidity (TA), lactic acid and alcohol content, total polyphenol index (TPI), colour intensity (CI) and hue or tonality (T).

| Wine | Denomination of origin | Vintage year | Grape variety | Oak aging (months) | pH | VA ^a (g l ⁻¹) | TA ^b (g l ⁻¹) | RS (g l ⁻¹) | Lactic acid (g l ⁻¹) | Alcohol content (v/v) | TPI ^c (a.u.) | CI ^c (a.u.) | T |
|--------------------------------|--------------------------|--------------|--|--------------------|------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|----------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|------|
| Martue Syrah | Tierra de Castilla | 2006 | Syrah | 12 | 3.82 | 0.67 | 6.84 | 3.25 | 2.70 | 15.72 | 75.33 | 17.23 | 0.50 |
| Cumal | Tierra de Castilla | 2005 | Prieto Picudo | 15 | 3.41 | 0.50 | 5.54 | 1.52 | 0.78 | 14.36 | 60.08 | 10.96 | 0.88 |
| Ilurce Vendimia Seleccionada | D.O.Ca.Rioja | 2005 | Grenache (60%), Tempranillo (40%) | 12 | 3.49 | 0.58 | 6.06 | 2.11 | 0.69 | 14.03 | 56.48 | 10.49 | 0.86 |
| Viña Sastre | D.O.Ribera Del Duero | 2005 | Tinta del Pais | 14 | 3.67 | 0.51 | 5.10 | 1.89 | 1.18 | 14.86 | 67.40 | 11.82 | 1.00 |
| Santa Cruz de Artazu | D.O.Navarra | 2005 | Grenache | 12 | 3.39 | 0.53 | 5.95 | 1.88 | 0.46 | 16.17 | 66.60 | 10.37 | 0.81 |
| Sierra Cantabria, Cepas Viejas | D.O.Rioja | 2004 | Tempranillo | 18 | 3.54 | 0.60 | 5.51 | 1.72 | 1.32 | 13.03 | 52.00 | 9.25 | 0.84 |
| Mestizaje Bobal | D.O.Utiel-Requena | 2006 | Babal (50%), others (Grenache, Syrah, Merlot, Cabernet, Tempranillo) | 8 | 3.63 | 0.43 | 5.33 | 1.92 | 0.69 | 15.07 | 66.15 | 11.77 | 1.00 |
| Coto de Hayas | D.O.Borja | 2007 | Grenache | 3 | 3.42 | 0.31 | 6.14 | 3.10 | 0.46 | 13.98 | 55.02 | 10.15 | 0.79 |
| Pago de los Capellanes | D.O.Ribera Del Duero | 2007 | Tempranillo (80%), Cabernet Sauvignon (10%), Merlot (10%) | 5 | 3.63 | 0.48 | 5.42 | 1.92 | 1.98 | 13.43 | 50.17 | 9.60 | 0.71 |
| Arzuaga | D.O.Ribera Del Duero | 2005 | Tempranillo (90%), Cabernet (5%), Merlot (5%) | 16 | 3.60 | 0.55 | 5.53 | 1.71 | 1.54 | 13.71 | 59.59 | 10.61 | 0.86 |
| Cruz de Piedra | D.O.Calatayud | 2006 | Grenache | 13 | 3.39 | 0.50 | 6.66 | 3.39 | 0.81 | 14.83 | 62.73 | 10.78 | 0.88 |
| Rivola, Abadía Retuerta | Tierra de Castilla | 2006 | Tempranillo, Cabernet Sauvignon | 12 | 3.63 | 0.58 | 5.46 | 1.27 | 1.23 | 13.89 | 52.33 | 9.91 | 0.78 |
| Badacel | D.O.Ca.Priorat | 2005 | Syrah | 10 | 3.32 | 0.47 | 6.06 | 1.66 | 0.52 | 14.24 | 53.51 | 10.08 | 0.77 |
| Castañe Cepas Viejas | D.O.Yecla | 2004 | Monastrell, Cabernet Sauvignon | 14 | 3.72 | 0.69 | 5.14 | 1.76 | 1.40 | 14.96 | 66.66 | 11.39 | 1.00 |
| Remelluri | D.O.Ca.Rioja | 2003 | Tempranillo, Grenache, Graciano | 22 | 3.58 | 0.48 | 4.84 | 1.96 | 0.99 | 13.83 | 59.08 | 9.04 | 0.87 |
| Puerto salinas | D.O.Alicante | 2003 | Grenache, Cabernet Sauvignon | 8 | 3.78 | 0.88 | 5.74 | 3.32 | 1.28 | 15.63 | 75.58 | 11.19 | 0.98 |
| Luberri Monje | D.O.Ca.Rioja | 2003 | Tempranillo (90%), others (10%) | 16 | 3.54 | 0.51 | 5.33 | 2.64 | 1.03 | 14.18 | 55.98 | 9.60 | 0.80 |
| GarnachaHaciendaMolleda | D.O.Cariñena | 2006 | Grenache | 10 | 3.58 | 0.59 | 5.23 | 1.92 | 0.93 | 14.34 | 52.71 | 10.87 | 0.73 |
| Bancales garnacha/cabernet | D.O.Cariñena | 2004 | Grenache (80%), Cabernet Sauvignon (20%) | 14 | 3.40 | 0.51 | 6.29 | 2.74 | 0.72 | 14.52 | 74.25 | 11.50 | 1.00 |
| La Montesa | D.O.Ca.Rioja | 2005 | Grenache (55%), Tempranillo (40%), Mazuelo (5%) | 12 | 3.57 | 0.49 | 5.36 | 1.52 | 0.99 | 14.20 | 51.58 | 9.25 | 0.80 |
| AN/2 | Baleares | 2005 | Callet (65%), Manto negro-Fogones (20%), Syrah (15%) | 12 | 3.66 | 0.53 | 4.59 | 1.66 | 0.91 | 13.80 | 47.24 | 6.32 | 0.98 |
| Piedra Estancia | D.O.Toro | 2002 | Tinta de Toro (95%), Grenache (5%) | 6 | 3.38 | 0.48 | 5.85 | 1.86 | 1.11 | 14.19 | 55.37 | 10.32 | 0.84 |
| Gran Coronas Torres | D.O.Penedés | 2004 | Cabernet Sauvignon (85%), Tempranillo (20%) | 12 | 3.58 | 0.54 | 5.27 | 2.69 | 1.20 | 14.21 | 61.57 | 10.57 | 0.93 |
| Gran Caus | D.O.Penedés | 2000 | Cabernet Sauvignon (27%), Cabernet Franc (37%), Merlot (36%) | 12 | 3.39 | 0.58 | 5.86 | 1.64 | 0.64 | 13.98 | 51.23 | 10.47 | 0.88 |
| Summa Varietalis | D.O.Dominio de Valdepusa | 2003 | Syrah, Cabernet Sauvignon, Petit Verdot | 12 | 3.61 | 0.64 | 4.94 | 2.16 | 0.69 | 14.00 | 75.42 | 11.71 | 1.00 |
| Dehesa del Carrizal | D.O.Dehesa del Carrizal | 2002 | Cabernet Sauvignon, Syrah, Merlot | 8–10 | 3.71 | 0.50 | 4.88 | 1.05 | 1.15 | 13.29 | 50.56 | 8.76 | 0.87 |
| Enate Cabernet Sauvignon | D.O.Somontano | 2002 | Cabernet Sauvignon | 12 | 3.53 | 0.39 | 6.24 | 1.51 | 0.91 | 14.07 | 64.72 | 11.56 | 0.97 |
| Atrium | D.O.Penedés | 2002 | Merlot | 6 | 3.46 | 0.48 | 5.37 | 2.19 | 0.85 | 12.94 | 43.75 | 6.62 | 0.98 |
| Muret | D.O.Ribera del Jiloca | 2004 | Grenache (80%), Tempranillo (20%) | 5 | 3.26 | 0.40 | 6.84 | 4.54 | 0.33 | 15.73 | 66.24 | 9.47 | 0.79 |
| Guelbenzu EVO | D.O.Ribera del Queiles | 2004 | Cabernet Sauvignon (55%), Tempranillo (25%), Merlot (25%) | 12 | 3.56 | 0.53 | 5.80 | 1.35 | 1.31 | 13.59 | 58.97 | 10.97 | 0.92 |
| Care Merlot/Shyrah | D.O.Cariñena | 2005 | Merlot, Syrah | 12 | 3.50 | 0.47 | 5.91 | 2.40 | 0.81 | 14.03 | 69.77 | 11.21 | 0.99 |
| Martinet Bru | D.O.Ca.Priorat | 2004 | Grenache (30%), Cabernet Sauvignon (30%), Merlot (30%), Syrah (10%) | 17 | 3.41 | 0.60 | 5.46 | 0.76 | 0.64 | 14.40 | 48.15 | 10.79 | 0.87 |
| Dominio de Tares, Cepas Viejas | D.O.Bierzo | 2005 | Mencia | 9 | 3.53 | 0.56 | 4.82 | 1.50 | 1.05 | 13.69 | 57.09 | 11.36 | 0.93 |
| Solanes | D.O.Ca.Priorat | 2004 | Cariñena (40%), Grenache (30%), Cabernet Sauvignon (15%), Merlot (10%), Syrah (5%) | 14 | 3.44 | 0.87 | 5.56 | 1.60 | 0.67 | 14.41 | 55.64 | 9.39 | 0.78 |

^a Expressed as g l⁻¹ of acetic acid.

^b Expressed as g l⁻¹ of tartaric acid.

^c Expressed as absorbance units (a.u.).

method, 2 ml of wine were firstly fractionated by preparative chromatography: Gel Permeation Chromatography (GPC). Two fractions were collected and brought to dryness under vacuum. Fractions 1 and 2 were redissolved in 2 ml of formic acid/water (5:95, v/v) and 7 ml of methanol, respectively. Fraction F1 was further analyzed by HPLC–DAD and HPLC–MS. HPLC–DAD analyses were performed using an Agilent modular 1100 liquid chromatograph (Waldbronn, Germany) equipped with a G1313A injector, a G1311A HPLC quaternary pump, an online G1379A degasser, a G1316A oven, a G1315B photodiode array detector, and an Agilent Chemstation software. The column was a reversed-phase Kromasil 100-C18 (5 μm packing, 250 mm \times 46 mm i.d.), protected with a guard column of the same material (Teknokroma, Barcelona, Spain). Compounds were eluted under the following conditions: 1 ml min^{-1} flow rate; oven 40 °C; solvent A: formic acid/water (5:95, v/v); solvent B: acetonitrile (100%); gradients: isocratic 0% B in 2 min, from 0% to 8% B in 3 min, from 8% to 20% B in 55 min, from 20% to 30% B in 10 min, from 30% to 50% B in 1 min, from 50% to 100% B in 2 min, stay in 100% B for 7 min, from 100% to 0% B in 1 min, and then stay in 0% B for 9 min, followed by washing and reconditioning of the column. Thirty microlitres of F1 (in formic acid/water, 5:95 v/v) were directly injected in the HPLC system and chromatographed. UV–Vis spectra were recorded from 210 to 700 nm, with a bandwidth of 2.0 nm. Quantification was carried out by peak area measurements at 365 nm for flavonols, 310 nm for hydroxycinnamic acids, 280 nm for flavanols and phenolic acids, and 220 nm for aconitic acids. Identification of compounds was performed by comparing their retention times and UV–Vis spectra to authentic standards and confirmed by HPLC–MS analysis. Their quantification was performed in triplicate using an external standard calibration curve for each compound. Quantification of non-commercial compounds was made using the calibration curves and response factor of a structurally closer compound such as *trans*-coumaric acid for *trans*-coutaric acid. The calibration curves were obtained by injecting different concentrations of standards. The range of the linear calibration curves ($r^2 > 0.994$ in all cases) was from 0.01 (limit of detection) to 1 mg l^{-1} for the least concentrated compounds and from 1.0 to 100 mg l^{-1} for the most concentrated compounds. Quantitative data of the identified compounds were obtained by interpolation of the relative areas in calibration curves built from the analysis of pure reference compounds.

MS analysis was performed by coupling the Agilent 1200 liquid chromatograph described above to a Hewlett–Packard 5989A quadrupole mass spectrometer equipped with an electrospray interface (HP 59987A) and controlled by the MS Agilent 1200 software. Chromatographic separation was performed under the same conditions described above. To assure a flow of 19 $\mu\text{l min}^{-1}$ into the ESI interface during LC–MS, the LC effluent was split by means of a zero dead volume T-piece. This flow was found to be the optimum under these conditions. Nitrogen was used as nebulizing gas at an inlet pressure of 80 psi and a temperature of 225 °C. All mass spectrometry data were acquired in positive ionization profile mode from 150 to 700 m/z .

2.3.3. Determination of total polymeric proanthocyanidins (PAs) content

The vanillin assay was performed according to the method described elsewhere (Sun, Ricardo-da-Silva, & Spranger, 1998) in the second fraction obtained from the GPC. Fraction F2 was dissolved in 7.5 ml of methanol (*sample*). The total volume of reaction medium was fixed at 6 ml: 1 ml of *sample*, 2.5 ml of *reagent a* (1% w/v of vanillin in methanol), and 2.5 ml of *reagent b* (10% v/v of sulphuric acid methanol) were mixed in a vial. Reaction took place at 30 °C during 15 min (time reaching the maximum value of absorbance at 500 nm). The absorbance of the coloured adducts

formed between vanillin (4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde) and proanthocyanidins (flavanols with a single bond at the 2,3-position and free meta-oriented hydroxy groups on the B ring) was measured at 500 nm. In parallel, a blank for each sample was made to eliminate the absorbance of residual pigments present in F2. The blank was prepared in the same way described for the sample, but adding methanol instead of vanillin. Quantification of proanthocyanidins was performed by means of a calibration curve prepared with different concentrations of pure catechin by interpolation of the relative absorbance units in the calibration curve. Samples were analyzed in triplicate.

2.3.4. Analysis of conventional oenological parameters in wines

Conventional oenological parameters of wines (ethanol content, pH, reducing sugars, titratable and volatile acidities) were determined by Infrared Spectrometry with Fourier Transformation (IRFT) with a WineScan™ FT 120 (FOSS®), which was calibrated with wine samples analyzed in accordance with official OIV practices. L-Malic and lactic acids were determined by enzymatic methods in accordance with official AOAC analysis methods (AOAC, 2002). The total polyphenol index (TPI) was estimated as absorbance at 280 nm, colour intensity (CI) was calculated as the sum of absorbance at 420, 520, and 620 nm and hue or tonality (*T*) expressed as the rate A420/A520 (absorbance at 420 nm/absorbance at 520 nm) (Ribéreau-Gayon, 1970).

2.3.5. Analysis of protein-precipitable proanthocyanidins (PPAs)

Protein-precipitable PAs (PPAs) were estimated using ovalbumin as the precipitation agent and tannic acid solutions as standards in accordance with a previously described method (Llaudy et al., 2004). All experiments were carried out at room (20 \pm 2 °C) and in triplicate.

2.4. Triangle tests with spiked wine samples

In order to prove if the non-volatile compounds that, attending to the statistical models built in the first part of the work, could play relevant sensory roles in wine oral sensations, different triangular tests were carried out. A trained sensory panel composed of 18 subjects (twelve men and six women, ranging from 23 to 46 years of age) performed 24 triangle tests on different samples in duplicate. The samples confronted in the triangle tests were either water or a sensory neutral red wine and the same sample spiked with the targeted non-volatile compound. The neutral wine used for the spiking experiments presented low aroma intensity and its oral properties were not marked, being its polyphenol content and astringency perception especially low. Table 2 shows the chemical composition of the neutral wine.

Table 2
Chemical parameters of the neutral wine used for the addition of different compounds in triangle tests.

| Chemical variable | |
|---------------------------------------|-------|
| pH | 3.53 |
| Titratable acidity ^a | 5.54 |
| Volatile acidity ^b | 0.44 |
| Malic acid ^c | 0.0 |
| Lactic acid ^c | 1.4 |
| Ethanol content (% v/v) | 12.6 |
| Reducing sugars ^c | 1.3 |
| Total polyphenol index ^d | 39.3 |
| Polymeric PAs ^c | 0.084 |
| Protein-precipitable PAs ^c | 0.1 |

^a Expressed as g l^{-1} of tartaric acid.

^b Expressed as g l^{-1} of acetic acid.

^c Expressed as g l^{-1} .

^d Expressed as absorbance units.

In triangle tests, three glasses were presented to each judge and they were asked to select the sample that presented different oral properties. The number of right answers was compared with tabulated values to evaluate the presence of significant sensory differences between original and spiked samples. If significant differences were detected, panellists were asked to freely describe the descriptor inducing the sensory difference.

In all tests, samples (10 ml, 20 °C) were presented in random order in coded black tulip shaped wine glasses covered with a Petri dish. All panellists had participated regularly in sensory tests for at least one year in weekly training sessions devoted to recognise and distinguish different qualities of exclusively oral sensations (taste and mouth-feel) in analytical sensory experiments.

2.5. Statistical analysis

A three-way ANOVA for each of the in-mouth attributes (tastes, astringency, global intensity and persistence) involving wines (W), judge (J) and replicate (R) as fixed factors and all first order interactions was calculated to confirm panel performance with the 28 panellists selected during the training sessions. Then, for attributes showing a significant wine-by-judge ($W \times J$) interaction effect ($P = 0.05$), a PCA was run in order to assess judges' disagreement. For that, a table with the wines in rows and the judges (mean scores of two repetitions) in columns was employed.

A one-way ANOVA with repeated measurements was calculated on the attributes evaluated in-mouth: sweetness, acidity, astringency, global intensity and persistence in order to evaluate the presence/absence of significant differences among wines for these attributes.

Pearson's correlation coefficients and simple linear regressions were calculated between sensory and/or chemical parameters in order to evaluate significant correlations.

The analyses were carried using SPSS (Inc., Chicago, IL) and SPAD software (version 5.5, CISIA-CESRESTA, Montreuil, France).

Partial Least Square Regression (PLSR) by means of the PLS1 algorithm was used to calculate a predictive model for astringency from chemical composition by means of the Unscrambler software version 9.7 CAMO (Trondheim, Norway). Firstly, a matrix with the chemical quantitative data (X -variables) and sensory astringency (Y -variable: average value given by all panellists) in columns and wines in rows was built and further centred and scaled in order to obtain normalized data. Homoscedasticity and linearity were also confirmed to avoid overestimating the goodness of fit. Collinearity between the X -variables was also checked and further discarded. The strategy followed for the prediction of astringency from chemical composition began by building a first initial model with all X variables (chemical measurements of nonvolatile composition). After this, the existence of outliers was checked, samples with a clear deviation from the model were eliminated, kept out from the calibration process and the model recalculated. The number of X variables in the model was then reduced following an iterative process, searching for the simplest model with the best prediction ability. A cross full validation was then carried out to

estimate the prediction ability of the models for new set of samples. In cross validation, one of the samples is kept out of the calibration, the model is recalculated and used for prediction of the modelled property of the missing sample. This step is repeated until all samples have been kept out once and then validation residual variance is computed from the prediction residuals.

3. Results and discussion

3.1. Sensory descriptive analysis by a trained panel

A three-way ANOVA for each of the in-mouth attributes (sweetness, acidity, bitterness, astringency, global intensity and persistence) involving wines (W), judge (J) and replicate (R) as fixed factors was calculated for assessing panel performance. The judge effect was significant on all attributes. This effect is commonly found in sensory analysis and can be explained by interindividual differences. However, none of the replicate effect was significant, indicating a consistent assessment of attributes and reflecting the reproducibility of the panel. The wine-by-judge interaction ($W * J$) was significant only for bitterness. A PCA run on this attribute (judges in columns and wines in rows) revealed that judges' projections were spread over the loading plot (data not shown) which indicates that there are differences in the interpretation of the term bitterness and that assessors may need more training with respect to this attribute. Hence, this term was not considered in subsequent analysis.

A one-way ANOVA with repeated measurements was calculated on the attributes evaluated in-mouth: sweetness, acidity, astringency, global intensity and persistence. All these five attributes were significantly different among wines ($P < 0.001$ in all cases), which indicates that these five attributes were useful in characterizing differences among the 34 wines.

A simple correlation analysis (Table 3) between sensory attributes showed that global intensity and persistence were positively correlated ($P < 0.001$) and that both terms were highly positively correlated to astringent perception ($P < 0.001$ in both cases). The acid taste was also significantly positively correlated to global intensity ($P < 0.01$) and a tendency was observed between this taste and persistence ($P < 0.1$). These data suggest that global intensity and persistence are mainly driven by oral sensations such as astringency or acidity in the present studied red wines, contrary to what has been already observed for white wines, where both sensations (global intensity and persistence evaluated in mouth) have been demonstrated to be especially driven by aroma perception (Sáenz-Navajas, Campo, Fernández-Zurbano, et al., 2010).

3.2. Relationship between in-mouth sensory properties and chemical composition

3.2.1. Sweetness

A wide range of works agree in stating that the major contributors to the sweet taste of wine are the reducing sugars glucose and

Table 3
Pearson's correlation coefficients calculated on sensory attributes evaluated by the trained panel. Significant correlations are highlighted in bold letters.

| | Sweetness | Acidity | Astringency | Global intensity | Persistence |
|------------------|-----------|----------------|-----------------|------------------|-------------|
| Sweetness | 1 | | | | |
| Acidity | 0.103 | 1 | | | |
| Astringency | -0.237 | -0.128 | 1 | | |
| Global intensity | -0.108 | 0.477** | 0.767*** | 1 | |
| Persistence | -0.185 | 0.324* | 0.655*** | 0.835*** | 1 |

* $P < 0.1$.

** $P < 0.01$.

*** $P < 0.001$.

fructose (Ough & Amerine, 1988), however in the present work perceived sensory sweetness and the content in reducing sugars were not significantly correlated ($P = 0.166$). This effect is accordance with recent reports on dry red wines (Blackman et al., 2010; Sáenz-Navajas, Ferreira, et al., 2010; Sáenz-Navajas, Tao, et al., 2010) and could be attributed to the low levels of reducing sugars in the set of samples. In fact the concentration of reducing sugars (median = 1.89 g l^{-1}) is well below the sensory threshold calculated in water for the main reducing sugar glucose: 3.24 g l^{-1} (Hufnagel & Hofmann, 2008b) and near the sensory threshold for fructose in water 1.83 g l^{-1} (Hufnagel & Hofmann, 2008b). Similarly, although the ethanol content has been described to be an enhancer of sweetness (Mattes & DiMeglio, 2001; Scinska et al., 2000; Wilson, O'Brien, & Macairt, 1973), no significant correlation ($P = 0.980$) was found between the sweet taste and ethanol content.

3.2.2. Acidity

Concerning the perceived acidity, a positive and significant correlation was found for this taste and the measured titratable acidity in this set of wines ($P = 0.011$), in accordance with a previous report (Blackman et al., 2010). Tartaric acid, the main contributor to titratable acidity has a sensory threshold (0.04 g l^{-1}) well below the median value calculated for titratable acidity (5.5 g l^{-1}) (Hufnagel & Hofmann, 2008b). It is worth mentioning that sensory acidity was not significantly correlated either with pH ($P = 0.741$) or the content in lactic acid ($P = 0.308$) in wines.

3.2.3. Astringency

Astringency, global intensity and persistence were found to be highly positively correlated to the total polyphenol content, TPI ($P < 0.001$, in all cases). Although the real existence of this statistical relationship has been already confirmed by complete reconstitution experiments (Sáenz-Navajas, Campo, Fernández-Zurbano, et al., 2010; Sáenz-Navajas, Campo, et al., 2011), the contribution of the different families of phenolics to the sensory perception of astringency has not been well established. Recent works have demonstrated that, most surprisingly and in contrast to previous studies, flavanols, proanthocyanidin dimers, trimers and tetramers seem not to be the key elicitors of the astringent taste of red wine. Instead a variety of different low molecular weight compounds such as certain polyphenols and acids as well as a polymeric fraction seem to play such a role (Hufnagel & Hofmann, 2008a; Sáenz-Navajas, Ferreira, et al., 2010). In order to confirm and further expand these observations, 30 different individual molecules (derivatives of acids, flavanols, hydroxycinnamic acids and flavonols) and two analytical indexes (protein-precipitable PAs –PPAs– and total polymeric PAs) (see Table 4) with known astringency properties have been quantified and further used for calculating predictive PLS models for sensory astringency. In order to ensure a maxima sensory significance of the models, two previous criteria were used to restrict the number of variables entering the models. First, compounds or groups of compounds must be present at concentrations above their sensory thresholds in at least one wine (criteria for sensory activity); and second, their ranges of occurrence within

Table 4

Identification, MS spectrum data (M^+), retention time (RT), average, minimum (min), and maximum (max) concentrations, discriminability potential –DP– (DP > 2 marked in bold) and sensory threshold (expressed in mg l^{-1}) for astringency.

| Parameters/compounds | M^+ (m/z) | RT (min) | Average (mg l^{-1}) | Max (mg l^{-1}) | Min (mg l^{-1}) | DP ^a | Sensory threshold (mg l^{-1}) |
|--|-----------------|----------|--------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|--|
| <i>Acids and derivatives</i> | | | | | | | |
| <i>cis</i> -Aconitic acid + n.i. | 175 | 3.1 | 3.11 | 4.73 | 1.40 | 3.38 | 0.1 |
| <i>trans</i> -Aconitic acid | 175 | 3.6 | 4.10 | 5.35 | 2.75 | 1.95 | 0.1 |
| Gallic acid | 171 | 3.9 | 46.61 | 68.01 | 28.36 | 1.36 | 50 |
| Protocatechuic acid | 155 | 6.3 | 7.93 | 14.08 | 2.98 | * | 32 |
| Protocatechuic acid ethyl ester | 183 | 22.2 | 14.13 | 32.31 | 6.19 | 3.59 | 9 |
| <i>Flavanols</i> | | | | | | | |
| Procyanidin B1 | 579 | 8.4 | 11.18 | 15.24 | 7.64 | * | 139 |
| Epigallocatechin | 307 | 8.6 | 7.84 | 11.39 | 6.18 | * | 159 |
| Catechin | 291 | 8.9 | 18.75 | 23.40 | 12.90 | * | 119 |
| Procyanidin B2 | 579 | 9.7 | 12.42 | 16.37 | 9.19 | * | 110 |
| Epigallocatechin gallate | 459 | 9.9 | 11.70 | 15.48 | 8.67 | * | 87 |
| Epicatechin | 291 | 11.7 | 18.25 | 39.25 | 12.99 | * | 270 |
| Catechin gallate | 443 | 13.7 | 13.61 | 16.97 | 11.28 | * | 110 |
| Epicatechin gallate | 443 | 17.4 | 7.84 | 11.39 | 6.18 | * | 110 |
| Protein-precipitable PAs | | | 10.2 | 14.3 | 6.9 | 2.1 | n.a. |
| Total polymeric PAs | | | 252.6 | 550.9 | 40.5 | 13.6 | 12.0 |
| <i>Hydroxycinnamic acids and derivatives</i> | | | | | | | |
| <i>cis</i> -Caftaric acid | 311 | 7.5 | 4.28 | 5.47 | 2.63 | 1.09 | 5 ^a |
| <i>trans</i> -Caftaric acid | 311 | 7.9 | 25.97 | 60.80 | 9.80 | 6.20 | 5 ^a |
| <i>trans-p</i> -Coutaric acid | 295 | 9.3 | 14.83 | 23.10 | 5.90 | 2.31 | 10 |
| <i>trans</i> -Caffeic acid | 181 | 10.2 | 8.91 | 13.10 | 5.04 | 1.31 | 10 |
| <i>trans-p</i> -Coumaric acid | 165 | 13.5 | 2.37 | 3.57 | 1.72 | * | 23 |
| <i>trans</i> -Ferulic acid | 195 | 19.4 | 4.34 | 7.23 | 2.75 | * | 13 |
| <i>Flavonols</i> | | | | | | | |
| Myricetin-3- <i>O</i> -glucoside | 451 | 17.6 | 2.51 | 6.35 | 0.29 | 6.35 | 1.0 |
| Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside | 465 | 23.3 | 3.33 | 6.52 | 0.86 | 7.58 | 0.2 |
| Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide | 465 | 24.3 | 9.42 | 17.91 | 1.09 | 16.4 | 1.0 |
| Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside | 479 | 27.9 | 2.42 | 13.38 | 0.07 | 133.8 | 0.1 |
| Myricetin | 319 | 29.2 | 8.43 | 10.65 | 7.98 | 1.33 | 3.1 |
| Kaempferol-3- <i>O</i> -glucoside | 509 | 36.0 | 7.96 | 15.20 | 6.18 | 2.46 | 0.3 |
| Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucoside | 479 | 38.6 | 0.78 | 6.96 | 0.10 | 6.33 | 1.1 |
| Quercetin | 303 | 44.0 | 7.44 | 16.30 | 0.08 | 1.6 | 10 |
| Kaempferol | 287 | 58.3 | 4.33 | 40.59 | 0.09 | 2.03 | 20 |

n.i.: Not identified; n.a.: not available.

* Max < taste threshold.

^a If min > taste threshold, DP = max/min; if min < taste threshold, DP = max/sensory threshold.

the sample set must be large enough to cause a sensory difference (criteria for sensory discriminability). Attending to the sensory activity criterion, twenty compounds presenting a maximum concentration (max) higher than their sensory thresholds were selected. As can be seen in Table 4, these compounds were four acids and derivatives (*cis*-aconitic, *trans*-aconitic and gallic acids and protocatechuic acid ethyl ester), PPAs, total polymeric PAs, four hydroxycinnamic acids (*cis*-caftaric, *trans*-caftaric, *trans-p*-coumaric and *trans*-caffeic acids) and the 10 quantified flavonols. The potential discrimination ability of each variable was quantitatively estimated by using the quotient Maxima Concentration/ (taste threshold or Minima Concentration, whichever is highest), as reported elsewhere (Escudero et al., 2007). This parameter can be seen in Table 4 in the column headed by DP (for discriminability potential) and only those compounds for which this DP was at least 2, or very close to 2, were selected. These fourteen compounds are marked in bold in the table and include seven flavonols (kaempferol, kaempferol-3-*O*-glucoside, myricetin-3-*O*-glucoside, isohramnetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-galactoside and quercetin-3-*O*-glucuronide), protein-precipitable PAs (PPAs) and total polymeric PAs, *trans*-caftaric (*Caft*) and *trans-p*-coumaric (*Cout*) acids, protocatechuic ethyl ester (*Procat*), and *trans*-aconitic acid (*c-Acon*) and the peak corresponding to *cis*-aconitic acid (*c-Acon*) eluting with a non-identified peak. Two more parameters, ethanol content and the ratio *trans*-aconitic/*cis*-aconitic acids (*trans/cis*) were also considered for modelling astringency. On the one hand, increasing ethanol contents (*Et*) have been described to exacerbate astringency (Blackman et al., 2010; Jones, Gawel, Francis, & Waters, 2008; Obreque-Slier, Pena-Neira, & Lopez-Solis, 2010; Vidal, Courcoux, et al., 2004), and a significant correlation between the alcohol and this mouth-feel attribute ($F = 17.77$, $P < 0.001$) has been found in the studied set of wines. On the second hand, as will be discussed later, different sensory tests suggested that the ratio *trans*-aconitic/*cis*-aconitic acids plays a relevant sensory role on the perception of astringency and in fact, a positive correlation ($F = 5.72$; $P = 0.022$) between this parameter in the wine set and the sensory astringency was observed.

Thus, the PLS regressions were calculated with the 14 compounds/groups of compounds fulfilling both the sensory activity and sensory discriminability criteria (marked in bold in Table 4) together with the alcohol content and *trans/cis*-aconitic ratio. An additional statistical significance criterion was further imposed,

since only those variables for which the resulting uncertainty limits of the regression coefficients -2 standard deviations under ideal conditions- did not cross the zero line were considered significant variables as described by Martens and Martens (2000). Taking all these criteria into account, two different PLS models could be developed:

$$\begin{aligned} \text{Astringency} = & -0.016 + 0.37 \times Et + 0.29 \times \text{Procat} + 0.23 \\ & \times \text{Cout} + 0.50 \times \text{PPAs} + 0.07 \times c\text{-Acon} + 0.05 \\ & \times \text{Caft} \end{aligned} \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \text{Astringency} = & -3.59 + 0.35 \times Et + 0.22 \times \text{Cout} + 0.32 \\ & \times \text{PPAs} + 0.22 \times \text{trans/cis} + 0.16 \\ & \times \text{Caft} \end{aligned} \quad (2)$$

In model [1] four samples were identified as outliers and were kept out of the model. This two principal component model explained 76% of the original variance (70% by cross-validation) with a RMSE of 0.448. In model [2], which is composed also by two components, only one sample was identified as outlier, the explained variance was slightly worse 67% (63% by full cross-validation) than the previous figure given for model [1] but the root-mean-square prediction error (RMSEP) was better 0.377. The *X* and *Y* loadings and predicted vs. measured plots for this last model are given in Figs. 1 and 2, respectively.

Both models are highly significant from the statistical point of view and both of them relate astringency to sensory relevant chemical measurements. In the first model this sensory percept appears positively related to the wine content in six different astringent-related compounds (ethanol, protocatechuic acid ethyl ester, PPAs, *trans-p*-coumaric, *cis*-aconitic and *trans*-caftaric acids), in the second one, protocatechuic acid ethyl ester and *cis*-aconitic are replaced by the *trans/cis*-aconitic acid ratio. Both models strongly suggest that protein-precipitable PAs are not the sole responsible for astringency perception but also different low molecular weight phenolic acids with high astringency impact. This fact is in accordance with recent publications carried out with fractions isolated from wine (Hufnagel & Hofmann, 2008a; Sáenz-Navajas, Ferreira, et al., 2010) and with astringency prediction calculated with a set of 24 Premium red wines (Sáenz-Navajas, Tao, et al., 2010). The models also confirm that ethanol content is an ac-

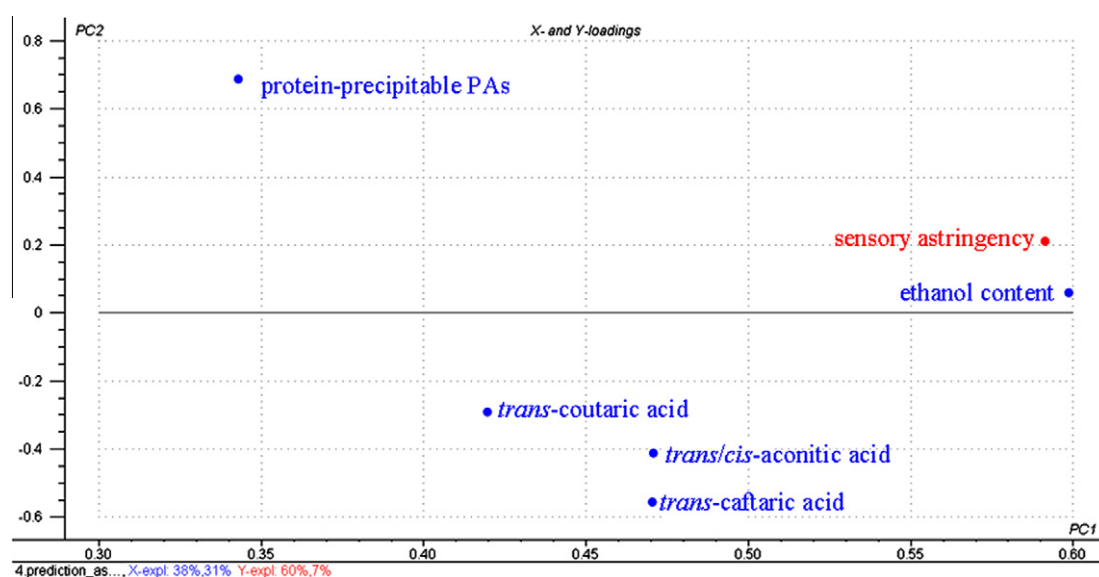


Fig. 1. Plot of predicted vs. measured astringency scores obtained with the (a) calibration (in red) and (b) validation (in blue) PLS models (model [2]) calculated for the 34 wine samples (numbered from 1 to 34 in the plot). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this paper.)

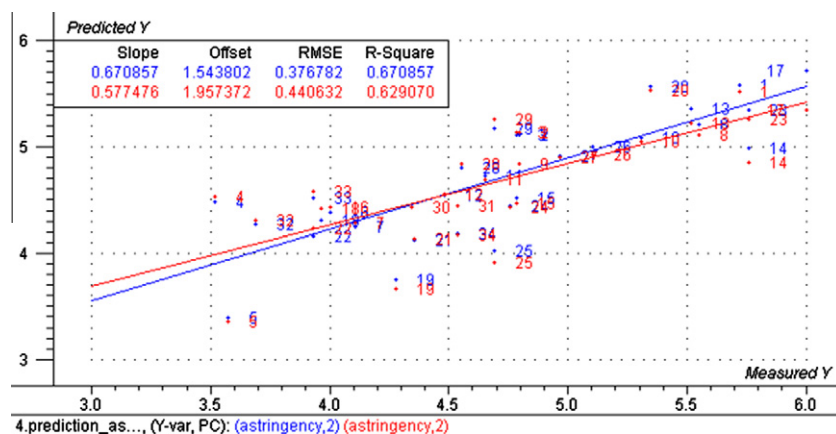


Fig. 2. X- and Y-loading plot of astringency prediction by PLS regression model (model [2]). Significant X-variables and predicted variable (astringency) are plotted on the first two principal components (PC1 and PC2).

Table 5

Triangle tests performed to check the effect of the addition of different compounds on the oral sensory properties of a neutral wine (nd: not detected).

| Test | Matrix | Compound | Concentration in neutral wine (mg l ⁻¹) | Concentration in spiked sample (mg l ⁻¹) | <i>trans/cis</i> -Aconitic ^a | <i>p</i> ^b |
|------|--------|---|---|--|---|-----------------------|
| 1 | Wine | Polymeric proanthocyanidins | 84.25^b | 700.22^c | | 99.9% |
| 2 | Wine | Polymeric proanthocyanidins | 84.25^b | 145.75^c | | 95% |
| 3 | Wine | Sacarose | nd | 5.00 ^d | | ns |
| 4 | Wine | <i>cis</i> -Aconitic acid | 1.27 | 4.34 | 1.29 | ns |
| 5 | Water | <i>cis</i> -Aconitic acid | nd | 5.55 | nd | ns |
| 6 | Wine | <i>trans</i> -Aconitic acid | 5.39 | 11.26 | 8.86 | 95% |
| 7 | Water | <i>trans</i> -Aconitic acid | nd | 5.86 | 5.86 | 95% |
| 8 | Wine | <i>cis</i> -Aconitic acid + <i>trans</i> -aconitic acid | 1.27 + 5.39 | 4.67 + 11.20 | 2.39 | ns |
| 9 | Water | <i>cis</i> -Aconitic acid + <i>trans</i> -aconitic acid | nd | 5.39 + 6.65 | 1.23 | ns |
| 10 | Wine | <i>cis</i> -Aconitic acid + <i>trans</i> -aconitic acid + sacarose | 1.27 + 5.39 + 0.0 | 4.67 + 11.20 + 5 | 2.39 | 95% |
| 11 | Wine | <i>trans</i> -Caffeic acid | 14.55 | 24.85 | | ns |
| 12 | Wine | <i>trans</i> -Caffeic acid | 14.55 | 34.97 | | 95% |
| 13 | Wine | <i>trans</i> -Caftaric acid | 15.79 | 75.62 | | ns |
| 14 | Wine | <i>cis</i> -Aconitic acid + <i>trans</i> -aconitic acid + <i>trans</i> -caffeic acid | 1.27 + 5.39 + 14.55 | 4.67 + 11.20 + 24.85 | | ns |
| 15 | Wine | <i>cis</i> -Aconitic acid + <i>trans</i> -aconitic acid + <i>trans</i> -caffeic acid + sacarose | 1.27 + 5.39 + 14.55 + 0.0 | 4.67 + 11.20 + 24.85 + 5 | | 95% |
| 16 | Wine | Protocatechuic acid | 2.21 | 8.61 | | ns |
| 17 | Wine | Protocatechuic acid | 2.21 | 16.56 | | ns |
| 18 | Wine | Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside | nd | 4.10 | | ns |
| 19 | Water | Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside | nd | 4.90 | | 90% |
| 20 | Wine | Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside | nd | 8.34 | | 95% |
| 21 | Water | Quercetin-3- <i>O</i> -glucoside | nd | 8.51 | | ns |
| 22 | Wine | Quercetin-3- <i>O</i> -glucuronide | 5.88 | 16.49 | | 95% |
| 23 | Wine | Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside + quercetin-3- <i>O</i> -glucoside | nd | 3.52 + 8.22 | | ns |
| 24 | Water | Quercetin-3- <i>O</i> -galactoside + quercetin-3- <i>O</i> -glucoside | nd | 5.81 + 8.60 | | ns |

^a Rate of *trans/cis*-aconitic acid concentration.

^b Significance of the effect; ns: not significant. Significant effects marked in bold.

^c Expressed in g l⁻¹ of PPAs measured by the vanillin assay in fraction 2 obtained from GPC fractionation.

^d Expressed in g l⁻¹.

tive contributor to astringency. Some sensory tests were further carried out in order to confirm other more specific aspects of the models and to gain more insights about the involvement of compounds listed in Table 4 on wine in-mouth sensory characteristics.

3.3. Triangle tests to evaluate the sensory impact of non-volatile compounds

The potential in-mouth sensory role played by different non-volatile molecules was further checked by 24 addition tests carried out in both, the neutral wine with the compositional parameters given in Table 2, and aqueous solutions. The sensory tests were triangle tests performed in duplicate and to the best of our knowledge tests of this kind on oral sensory percepts have not been previously reported. Results are summarized in Table 5.

In tests 1 and 2 (Table 5) the polymeric fraction isolated by GPC from a high astringent wine was added to a neutral wine. As shown in the table, the addition of such polymeric fraction induces significant sensory differences in the neutral wine matrix. The astringency of the spiked sample was described as more astringent by 100% of panellists in test 1, where the addition of polymeric PAs was done at real wine concentrations. In test 2 the neutral wine was spiked with just the 1:10 diluted polymeric PA fraction. Sensory analysis showed that in this test 2, the fortified sample was identified as being not only more astringent (50% of responses) but also more acid (60% of responses). These results confirm the outstanding sensory relevance of this pool of compounds on the astringency and taste sensory properties of red wines.

The rest of results obtained in the addition tests were challenging and reveal the existence of extremely complex perceptual

interactions between the different sensory active non-volatile compounds. It is worth mentioning that the addition of *cis*-aconitic acid to both wine or water (tests 4 and 5) could not be detected by our panel, which is in clear contrast to the results presented by Hufnagel and Hofmann (2008a), Sáenz-Navajas, Ferreira, et al. (2010), and Sáenz-Navajas, Tao, et al. (2010) and is also in apparent contradiction to the role that this compound seems to play on astringency attending to model [1]. Similarly, the addition of *trans*-caftaric acid to wine (test 13), could not be detected, therefore not confirming the role that both models attribute to this compound. Protocatechuic acid ethyl ester and coumaric acid, also present in the models for astringency, could not be checked due to the lack of the necessary amount of standard for carrying out the sensory tests.

The complexity of the problem is perfectly illustrated by the sensory experiments carried out with *trans*- and *cis*-aconitic acids (tests 4–10 in Table 5), with those carried out also with caffeic and caftaric acids (tests 11–15 in the table) and with those performed with different flavonols (tests 18–24). While our sensory panel seemed to have a sensory threshold for *cis*-aconitic acid much higher than that of the panel used in the reference (Hufnagel & Hofmann, 2008a), *trans*-aconitic acid could be significantly detected at the maxima levels found in the set of samples (tests 6 and 7 in Table 5), which unequivocally demonstrates that this compound is sensory active at such concentration in a neutral wine matrix. Naively, we thought that both isomers would exert an additive effect, so that the simultaneous addition of both compounds would be easily detected by the sensory panel. On the contrary, what we repeatedly observed, since all these experiments were further replicated, is that the addition of the mixture of the two isomers to both wine (test 8) and water (test 9) cannot be detected. A possible explanation for this would be derived from the specificity in the receptor binding eliciting astringency as has been reported by other authors (Hakkinen, Uitto, & Larjava, 2000; Hofmann & Schwarz, 2008; Tachibana, Koga, Fujimura, & Yamada, 2004). Attending to this hypothesis, the *cis*-isomer would bind to the receptor more effectively than the *trans*-isomer, preventing its detection by an antagonism mechanism. Hence, only those samples with a highest ratio *trans*-/*cis*-aconitic acid (*trans/cis* in Table 5) could be detected as different from the non-spiked neutral wine, which confirms the sensory significance that model [2] attributes to this parameter.

The lack of additivity on the sensory responses elicited by structurally similar non-volatile compounds is also observed in the experiments carried out with *trans*-caffeic, *trans*-caftaric and aconitic acids (tests 11–15 in Table 5). Results were, however, quite different when the addition of the acids was carried out together with a sweet character compound. The presence of a non-detectable amount of saccharose (test 3) in a mixture of *cis*- and *trans*-aconitic acids (test 10) or of *trans*-aconitic and *trans*-caffeic acids (test 15) produced a significant (95% level) increase in the number of panellists (16 out of 36 panelists) that are able to differentiate between the wine and the spiked sample in comparison with tests 8 or 14, where only the acids were present in the spiked sample. While all these results certainly seem to confirm the poor additivity of the sensory signals related to astringency, they also reveal the potential existence of inter-modal (sweetness \times astringency) interactions.

Similar or even more complex perceptual interactions are observed in the tests carried out with different flavonols (tests 18–24). The three of them that could be tested could be detected at the concentrations found in the wine, which no doubt means that they are potentially sensory active. However, the sensory effects were found to be highly dependent on matrix composition. For instance, quercetin-3-*O*-glucoside could induce significant differences in wine (test 20) but not in aqueous solution (test 21),

while just the opposite was observed for quercetin-3-*O*-galactoside that is able to generate different sensory properties to a spiked aqueous solution (test 19) but not to the neutral wine (test 18). Again, it was observed that samples spiked with a mixture of both isomers (tests 23 and 24) is not sensory different from the reference sample (tests 18–21).

In summary, this research has unveiled some aspects about the chemical basis of wine astringency, providing two statistically significant models for explaining this sensory percept from the wine content on sensory active and sensory discriminant astringent compounds. Even if the models could not be fully sensory validated, because of the no availability of all pure compounds, the research has demonstrated that wine astringency is primarily driven by polymeric proanthocyanidins and secondarily by certain phenolic acids, *trans/cis*-aconitic acid and flavonol profiles. The research has highlighted the existence of extremely complex interactions between non-volatile compounds on the in mouth sensory perception. Particularly remarkable is the potential antagonism found between pairs of different astringent isomers, the sweet \times astringent interaction as well as the highly matrix-dependence of some sensory responses. These results suggest the need for new paradigms and experimental procedures for fully decoding the real sensory relevance of individual non-volatile compounds in the overall wine flavour.

Acknowledgements

This work has been supported by Instituto de Estudios Riojano and the Spanish Education Ministry (AGL2010-22355-C02-01/02 Projects). J.M.A. and M.P.S.N. thank the Government of Navarra and the Spanish Education Ministry (M.E.C.) for his F.P.I. grant and her postdoctoral fellowship, respectively.

References

- AOAC (2002). Method 993.05: l-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice. *Official Methods of Analysis*.
- Blackman, J., Rutledge, D. N., Tesic, D., Saliba, A., & Scollary, G. R. (2010). Examination of the potential for using chemical analysis as a surrogate for sensory analysis. *Analytica Chimica Acta*, 660, 2–7.
- Buratti, S., Ballabio, D., Benedetti, S., & Cosio, M. S. (2007). Prediction of Italian red wine sensorial descriptors from electronic nose, electronic tongue and spectrophotometric measurements by means of Genetic Algorithm regression models. *Food Chemistry*, 100(1), 211–218.
- Campo, E., Ferreira, V., Escudero, A., Marques, J. C., & Cacho, J. (2006). Quantitative gas chromatography-olfactometry and chemical quantitative study of the aroma of four Madeira wines. *Analytica Chimica Acta*, 563(1–2), 180–187.
- Colonna, A. E., Adams, D. O., & Noble, A. C. (2004). Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 26–31.
- de Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940–945.
- de Wijk, R. A., & Prinz, J. F. (2005). The role of friction in perceived oral texture. *Food Quality and Preference*, 16(2), 121–129.
- Escudero, A., Campo, E., Farina, L., Cacho, J., & Ferreira, V. (2007). 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*, 55(11), 4501–4510.
- Fernandez, K., Kennedy, J. A., & Agosin, E. (2007). Characterization of *Vitis vinifera* L. cv. Carmenere grape and wine proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(9), 3675–3680.
- Ferreira, V., San Juan, F., Escudero, A., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Sáenz-Navajas, M. P., et al. (2009). Modeling quality of premium Spanish red wines from gas chromatography-olfactometry data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(16), 7490–7498.
- Ferrer-Gallego, R., García-Marino, M., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., & Escribano-Bailón, M. T. (2010). Statistical correlation between flavanolic composition, colour and sensorial parameters in grape seed during ripening. *Analytica Chimica Acta*, 660(1–2), 22–28.
- Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P. L., & Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Quality and Preference*, 19(3), 286–291.
- Hakkinen, L., Uitto, V. J., & Larjava, H. (2000). Cell biology of gingival wound healing. *Periodontology*, 2000(24), 127–152.

- Hofmann, T., & Schwarz, B. (2008). Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding? *European Food Research and Technology*, 227(6), 1693–1698.
- Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008a). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4), 1376–1386.
- Hufnagel, J. C., & Hofmann, T. (2008b). Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 9190–9199.
- Ishikawa, T., & Noble, A. C. (1995). Temporal perception of astringency and sweetness in red wine. *Food Quality and Preference*, 6, 27–33.
- ISO NORM 3591 (1977). *International Organization for Standardization*. Geneva, Switzerland.
- Jones, P. R., Gawel, R., Francis, I. L., & Waters, E. J. (2008). The influence of interactions between major white wine components on the aroma, flavour and texture of model white wine. *Food Quality and Preference*, 19(6), 596–607.
- Kallithraka, S., Bakker, J., Clifford, M. N., & Vallis, L. (2001). Correlations between saliva protein composition and some T-I parameters of astringency. *Food Quality and Preference*, 12(2), 145–152.
- Kennedy, J. A., Ferrier, J., Harbertson, J. F., & Gachons, C. P. D. (2006). Analysis of tannins in red wine using multiple methods: Correlation with perceived astringency. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(4), 481–485.
- Lathey, K. A., Bramley, B. R., & Francis, I. L. (2010). Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 16(1), 189–202.
- Laudy, M. C., Canals, R., Canals, J. M., Rozes, N., Arola, L., & Zamora, F. (2004). New method for evaluating astringency in red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(4), 742–746.
- Martens, H., & Martens, M. (2000). Modified Jack-knife estimation of parameter uncertainty in bilinear modelling by partial least squares regression (PLSR). *Food Quality and Preference*, 11(1–2), 5–16.
- Mattes, R. D., & DiMeglio, D. (2001). Ethanol perception and ingestion. *Physiology and Behavior*, 72(1–2), 217–229.
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, A., & López-Solís, R. (2010). Enhancement of both salivary protein–enological tannin interactions and astringency perception by ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(6), 3729–3735.
- Ough, C. S., & Amerine, M. A. (1988). *Methods for analysis of musts and wines*. New York: John Wiley and Sons.
- Parpinello, G. P., Versari, A., Chinnici, F., & Galassi, S. (2009). Relationship among sensory descriptors, consumer preference and color parameters of Italian Novello red wines. *Food Research International*, 42(10), 1389–1395.
- Polásková, P., Herszage, J., & Ebeler, S. E. (2008). Wine flavor: Chemistry in a glass. *Chemical Society Reviews*, 32(5), 2478–2489.
- Prinz, J. F., & Lucas, P. W. (2000). Saliva tannin interactions. *Journal of Oral Rehabilitation*, 27(11), 991–994.
- Ribéreau-Gayon, P. (1970). Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique*, 52, 627–631.
- Rodríguez-Nogales, J. M., Fernández-Fernández, E., & Vila-Crespo, J. (2009). Characterisation and classification of Spanish Verdejo young white wines by volatile and sensory analysis with chemometric tools. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(11), 1927–1935.
- Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Avizcuri, J. M., Valentin, D., Fernández-Zurbano, P., & Ferreira, V. (2011). 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*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.12.042>.
- Sáenz-Navajas, M. P., Campo, E., Culleré, L., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). Effects of the nonvolatile matrix on the aroma perception of wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(9), 5574–5585.
- Sáenz-Navajas, M., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., Valentin, D., & Ferreira, V. (2010). An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chemistry*, 121, 1139–1149.
- Sáenz-Navajas, M.-P., Ferreira, V., Dizy, M., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 673(2), 151–159.
- Sáenz-Navajas, M. P., Martín-López, C., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2011). Sensory properties of Premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17, 9–12.
- Sáenz-Navajas, M. P., Tao, Y. S., Dizy, M., Ferreira, V., & Fernández-Zurbano, P. (2010). Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of Premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(23), 12407–12416.
- Scinska, A., Koros, E., Habrat, B., Kukwa, A., Kostowski, W., & Bienkowski, P. (2000). Bitter and sweet components of ethanol taste in humans. *Drug and Alcohol Dependence*, 60(2), 199–206.
- Sun, B. S., Ricardo-da-Silva, J. M., & Spranger, I. (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4267–4274.
- Tachibana, H., Koga, K., Fujimura, Y., & Yamada, K. (2004). A receptor for green tea polyphenol EGCG. *Nature Structural and Molecular Biology*, 11(4), 380–381.
- Varela, P., & Gambaro, A. (2006). Sensory descriptive analysis of Uruguayan Tannat wine: Correlation to quality assessment. *Journal of Sensory Studies*, 21(2), 203–217.
- Vidal, S., Courcoux, P., Francis, L., Kwiatkowski, M., Gawel, R., Williams, P., et al. (2004). Use of an experimental design approach for evaluation of key wine components on mouth-feel perception. *Food Quality and Preference*, 15(3), 209–217.
- Vidal, S., Francis, L., Guyot, S., Marnet, N., Kwiatkowski, M., Gawel, R., et al. (2003). The mouth-feel properties of grape and apple proanthocyanidins in a wine-like medium. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83(6), 564–573.
- Vidal, S., Francis, L., Noble, A., Kwiatkowski, M., Cheynier, V., & Waters, E. (2004). Taste and mouth-feel properties of different types of tannin-like polyphenolic compounds and anthocyanins in wine. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 57–65.
- Wilson, C. W. M., O'Brien, C., & Macairt, J. G. (1973). Effect of metronidazole on human taste threshold to alcohol. *British Journal of Addiction*, 68(2), 99–110.

Food and Beverage Consumption and Health

Youssef El Rayess
Editor

Wine

*Phenolic Composition,
Classification and Health Benefits*

NOVA

Complimentary Contributor Copy

Copyright © 2014 by Nova Science Publishers, Inc.

All rights reserved. No part of this book may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted in any form or by any means: electronic, electrostatic, magnetic, tape, mechanical photocopying, recording or otherwise without the written permission of the Publisher.

For permission to use material from this book please contact us:
Telephone 631-231-7269; Fax 631-231-8175
Web Site: <http://www.novapublishers.com>

NOTICE TO THE READER

The Publisher has taken reasonable care in the preparation of this book, but makes no expressed or implied warranty of any kind and assumes no responsibility for any errors or omissions. No liability is assumed for incidental or consequential damages in connection with or arising out of information contained in this book. The Publisher shall not be liable for any special, consequential, or exemplary damages resulting, in whole or in part, from the readers' use of, or reliance upon, this material. Any parts of this book based on government reports are so indicated and copyright is claimed for those parts to the extent applicable to compilations of such works.

Independent verification should be sought for any data, advice or recommendations contained in this book. In addition, no responsibility is assumed by the publisher for any injury and/or damage to persons or property arising from any methods, products, instructions, ideas or otherwise contained in this publication.

This publication is designed to provide accurate and authoritative information with regard to the subject matter covered herein. It is sold with the clear understanding that the Publisher is not engaged in rendering legal or any other professional services. If legal or any other expert assistance is required, the services of a competent person should be sought. FROM A DECLARATION OF PARTICIPANTS JOINTLY ADOPTED BY A COMMITTEE OF THE AMERICAN BAR ASSOCIATION AND A COMMITTEE OF PUBLISHERS.

Additional color graphics may be available in the e-book version of this book.

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

ISBN: 978-1-63321-059-2 (eBook)

Library of Congress Control Number: 2014939982

Published by Nova Science Publishers, Inc. † New York

Complimentary Contributor Copy

Chapter 8

**QUALITY MAPPING:
AN EXPLORATORY APPROACH FOR EVALUATING
THE CHEMICALS DRIVING IN-MOUTH QUALITY
IN RED WINES**

***María-Pilar Sáenz-Navajas^{1,2}, José Miguel Avizcuri³,
Purificación Fernández-Zurbano³, Vicente Ferreira²
and Dominique Valentin^{1,4}***

¹Centre des Sciences du Goût et de l'Alimentation, Dijon, France

²Laboratory for Flavor Analysis and Enology (LAAE),

Aragón Institute of Engineering Research (I3A), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain

³Instituto de Ciencias de la Vid y el Vin (UR-CSIC-GR), La Rioja, Spain

⁴AGROSUP, Dijon, France

ABSTRACT

Non-volatile molecules have been reported to be important molecules driving wine sensory properties; however the wine industry is far from knowing their exact role in wine quality perception. The present work aims to establish correlations between (1) the non-volatile composition of a set of red wines and their in-mouth sensory attributes and (2) non-volatile composition and the quality scores given by a panel of experts on the same set of wines. A group of 21 wine experts rated the in-mouth quality of 16 Spanish red wines with different non-volatile composition on an unstructured scale anchored with "nil" on the left and "high" on the right. To avoid aroma and color influence in quality assessment, the evaluation was carried out using nose clips and dark glasses. In parallel, a descriptive analysis method was used to evaluate the intensity of in-mouth sensory properties; further non-volatile molecules with known sensory activity were quantified.

Results show an exponential relationship between the in-mouth attribute sourness and both tartaric and succinic acids. Succinic acid and to a lesser extent the alcohol

* Corresponding Author, address: Laboratory for Flavor Analysis and Enology (LAAE), Aragón Institute of Engineering Research (I3A), University of Zaragoza, Zaragoza, Spain; Email: maria@saenz.info.

Complimentary Contributor Copy

content present exponential as well as *t*-aconitic acid are exponentially correlated with astringency as are procyanidins B1 and B3 and the total polyphenolic index, which are linearly correlated.

Results show that experts have heterogeneous in-mouth quality concepts. Experts are divided into three main clusters, and their quality judgments were regressed onto the significant factors derived from the PCA calculated on the 22 non-volatile molecules with sensory activity. Seventy-one per cent of expert quality responses were fitted by the elliptical model, while 29% were fitted by the vector model. Experts belonging to cluster 1 (fitted by the vector model: "the more the better") find that high contents in protein-precipitable PAs and in *c*-aconitic acid result in high quality exemplars. Clusters 2 and 3 quality scores were significantly predicted by elliptical models and their anti-ideal and ideal quality points were respectively defined.

Keywords: Quality mapping, in-mouth quality, non-volatiles, sensory

INTRODUCTION

Wine quality is a complex concept that is highly influenced by consumer's level of involvement (Charters and Pettigrew, 2006) or expertise (Ballester et al., 2008) among other factors. More highly involved consumers, which have more knowledge and interest in wine, are able to understand and carry out the process of quality evaluation more easily than less involved consumers (Charters and Pettigrew, 2006). With respect to the level of expertise, wine experts have been shown to have aligned quality concepts probably because they regularly attend formal wine tasting sessions, in which they often have technical information about the wines they taste. This leads to a lower variability and higher consistency in responses compared to less experienced consumers (Urdapilleta et al., 2011), who base their evaluations on their personal consumption experience resulting in personalized and subjective responses (Parr et al., 2011). The fact that quality assessment is based on technical winemaking processes for experts and on individual experience for consumers results in a misalignment in the quality concept between wine professionals and low-experienced consumers (Lattey et al., 2010). Furthermore, among consumers, heterogeneity in responses is usually observed, thus segmentation among less experienced consumers is usually required (Aurifeille et al., 2002). On the contrary, experts have been shown to share quality concepts and to be globally consensual in quality assessment (Lattey et al., 2010; Sáenz-Navajas et al., 2011; Varela and Gambaro, 2006). Yet, some studies showed that although experts may agree on the sensory drivers of quality, ratings of overall quality may be participant-dependent (Gawel and Godden, 2008; Scaman et al., 2001).

Understanding the factors that drive quality perception of experts is important as experts' opinions influence consumers' final buying decisions (Marin and Durham, 2007; Marin et al., 2007). This is the reason why there are several works aimed to establish correlations between expert's quality scores and sensory properties of wines. In this context, quality assessments carried out by experts (Lattey et al., 2010; Machado et al., 2011; Sáenz-Navajas et al., 2011; Sáenz-Navajas et al., 2012) or highly-involved wine consumers (Varela and Gambaro, 2006) have been correlated to aroma, taste and in-mouth sensory profiles obtained from trained panels. A consistent correlation between fruity (berry or dried fruit depending on the type of

Complimentary Contributor Copy

wine) and woody aromas as well as astringency or sourness and quality scores given by experts emerge from these studies.

On the contrary, vegetal, undergrowth or animal aroma characters are usually linked to low quality exemplars since they are correlated with defects derived from the unsuitable management of wine during elaboration. In general, it is observed that experts base their quality judgments primarily on the presence/absence of defective or negative odorants, and secondarily on the presence of fruit-sweet positive aromas (Ferreira et al., 2009). Ultimately, in-mouth (Sáenz-Navajas et al., 2011) and color (Sáenz-Navajas et al., 2011) clues are used for creating the final overall quality judgment (Ferreira et al., 2009). Thus, volatile compounds seem to be the main drivers of wine quality, while non-volatiles seem to play a secondary role. Nevertheless, it is widely known that the conventional oenological parameters measured in wineries for controlling quality are mainly based on non-volatile composition such as: reducing sugars, titratable acidity, total polyphenol content, color intensity, malic and lactic acid or alcohol content. Probably because the methodology employed for evaluating non-volatile composition is less-time and money consuming than the sophisticated and costly methods needed for aroma analysis. To solve this apparent paradox between scientific results and oenology practices it seems very important to understand the real contribution of non-volatile composition to quality perception.

External preference mapping has emerged as an interesting multidimensional statistical tool able to describe the characteristics that contribute to the liking of consumers or groups of consumers as well as to identify which products are most liked or disliked (Schlich, 1995; Schlich and Mcewan, 1992). This tool has been successfully extended to the evaluation and understanding of the concept of quality under the name of *quality mapping* (Delgado and Guinard, 2011). This strategy is promising since it relies less on linear assumptions than more common statistical tools such as General Procruster Analysis or Principal Least Square Regression. Introducing non linearity is essential for better understanding the relationships between sensory and chemical data as these relationships are rarely linear (Chambers and Koppel, 2013).

In this context, the first aim of the present work is to establish relationships between in-mouth sensory attributes perceived in wine and non-volatile composition. Then, quality mapping strategies are used to relate non-volatile chemical composition of red wines to experts' quality judgments.

MATERIAL AND METHODS

Wines

Sixteen Spanish red wines from different wine making areas, varieties, vintage and with different aging periods in both bottle and oak barrels were selected to cover a wide range of non-volatile chemical composition expected to induce different sensory properties and thus different quality perception. The detailed list of samples, including wine information and basic compositional oenological parameters, is shown in Table 1.

Complimentary Contributor Copy

Table 1. The sixteen studied commercial wines and their original oenological parameters

| wine code | origin | vintage | grape variety | oak aging (months) | TPH ^a | pH | TA ^b | AV ^c | RS ^d | MA ^e | LA ^f | alcohol (% v/v) |
|-----------|-------------------------|---------|---|--------------------|------------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| MG_V05 | DO Dominio de Valdepusa | 2005 | cabernet sauvignon | 12 | 83.4 | 3.65 | 4.91 | 0.56 | 4.35 | 0.29 | 0.77 | 15.2 |
| AY_C05 | DO Cariñena | 2005 | merlot, tempranillo, cabernet sauvignon | 10 | 74.3 | 3.52 | 5.86 | 0.69 | 3.39 | 0.33 | 1.00 | 14.3 |
| GC_B10 | DO Borja | 2010 | garnacha | 4 | 71.4 | 3.43 | 6.14 | 0.42 | 3.61 | 0.25 | 0.68 | 14.7 |
| RM_R10 | DOCa Rioja | 2010 | graciano | 8 | 66.4 | 3.57 | 5.80 | 0.41 | 2.31 | 0.19 | 1.45 | 14.8 |
| CD_C10 | DO Cariñena | 2010 | garnacha, tempranillo, cabernet sauvignon | 0 | 66.4 | 3.63 | 5.30 | 0.53 | 2.57 | 0.24 | 0.90 | 13.5 |
| CZ_D08 | DO Duero | 2008 | tempranillo | 18 | 62.0 | 3.65 | 5.33 | 0.57 | 1.71 | 0.35 | 2.47 | 13.4 |
| BO_B10 | DO Borja | 2010 | garnacha, syrah, tempranillo | 0 | 61.0 | 3.66 | 5.04 | 0.47 | 2.68 | 0.17 | 1.07 | 14.8 |
| CH_R06 | DOCa Rioja | 2006 | tempranillo, vitura | 0 | 60.3 | 3.88 | 4.45 | 0.62 | 1.77 | 0.20 | 3.30 | 14.1 |
| CT_B07 | DO Borja | 2007 | garnacha | 15 | 59.1 | 3.47 | 5.66 | 0.51 | 4.34 | 0.30 | 0.75 | 13.9 |
| SC_R10 | DOCa Rioja | 2010 | tempranillo, garnacha | 0 | 57.8 | 3.72 | 4.84 | 0.48 | 2.32 | 0.18 | 2.52 | 13.4 |
| SO_C07 | DO Cariñena | 2007 | garnacha, tempranillo, cabernet sauvignon | 18 | 54.9 | 3.53 | 5.66 | 0.75 | 3.81 | 0.18 | 1.21 | 13.8 |
| AR_A08 | DO Arlanza | 2008 | tempranillo | 12 | 53.0 | 3.73 | 5.57 | 0.63 | 1.98 | 0.24 | 2.79 | 13.6 |
| MG_R09 | DOCa Rioja | 2009 | tempranillo, graciano, mazuelo | 12 | 52.3 | 3.64 | 4.92 | 0.52 | 2.09 | 0.21 | 2.11 | 13.7 |
| NJ_R09 | DOCa Rioja | 2009 | tempranillo, garnacha | 18 | 49.7 | 3.65 | 5.35 | 0.66 | 1.67 | 0.18 | 2.14 | 13.6 |
| RH_R10 | DOCa Rioja | 2010 | tempranillo, garnacha | 18 | 49.4 | 3.49 | 5.37 | 0.57 | 2.23 | 0.23 | 1.45 | 14.3 |
| BE_R10 | DOCa Rioja | 2010 | tempranillo, garnacha | 0 | 45.4 | 3.61 | 5.09 | 0.25 | 1.52 | 0.18 | 1.86 | 13.9 |

^aTotal Polyphenol Index. Absorbance at 280nm measured in 10-cm cuvettes.

^bTotal titratable acidity expressed in g L⁻¹ of tartaric acid.

^cVolatile acidity expressed in g L⁻¹ of acetic acid.

^dReducing sugars expressed in g L⁻¹.

^eMalic acid expressed in g L⁻¹.

^fLactic acid expressed in g L⁻¹.

Complimentary Contributor Copy

Quantification of Non-Volatile Molecules

Reagents and Standards

Standards of *t*-aconitic acid, *c*-aconitic acid, syringic acid, protocatechuic acid, protocatechuic acid ethyl ester, *cis*-/*trans*-gallic acid, *cis*-/*trans*-caffeic acid, catechin, epicatechin, myricetin, kaempferol, and quercetin were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Procyanidin B1, procyanidin B2, *cis*-/*trans*-caftaric acid, *cis*-/*trans*-coumaric acid, kaempferol-3-*O*-glucoside, epigallocatechin, epicatechin gallate, epigallocatechin gallate, quercetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-glucuronide, syringetin-3-*O*-glucoside, isorhamnetin-3-*O*-glucoside, quercetin-3-*O*-galactoside, syringetin-3-*O*-galactoside and isorhamnetin were provided from Extrasynthese (Genay, France). Vanillic acid and trifluoroacetic acid (TFA) were supplied by Fluka (Buchs, Switzerland). UPLC-grade acetonitrile, ethanol, methanol and formic acid were purchased in Scharlau (Spain) and ultrapure water was obtained from a Milli-Q system from Millipore (Molsheim, France).

Conventional Oenological Parameter Determination

Total Polyphenol Index (TPI) was estimated as absorbance at 280 nm (Ribéreau-Gayon 1970). Glycerol, malic and lactic acids were determined by enzymatic methods in accordance with official AOAC analysis methods (AOAC 2002). The analysis of reducing sugars, ethanol content, pH, titratable and volatile acidities were determined by Infrared Spectrometry with Fourier Transformation (IRFT) with a WineScan™ FT 120 (FOSS®, Barcelona), which was previously calibrated with the official OIV methods.

Quantification of Individual Non-Volatile Compounds by UPLC-MS

UPLC analyses were performed using a *Waters Acquity Ultra Performance* LC system (Milford, MA, USA) by direct injection of wine samples, previously filtered with 0.22 µm nylon discs. UPLC separation was achieved using an *acquity BEH C18* column (100mm×2.1mm, i.d., 1.7 µm particle size, Waters), kept at 40 °C. Mobile phase flow rate was 0.45 mL min⁻¹ and the injection volume was 7.5 µL. Solvents were (A) water/formic acid (0.1%), and (B) acetonitrile/formic acid (0.1%). The gradient program employed was as follows: 0–4 min, 99–92% A; 4–11 min, 92–70% A; 11–13.5 min, 70–0% A; 13.5–14.5 min, 0–99% A. The UPLC system was coupled to a microTOF II high-resolution mass spectrometer (Bruker Daltonik, Germany) equipped with an Apollo II ESI (electrospray) source and controlled by Bruker Daltonics Data Analysis software. The ESI source was operated in negative mode recorded in the range of *m/z* 150 and 1500. The optimized conditions of the ESI source were as follows: capillary voltage, 3.5 kV; ESI source temperature, 180 °C; desolvation temperature, 200 °C; cone gas flow, 9 L min⁻¹; the nebulizer gas was set at 3 bar and 25 °C. LC-MS was performed operating in both (continuum) MS mode and in MS/MS mode. The spectra were acquired at the speed of 2 scan/second. Fragmentor voltage for MS/MS acquisition mode was 35e V.

The identity assignment of compounds was carried out by comparison of their retention time (*t_R*), MS and MS/MS spectra with those of their respective commercially available standards. Quantification was performed by UPLC-MS and using the response (peak area) ratio for each compound. The calibration curves were prepared by calculating the peak area of the different standards and were used to determine linearity and instrumental detection (LOD)

Complimentary Contributor Copy

and quantification (LOQ) limits. LOD and LOQ were calculated using $3 S/m$ and $10 S/m$ (S is the standard deviation of the response; m is the slope of the calibration curve), respectively. Calibration curves were prepared in methanol. The estimated concentrations of coumaric acid have been expressed as caffeic acid equivalents (mg L^{-1} of caffeic acid) and ferulic acid as caffeic acid equivalents (mg L^{-1} of caffeic acid).

Total Polymeric Proanthocyanidin (PA) Analysis

Wine samples were firstly fractionated by preparative chromatography: Gel Permeation Chromatography (GPC) as described elsewhere (Sáenz-Navajas et al., 2010). Therefore, 2 mL of wine was directly injected in the column, and the flow rate was regulated at 1 mL min^{-1} using a peristaltic pump. Firstly, low molecular-weighted compounds such as organic acids and phenolic compounds were eluted with 60 mL of ethanol/water/trifluoroacetic acid (55:45:0.05, v/v/v). This fraction was discarded and a second fraction containing polymeric PAs was collected by elution with 50 mL of acetone/water (60:40, v/v) and then, brought to dryness under vacuum. This fraction was re-dissolved in 7 mL of methanol and further quantified by the vanillin assay according to the method described elsewhere (Sun et al., 1998) for determining the total content in polymeric PAs.

Protein-Precipitable PA Analysis

Quantification of protein-precipitable PAs was estimated using ovalbumin as the precipitation agent and tannic acid solutions as standards in accordance with a previously described method (Llaudy, et al. 2004).

Sensory Analysis

Descriptive Analysis by a Trained Panel

A total of 52 participants were recruited on the basis of their interest and their availability during 9 months. They were not paid for their participation. For attendance reasons the responses of forty-one panelists (17 males and 24 females from 21 to 57 years old, median = 28) were considered for data analyses.

The panelists received sensory training in eight sessions (about one hour per session) over a period of two weeks. This training period included two phases: a general and a product specific training phase. The wines selected for the general training phase presented intense and easily recognizable taste and astringency properties and included red, white and rosé wines of diverse grape varieties and origins. During the specific training phase panelists became familiar with the type of samples of the study (red Spanish wines with different non-volatile composition).

During a typical training session the panelists became familiar with the rating of six attributes evaluated in-mouth: sweetness, sourness, bitterness, astringency, global intensity and persistence. Different reference standards representative of taste and astringency terms were presented as described elsewhere (Sáenz-Navajas et al., 2011). Then, they had to evaluate three to five different wines by rating tastes and astringency on a 10-point scale (0 = "absence", 1 = "very low" and 9 = "very high"), global intensity on a 9-point scale (1 = "very low" and 9 = "very high") and global persistence on a nine-point scale (1 = "very short" and 9

= “very long”). The session ended with a discussion during which the panel leader compared the taste intensity scores given by panelists to describe each wine.

Trained panelists described wines following the procedure described in Sáenz-Navajas et al. (2011). Fifteen-mL wine samples were presented in dark approved wine glasses (ISO NORM 3591, 1977) labeled with 3-digit random codes and covered by plastic Petri dishes according to a random arrangement. Each panelist completed two sessions (ca. 45 min each) for the analysis of 20 samples (16 samples + 4 replicates: two in each session for evaluating the reproducibility of the panel) involving 10 wines per session. Panelists were asked to rate the sweetness, sourness, bitterness, astringency, global intensity, and global persistence of the samples using the above mentioned structured scales for each wine. Trained panelists rated samples using a sip and spit protocol described by Colonna, et al. (2004).

All wines were served at room temperature and were evaluated in individual booths. Panelists were not informed about the nature of the samples to be evaluated.

Quality Evaluation by Experts

The panel of experts was composed of 21 established winemakers from DOCa Rioja (Spain), twelve females and nine males ranging from 28 to 57 years of age (median = 35).

Each participant completed one session (ca. 20 min each) in individual booths. Experts evaluated the in-mouth wine quality of the 16 samples. They were asked to wear nose clips to avoid aroma interaction. Similarly, to avoid color interactions, samples were presented randomly in coded dark approved wine glasses (ISO NORM 3591, 1977). Samples were covered with a Petri dish and presented at room temperature, once in the proposed order to minimize any bias introduced by the order of presentation. Afterwards, they could taste the samples as many times as they wanted and in any order. Unstructured 15-cm-long scales anchored with “nil” and “high” were used to score quality.

Data Analysis

Sensory Descriptive Analysis

One Principal Component Analysis (PCA) for each of the six attributes evaluated in mouth was run in order to assess judges' agreement. For that, a table with the wines in rows and the judges in columns was employed. The responses of panelists that were spread on the PCA, and thus were not in accordance with the rest of the panel, were kept out of the data analysis.

For assessing the discrimination ability of attributes a one-way analysis of variance (ANOVA), in which wine was the fix factor, was performed on each in-mouth descriptor derived from the trained panel.

Linkage between Sensory and Chemical Composition

Scatter plots were firstly used to visually determine linear, exponential or other possible associations between sensory attributes and non-volatile molecules with known sensory activity (Sáenz-Navajas, et al. 2012). The regression coefficients (R^2) were calculated with EXCELL and only regressions with $R^2 > 0.25$ are reported.

Complimentary Contributor Copy

Cluster Analysis Based on Quality Scores

Hierarchical cluster analysis (HCA) was used to cluster experts using a Euclidian distance dissimilarity matrix created from expert quality scores. HCA was applied to the transposed matrix of expert scores, in which the experts are the rows and the wines are the columns. The lines of this matrix have been previously centered. Ward's method was used in the agglomeration.

Linkage between Chemical Composition and Quality Evaluation:

External Quality Mapping

A first PCA was performed on the mean scores of two replicates of 22 chemical variables, which are expected to be sensory-active. According to the Kaiser law dimensions, an eigenvalue higher than one was retained.

Then, external preference mapping was conducted by regressing the centroid of each cluster derived from quality evaluation onto the significant PCs obtained from chemical variables (independent variables) using XLSTAT. Regressions adjusted to a vectorial model are called "the more, the better", meaning that the ideal quality wine is located as far as possible towards the arrow projected on the PCA. For the elliptical model either an anti-ideal (-) or an ideal (+) quality point is obtained. This means that a maximum or minimum level of chemical response exists, contrary to what is observed in the vectorial model: "more is better".

RESULTS AND DISCUSSION

Performance of Trained Panelists

A PCA run on the in-mouth attributes revealed that judges' projections were grouped in the loading plot (data not shown) for sourness, bitterness and astringency, global intensity and persistence. This indicates that the panel agrees in the interpretation of these terms. On the contrary, for sweetness judges were spread over the loading plot.

These results could be explained by the fact that either the assessors do not interpret similarly the sweet attribute or sensory differences among wines are too small for being perceived by most panelists. This last hypothesis is supported by the fact that the studied samples are all dry red wines with a content in reducing sugars lower than 5 g L⁻¹. Similarly, it is not probable that glycerol (a compound usually linked to sweetness perception in wines) contributes to the sweet taste in most of the studied wines, since only one sample (NJ_R09) presents a concentration higher than its sensory threshold, which is reported to be 7.5 g L⁻¹ in dry red wines (Hufnagel and Hofmann 2008). Hence, sweetness was not considered in subsequent analysis.

In the five one-way ANOVAs calculated with the sensory attributes evaluated in-mouth (sourness, bitterness, astringency, global intensity and persistence), the effect of wine was significant in all cases ($P < 0.001$), which suggests that these attributes are useful in characterizing sensory differences among this set of wines.

Complimentary Contributor Copy

Understanding Global Intensity and Persistence

Simple linear regressions have been calculated between the in-mouth attributes evaluated by the trained panel. Results show that global intensity and persistence are significantly correlated ($R^2 = 0.81$; $P < 0.001$) as has been also observed in other sets of red wines (Sáenz-Navajas et al., 2010; 2011). Besides, both terms are mainly related to the bitter taste ($R^2 = 0.33$ and 0.36 , respectively; $P < 0.05$), differently from previous results (Sáenz-Navajas et al., 2011) that showed that they were especially related to astringency. This result could be derived from the fact that the trained panel reported in (Sáenz-Navajas et al., 2011) did not have aligned concepts for bitter perception, which could be the result of the lack of sensitivity to this taste. This is not surprising as roughly 25% of the human population inherit a trait that renders them unable to detect bitterness (Kim and Drayna, 2005). Thus, the concepts of persistence and global intensity were mainly based in astringency, differently from the panel of the present study which was able to establish differences among the 16 wines in terms of bitterness and thus mainly related these two attributes to the bitter taste.

Sensory Activity

To evaluate the link between chemical composition and sensory differences perceived by the trained panel, two-dimensional regressions on sensory descriptive and chemical data were conducted.

Sourness

Linear regression coefficients show that the sour taste presents exponential relationships with tartaric ($R^2 = 0.36$; $P < 0.05$) and succinic ($R^2 = 0.59$; $P < 0.01$) acids. These results are in relative good accordance with previous literature reporting that tartaric acid measured by means of titratable acidity (Sáenz-Navajas et al., 2010) as well as succinic acid (Biasoto et al., 2010) concentrations are good predictors of the perceived sourness in wines since significant linear correlations are found. However, the present results demonstrate that the predictions are considerably improved by considering an exponential rather than a linear trend as was recently suggested for volatile composition and aroma perception (Chambers and Koppel, 2013). As an example, Figure 1 displays the exponential trend observed between sourness and succinic acid concentration in 12 samples of the 16 wines studied. The presence of four outliers can be the consequence of interactions (perceptual and physicochemical) between succinic acid and other non-volatile or even between volatile compounds as the trained panel evaluated the in-mouth properties in the presence of aroma. These sensory interactions have been reported in real (Sáenz-Navajas et al., 2010) and reconstituted red wines (Sáenz-Navajas et al., 2010) and could also explain the absence of relationships between the sour scores given by the trained panel and non-volatile molecules with known sour taste and present at concentrations well above their sensory threshold such as malic and lactic acids or between variables such as pH, volatile and titratable acidity values (see Table 2). Another possible explanation to the fact that these variables do not present any relationship with the sour taste in the studied wines is that their ranges are not wide enough to be able to create sensory differences among the samples.

Complimentary Contributor Copy

Interestingly, although citric, *c*- and *t*-aconitic acids have been described to be sour, their sensory impact in the studied wines seems to be limited, probably because their presence is below their sensory threshold for the sour taste as it is shown in Table 2.

Table 2. Sensory thresholds and reference for sour compounds, concentration ranges expressed in mg L⁻¹, median and the difference between the maximum (max) and minimum (min) concentration, regression equation and its coefficient (R²) in the studied wines

| | threshold ^c | concentration range | median | max-min | equation ^d | R ² |
|--|------------------------------------|---------------------|--------|---------|--|----------------|
| pH | | 3.4-3.9 | 3.6 | 0.5 | | |
| titratable acidity (g L ⁻¹) ^a | | 4.4-6.1 | 5.3 | 1.7 | | |
| volatile acidity (g L ⁻¹) ^b | | 0.3-0.7 | 0.5 | 0.5 | | |
| tartaric acid (g L ⁻¹) | 0.044 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 0.7-1.2 | 0.9 | 0.5 | 2.74x ² -3.84x+3.81 | 0.36 |
| citric acid (mg L ⁻¹) | 0.35 (Warmke et al., 1996) | 0.0-69 | 17 | 69 | | |
| succinic acid (mg L ⁻¹) | 0.47 (Warmke et al., 1996) | 112-287 | 215 | 174 | 2*10 ⁻⁵ x ² -0.002x+2.36 | 0.59 |
| malic acid (g L ⁻¹) | 0.076 (Warmke et al., 1996) | 0.2-0.4 | 0.2 | 0.2 | | |
| lactic acid (g L ⁻¹) | 1.4 (Warmke et al., 1996) | 0.7-3.3 | 1.5 | 2.6 | | |
| <i>c</i> -aconitic acid (mg L ⁻¹) | 87 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 2.5-3.9 | 3.1 | 1.4 | | |
| <i>t</i> -aconitic acid (mg L ⁻¹) | 87 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 5.1-10.3 | 8.7 | 5.2 | | |

^a Expressed in tartaric acid.

^b Expressed in acetic acid.

^c Calculated for individual compounds in water in the reference (see below) in parenthesis.

^d The independent variable (x) is the concentration of the corresponding compound and the dependent variable is the score given by the trained panel to the sour taste.

Bitterness

There are 15 bitter compounds analyzed, including monomers and dimmers of flavanols, flavonols and ethyl esters of hydroxycinnamic acids. These compounds are at normal concentration ranges reported in Spanish wines (Sáenz-Navajas et al., 2012; Sáenz-Navajas et al., 2010), however they are not likely to contribute to bitterness since their content is well below sensory threshold for bitterness (Table 3).

Interestingly, both succinic acid (R² = 0.62; P < 0.01) and to a lesser extent the alcohol content (R² = 0.55; P < 0.01) present exponential and linear relationships, respectively, with the perceived bitter taste (Table 3). The bitter character of succinic acid has been already reported (Whiting, 1976), however it is the first time that its relevance in the bitterness of wines is suggested. The linkage between alcohol content and bitterness seems reasonable as alcohol has been already proved to enhance perceived bitterness at typical wine levels in both model systems (Fontoin et al., 2008) and real wine samples (Noble, 1994).

Complimentary Contributor Copy

Table 3. Sensory thresholds and reference for bitter compounds (nd: not detected), concentration ranges expressed in mg L⁻¹, median and the difference between the maximum (max) and minimum (min) concentration, regression equation and its coefficient (R²) in the studied wines

| | Threshold (mg L ⁻¹) ^b | range | median | max-min | equation ^c | R ² |
|-------------------------------------|--|------------|--------|---------|--|----------------|
| <i>flavanols</i> | | | | | | |
| catechin | 290 (Scharbert et al., 2004) | 8.72-24.6 | 15.1 | 15.84 | | |
| epicatechin | 270 (Scharbert et al., 2004) | 2.64-22.5 | 6.4 | 19.82 | | |
| procyanidin B1 | 231 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 16.5-36.7 | 27.4 | 20.26 | | |
| procyanidin B2 | 280 | 2.92-23.8 | 8.4 | 20.91 | | |
| procyanidin B3 | 289 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 0.86-1.81 | 1.4 | 0.95 | | |
| <i>flavonols</i> | | | | | | |
| myricetin | 10 (Dadic and Belleau, 1973) | 1.15-8.37 | 5.59 | 7.22 | | |
| quercetin | 10 (Dadic and Belleau, 1973) | 0.15-9.55 | 4.40 | 9.40 | | |
| kaempferol | 20 (Dadic and Belleau, 1973) | <0.03-1.25 | 0.38 | 1.22 | | |
| <i>phenolic acid ethyl esters</i> | | | | | | |
| caffeic acid ethyl ester | 229 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 122-0.04 | 0.30 | 1.18 | | |
| gallic acid ethyl ester | 438 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 177-40.9 | 77.5 | 136 | | |
| <i>p</i> -coumaric acid ethyl ester | 137 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 1.76-0.10 | 0.50 | 1.67 | | |
| vanillic acid ethyl ester | 125 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | nd | | | | |
| ferulic acid ethyl ester | 158 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | nd | | | | |
| protocatechuic acid ethyl ester | 182 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 1.25-0.05 | 0.20 | 1.20 | | |
| syringic acid ethyl ester | 130 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | nd | | | | |
| <i>miscellaneous</i> | | | | | | |
| alcohol content (% v/v) | | 13.4-15.2 | 13.9 | 1.86 | 0.29x-1.2 3*10 ⁻⁵ x ² - | 0.55 0.62 |
| succinic acid | | 112-287 | 215 | 174.73 | 0.01x+3.14 | |

^aAverage degree of polymerization calculated for oligomers of flavanols (from trimers).

^bCalculated for individual compounds in water in the reference (see below) in parenthesis.

^cThe independent variable (x) is the concentration of the corresponding compound and the dependent variable is the score given by the trained panel to the bitter taste.

Complimentary Contributor Copy

Table 4. Sensory thresholds and reference for astringent compounds (nd: not detected), concentration ranges expressed in mg L⁻¹, median and the difference between the maximum (max) and minimum (min) concentration, regression equation and its coefficient (R²) in the studied wines

| | Sensory threshold ^b | range | median | max-min | equation ^c | R ² |
|-----------------------------------|----------------------------------|-------------|--------|---------|--|----------------|
| <i>FLAVANOLS</i> | | | | | | |
| catechin | 119 (Scharbert et al., 2004) | 8.72-24.6 | 15.1 | 15.8 | | |
| catechin gallate | 110 (Scharbert et al., 2004) | <0.03-0.33 | 0.0 | 0.30 | | |
| epicatechin | 270 (Scharbert et al., 2004) | 2.64-22.5 | 6.4 | 19.8 | | |
| epicatechin gallate | 110 (Scharbert et al., 2004) | <0.04-4.29 | 0.5 | 4.25 | | |
| epigallocatechin | 169 (Scharbert et al., 2004) | 0.31-2.18 | 0.9 | 1.87 | | |
| procyanidin B1 | 139 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 16.5-36.7 | 27.4 | 20.2 | 0.058x + 1.32 | 0.63 |
| procyanidin B2 | 110 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 2.92-23.8 | 8.4 | 20.9 | | |
| procyanidin B3 | 139 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 0.86-1.81 | 1.4 | 0.95 | 0.94x + 1.62 | 0.60 |
| IPTs | | 45.4-83.4 | 59.7 | 38.0 | 0.030x + 1.21 | 0.78 |
| Protein-precipitable PAs | | 0.20-0.62 | 0.4 | 0.42 | 4.95x ² - 1.49x + 2.72 | 0.62 |
| Polymeric PAs | | 161-723 | 281 | 561 | -1*10 ⁸ x ² + 0.0033x + 2.21 | 0.47 |
| <i>PHENOLIC ACIDS</i> | | | | | | |
| gallic acid | 45 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 35.50-146.8 | 60.5 | 111 | | |
| protocatechuic acid | 32 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 1.32-16.6 | 2.5 | 15.3 | | |
| caffeic acid | 13 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 3.28-13.7 | 5.4 | 10.4 | | |
| caftaric acid | 5 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 42.6-148 | 69.9 | 105.5 | | |
| coumaric acid | 23 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 1.09-4.42 | 2.1 | 3.33 | | |
| coutaric acid | 25 (Okamura and Watanabe, 1981) | 5.69-44.30 | 17.0 | 38.6 | | |
| vanillic acid | 53 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 1.45-11.5 | 4.9 | 10.1 | | |
| ferulic acid | 13 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 0.72-3.75 | 1.3 | 3.03 | | |
| syringic acid | 52 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 2.75-11.4 | 4.9 | 8.60 | | |
| <i>PHENOLIC ACID ETHYL ESTERS</i> | | | | | | |
| protocatechuic ethyl ester | 9 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | <0.06-1.25 | 0.2 | 1.20 | | |
| caffeic ethyl ester | 69 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 0.04-1.22 | 0.3 | 1.18 | | |
| ferulic ethyl ester | 15 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | nd | | | | |

Complimentary Contributor Copy

| | Sensory threshold ^a | range | median | max-min | equation ^b | R ² |
|----------------------------|----------------------------------|------------|--------|---------|-----------------------|----------------|
| gallic ethyl ester | 37 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 40.9-177 | 77.5 | 136 | | |
| vanillic ethyl ester | 25 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | nd | | | | |
| coumaric ethyl ester | 27 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 0.10-1.76 | 0.50 | 1.67 | | |
| syringic ethyl ester | 4 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | nd | | | | |
| <i>flavonols</i> | | | | | | |
| quercetin-3-O-galactoside | 0.2 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | <0.02-0.51 | 0.2 | 0.49 | | |
| quercetin-3-O-glucoside | 1.0 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | <0.02-2.43 | 0.1 | 2.41 | | |
| isorhamnetin-3-O-glucoside | 1.1 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | <0.03-0.75 | 0.0 | 0.72 | | |
| myricetin | 10 (Dadic and Belleau, 1973) | 1.15-8.37 | 5.6 | 7.22 | | |
| | Sensory threshold ^a | range | median | max-min | equation ^b | R ² |
| quercetin | 10 (Dadic and Belleau, 1973) | 0.15-9.55 | 4.4 | 9.40 | | |
| kaempferol | 20 (Dadic and Belleau, 1973) | <0.03-1.25 | 0.4 | 1.22 | | |
| <i>MISCELLANEOUS</i> | | | | | | |
| alcohol content % (v/v) | 0.1 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 13.4-15.2 | 13.9 | 1.86 | | |
| c-acetic acid | 0.1 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 2.50-3.89 | 3.1 | 1.39 | | |
| t-acetic acid | 0.1 (Hufnagel and Hofmann, 2008) | 5.10-10.3 | 8.7 | 5.20 | 0.058x + 1.32 | 0.63 |

^aAverage degree of polymerization calculated for oligomers of flavanols (from trimers).

^bCalculated for individual compounds in water in the reference (see below) in parenthesis.

^cThe independent variable (x) is the concentration of the corresponding compound and the dependent variable is the score given by the trained panel to astringency.

Complimentary Contributor Copy

Astringency

A significant positive linear trend ($R^2 = 0.78$; $P < 0.001$) is observed between the total polyphenol content (measured by the TPI) and the astringency scored by the trained panel (Table 4). Among this total polyphenolic composition both protein-precipitable PAs ($R^2 = 0.62$; $P < 0.01$) and polymeric PAs (higher than dimers) ($R^2 = 0.47$; $P < 0.05$) present exponential trends with astringency (Table 4). Non-polymerized flavanols such as monomers and dimers are not expected to be important drivers of the perceived astringency in this set of wines as all of them are below their sensory threshold (Table 4), however procyanidins B1 ($R^2 = 0.63$; $P < 0.01$) and B3 ($R^2 = 0.60$; $P < 0.01$) show a positive correlation with astringency. This could be an indirect link derived from the formation of more polymerized flavanols (i.e., protein-precipitable PAs and polymeric PAs), which takes place from its oligomers. This suggests that wines with higher concentrations in dimers of flavanols such as B1 or B3 would lead to a higher formation of polymerized PAs, which have been demonstrated to be the main drivers of sensory astringency in wines (Sáenz-Navajas et al., 2012).

Among phenolic acids only the derivatives formed by esterification such as caffeic and coumaric acids as well as gallic acid ethyl ester, the flavonols quercetin-3-*O*-glucoside and quercetin-3-*O*-galactoside, and both *c*- and *t*-aconitic acids are at concentrations above their sensory threshold (Table 4), however no systematic relationship with astringency was found.

Apart from the polyphenolic composition, which is widely accepted to be the main driver of astringency in wines, the content in ethanol has been reported to be also an important factor increasing astringency in model solutions (Fontoin et al., 2008), however in real wine samples this effect has not been found (Fischer et al., 1994), what is in accordance with the data derived from the present study. Similarly, *t*-aconitic acid has been repeatedly found to be an important driver of astringency in red wines (Hufnagel and Hofmann, 2008; Sáenz-Navajas et al., 2012) as it is observed with the present set of wines since it presents an exponential trend ($R^2 = 0.35$; $P < 0.05$) with astringency sensation evaluated by the trained panel.

Quality Assessment by Experts

A cluster analysis calculated on the 21 experts' scores has yielded three main clusters as shown in Figure 2. The first cluster is constituted by 7 experts/judges (*J*), the second and the third clusters are both formed by six and eight experts, respectively. The fact that expert quality judgments based on exclusively in-mouth properties derives in three main clusters demonstrates the heterogeneity among experts in the in-mouth quality construct. Previous research has shown that for experts the in-mouth properties seem to be less relevant than aroma stimuli, when evaluating wine quality (Sáenz-Navajas et al., 2011). This could have led to develop dissimilar criteria when evaluating exclusively in-mouth sensations. This is further supported by the results of an independent study (data not shown) carried out with the same wines and the same panel of experts, where quality was firstly evaluated based exclusively on orthonasal aroma and then using all stimuli (i.e., as experts usually do in normal wine tasting). Results showed that under both conditions, experts shared the same quality concept and the global quality assessment was highly correlated to the orthonasal-

Complimentary Contributor Copy

based quality ($R^2 = 0.60$; $P < 0.01$), while in-mouth-based quality is far less correlated ($R^2 = 0.40$; $P < 0.05$).

Correlation between Chemical and Quality Variables:

External Quality Mapping

Non-volatile molecules with known sensory activity in wine were quantified (Sáenz-Navajas et al., 2012). Chemical compounds that are below their sensory threshold in all wines are not expected to have a significant sensory impact on the studied wines. These compounds are eliminated from further data analyses. Exceptionally, procyanidins B1 and B3 are considered as they present significant linear correlations with astringency, which has been found to be related to wine quality (Sáenz-Navajas et al., 2011). Similarly, reducing sugars are also included since there is evidence that they are involved in quality perception even when their content is below sensory threshold for sweet taste (Sáenz-Navajas et al., 2012, Sáenz-Navajas, et al., 2010). The compounds above their sensory threshold such as glycerol, tartaric, malic and lactic acids, procyanidins B1 and B2, quercetin-*O*-3-glucoside, quercetin-*O*-3-galactoside, coumaric, caffeic and *t*-aconitic acid, gallic acid ethyl ester are considered for PCA. Besides, variables showing significant correlations with bitterness such as alcohol content or with astringency such as IPTs, polymeric PAs or protein-precipitable PAs are also taken into account. Conventional oenological variables pH, titratable and volatile acidities, which are widely used in wineries for quality controls, are also considered in the PCA.

To sum up a total of 22 chemical variables are submitted to PCA. According to the Kaiser criterion the first six principal components (PC), which account for more than 84% of the original variance, are considered. Table 5 shows the correlations between the chemical parameters and the first six PCs.

The average quality scores obtained for the three clusters of consumers are further regressed onto the six PCs obtained from the PCA calculated across wines with the chemical variables. Figures 3a and 3b show the quality maps where clusters are projected on PC1-PC2 and PC1-PC3, respectively. Figures 4a and 4b show the projections of the wines onto the PC1-PC2 and PC1-PC3 subspaces, respectively. These maps allow identifying the wines that are considered by experts to be of high quality as well as the chemical drivers of quality.

The arrow representing cluster 1 (formed by 33% of the panel) in Figures 3a and 3b indicates that the quality evaluated by the participants of this cluster is adjusted to a vector model (linear relationship). The coefficients of the model are shown in Table 6. This model is called “the more, the better” suggesting that for experts fitted by this model, the ideal quality wine is located as far as possible towards the arrow. This means that the chemical variables correlated with this vector have to be maximized for achieving high quality wines. The correlation matrix calculated between the six significant PCs of the PCA and the quality scores of clusters shows a significant negative correlation between PC5 and cluster 1 ($r = -0.60$). This suggests that chemicals weighting heavily on this PC may be more critical to quality perception for cluster 1. Hence, high contents in protein-precipitable PAs and in *c*-aconitic acid result in higher quality scores. Both compounds have been reported to be important drivers of astringency in wines (Sáenz-Navajas et al., 2012). Thus, this result is well in accordance with previous studies carried out with Spanish (Sáenz-Navajas et al., 2011), Australian (Lattey et al., 2010) and Uruguayan (Varela and Gambaro, 2006) experts showing that perceived astringency of wines is positively correlated with quality perception. A positive correlation is observed between PC3 (explains 13.5% of the original variance) and

Complimentary Contributor Copy

cluster 1 ($r = 0.42$), which is positively correlated with IPTs, caftaric acid and quercetin-3-*O*-galactoside. Beside, a minor negative correlation is observed between PC6 and cluster 1 ($r = -0.32$). This PC is positively correlated with succinic acid, which suggests that high concentrations of this acid are related to low quality ratings for this cluster of experts. However, given the low correlation coefficient and the hardly 7% of total variance explained by this PC6, its role in quality perception seems to be limited.

Table 5. Correlation coefficients between chemical variables and the six first factors (PCs) obtained from the PCA. Significant correlations are marked in bold

| | PC1 | PC2 | PC3 | PC4 | PC5 | PC6 |
|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| IPTs | -0.448 | -0.508 | 0.531 | -0.242 | -0.043 | 0.336 |
| volatile acidity | 0.002 | -0.533 | -0.345 | -0.390 | 0.346 | -0.033 |
| reducing sugars | -0.730 | -0.273 | 0.336 | -0.349 | -0.030 | -0.159 |
| alcohol content | -0.651 | 0.155 | 0.377 | -0.161 | -0.192 | 0.458 |
| tartaric acid | -0.233 | 0.235 | 0.189 | 0.795 | 0.220 | 0.034 |
| succinic acid | -0.534 | 0.416 | -0.340 | -0.057 | 0.118 | 0.603 |
| glycerol | -0.474 | 0.722 | -0.116 | -0.013 | -0.224 | 0.121 |
| protein-precipitable PAs | -0.181 | -0.428 | 0.220 | -0.210 | 0.520 | 0.492 |
| polymeric PAs | 0.560 | -0.567 | 0.013 | -0.119 | -0.299 | -0.168 |
| procyanidin B1 | 0.501 | -0.525 | 0.319 | 0.453 | 0.167 | 0.128 |
| procyanidin B3 | 0.295 | -0.386 | 0.432 | 0.636 | 0.097 | 0.118 |
| <i>t</i> -aconitic acid | 0.595 | 0.414 | 0.363 | -0.082 | 0.089 | 0.078 |
| titratable acidity | -0.707 | -0.234 | -0.150 | 0.434 | -0.055 | -0.256 |
| pH | 0.806 | 0.056 | 0.060 | -0.247 | 0.072 | 0.411 |
| malic acid | -0.353 | -0.701 | -0.256 | -0.058 | -0.384 | 0.186 |
| lactic acid | 0.905 | -0.012 | -0.280 | -0.005 | 0.066 | 0.229 |
| caftaric acid | -0.030 | -0.152 | 0.646 | -0.190 | -0.549 | -0.035 |
| coutaric acid | 0.820 | -0.225 | -0.029 | -0.137 | -0.316 | 0.059 |
| <i>c</i> -aconitic acid | 0.166 | 0.198 | 0.537 | -0.201 | 0.610 | -0.307 |
| quercetin-3- <i>O</i> -galactoside | 0.058 | 0.346 | 0.861 | 0.199 | -0.198 | 0.003 |
| quercetin-3- <i>O</i> -glucoside | -0.310 | -0.006 | 0.270 | -0.677 | 0.272 | -0.322 |
| galic acid ethyl ester | -0.630 | -0.545 | -0.099 | 0.392 | 0.189 | -0.007 |

The groups of experts that constitute cluster 2 (33% of the panel) and cluster 3 (38%) are significantly fitted by the elliptical model ($P < 0.05$ in both cases) with an anti-ideal (-) and an ideal (+) quality point, respectively (the coefficients of both models are shown in Table 6). This means that a maximum or a minimum level of chemical composition exists, contrary to what is observed in the vector model: "more is better". Thus, experts belonging to cluster 2 have an anti-ideal point on high negative values for PC1. This anti-ideal quality wine is high in reducing sugars, alcohol content, titratable acidity and gallic acid ethyl ester, while low in pH-values, *t*-aconitic, coutaric and lactic acids. Besides, the anti-ideal point is on the origin of the map for PC2 and PC3, which can be seen as wines with medium chemical composition driven by both PCs. This means that the anti-ideal quality wine would have average concentrations in volatile acidity, glycerol, polymeric PAs, malic acid as well as in IPTs, caftaric acid and quercetin-3-*O*-galactoside.

Complimentary Contributor Copy

Table 6. Coefficients of the quality models obtained for the three clusters of experts. The centroid of the quality scores calculated for each cluster is the predicted variable (Y) and the independent variables are the first three PCs derived from the PCA calculated on the 22 non-volatile molecules with sensory activity. The equation is: $Y = a + b_1PC1 + b_2PC2 + b_3PC3 + c_1PC1^2 + c_2PC2^2 + c_3PC3^2$

| | Intercept (a) | b ₁ | b ₂ | b ₃ | c ₁ | c ₂ | c ₃ |
|-------------------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Cluster 1 (n = 7) | 0.000 | 0.049 | -0.103 | 0.235 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| Cluster 2 (n = 6) | -1.201 | 0.015 | 0.444 | 0.025 | 0.115 | 0.028 | 0.135 |
| Cluster 3 (n = 8) | 1.056 | -0.137 | 0.002 | -0.051 | -0.034 | -0.135 | -0.123 |

Table 7. Compositional data for the wines closest (CT_B07, SO_C07) to the ideal point defined for cluster 3, maximum, average and minimum values in the studied set of wines

| | CT_B07 | SO_C07 | Max | average | min |
|---|--------|--------|------|---------|------|
| reducing sugars (g L ⁻¹) | 4.34 | 3.81 | 4.35 | 2.65 | 1.52 |
| glycerol (g L ⁻¹) | 6.53 | 6.83 | 7.58 | 6.70 | 5.03 |
| alcohol content (% v/v) | 13.9 | 13.8 | 15.2 | 14.1 | 13.4 |
| pH | 3.47 | 3.53 | 3.88 | 3.61 | 3.43 |
| titratable acidity (g L ⁻¹) | 5.66 | 5.66 | 6.14 | 5.33 | 4.45 |
| volatile acidity (g L ⁻¹) | 0.51 | 0.75 | 0.75 | 0.54 | 0.25 |
| malic acid (g L ⁻¹) | 0.30 | 0.18 | 0.35 | 0.23 | 0.17 |
| lactic acid (g L ⁻¹) | 0.75 | 1.21 | 3.30 | 1.65 | 0.68 |
| IPTs (Abs) | 59.1 | 54.9 | 83.3 | 60.4 | 45.4 |
| polymeric PAs (g L ⁻¹) | 304 | 162 | 723 | 308 | 161 |
| procyanidin B1 (mg L ⁻¹) | 21.4 | 22.1 | 36.7 | 26.6 | 16.5 |
| caftaric acid (mg L ⁻¹) | 126 | 70.8 | 148 | 82.2 | 42.6 |
| coumaric acid (mg L ⁻¹) | 15.2 | 16.4 | 44.3 | 18.9 | 5.7 |
| quercetin-3-O-galactoside (mg L ⁻¹) | 0.20 | 0.11 | 0.51 | 0.24 | 0.02 |

For cluster 3 an ideal point is found near the wines SO_C and CT_B. Interestingly, both wines are among the most aged wines (vintage 2007). Table 7 shows the chemical composition of these two close-to-ideal quality wines (together with the maximum, minimum and average values calculated on the 16 studied red wines). Both wines have in common that they present higher than average content in reducing sugars and titratable acidity. On the contrary, these quality wines have lower than average values for: alcohol content, pH, lactic acid, IPTs, polymeric PAs, procyanidin B1, coumaric acid and quercetin-3-O-galactoside.

CONCLUSION

Results show that experts have heterogeneous quality concepts when exclusively in-mouth properties are evaluated. External quality mapping after segmentation of consumers by hierarchical clustering is presented as a powerful tool able to disclose the main chemical drivers of quality.

Complimentary Contributor Copy

Three clusters of experts responding to different in-mouth quality criteria are reported. Interestingly, experts were best fit by the elliptical model (71% of the panel) and to a lesser extent by the vector (29%) model. The significant elliptical models obtained for most of the experts (two clusters out of three) suggest that it exists a maximum or minimum level of chemical composition better than “the more the better” suggested by the traditionally used vector model. To our knowledge, this is the first time that quality mapping techniques are used to evaluate quality perception of wines by a panel of experts and it is presented as a promising statistical tool able to combine both sensory and chemical disciplines.

ACKNOWLEDGMENTS

The research reported in this article was financially supported by the Spanish Ministry of Education (AGL2010-22355-CO2-01/02) and *Instituto de Estudios Riojanos* (La Rioja Government, Spain). M.P.S.N. acknowledges the Spanish Education Ministry (M.E.C.) for her postdoctoral fellowship and J.M.A. the Navarra Government for his predoctoral grant. Authors want also to thank experts and panelists for their participation in the sensory sessions with interest and diligence.

REFERENCES

- AOAC (2002). Official Methods of Analysis. Method 993.05: L-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice.
- Aurifeille, J.M., Quester, P.G., Lockshin, L., Spawton, T., (2002). Global vs international involvement-based segmentation - A cross-national exploratory study. *Int. Market. Rev.* 19, 369-386.
- Ballester, J., Patris, B., Symoneaux, R., Valentin, D., (2008). Conceptual vs. perceptual wine spaces: Does expertise matter? *Food Qual. Pref.* 19, 267-276.
- Biasoto, A.C.T., Catharino, R.R., Sanvido, G.B., Eberlin, M.N., da Silva, M.A.A.P., (2010). Flavour characterization of red wines by descriptive analysis and ESI mass spectrometry. *Food Qual. Pref.* 21, 755-762.
- Colonna, A.E., Adams, D.O., Noble, A.C., (2004). Comparison of procedures for reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 10, 26-31.
- Chambers, E., Koppel, K., (2013). Associations of Volatile Compounds with Sensory Aroma and Flavor: The Complex Nature of Flavor. *Molecules* 18, 4887-4905.
- Charters, S., Pettigrew, S., (2006). Product involvement and the evaluation of wine quality. *Qual. Market Res.* 9, 181-193.
- Dadic, M., Belleau, G., (1973). Polyphenols and beer flavor. *Proceeding of the American Society of Brewing Chemistry* 4, 107-114.
- Delgado, C., Guinard, J.X., (2011). How do consumer hedonic ratings for extra virgin olive oil relate to quality ratings by experts and descriptive analysis ratings? *Food Qual. Pref.* 22, 213-225.

Complimentary Contributor Copy

- Ferreira, V., San Juan, F., Escudero, A., Cullere, L., Fernandez-Zurbano, P., Sáenz-Navajas, M.P., Cacho, J., (2009). Modeling quality of premium Spanish red wines from gas chromatography-olfactometry data. *J. Agric. Food Chem.* 57, 7490-7498.
- Fischer, U., Boulton, R.B., Noble, A.C., (1994). Physiological factors contributing to the variability of sensory assessments: Relationships between saliva flow rate and temporal perception or gustatory stimuli. *Food Qual. Pref.* 5, 55-64.
- Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.-L., Glories, Y., (2008). Effect of pH, ethanol and acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine solution. *Food Qual. Pref.* 19, 286-291.
- Gawel, R., Godden, P.W., (2008). Evaluation of the consistency of wine quality assessments from expert wine tasters. *Aust. J. Grape Wine Res.* 14, 1-8.
- Hufnagel, J.C., Hofmann, T., (2008). Orosensory-directed identification of astringent mouthfeel and bitter-tasting compounds in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 56, 1376-1386.
- Hufnagel, J.C., Hofmann, T., (2008). Quantitative reconstruction of the nonvolatile sensometabolome of a red wine. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9190-9199.
- Kim, U.K., Drayna, D., (2005). Genetics of individual differences in bitter taste perception: lessons from the PTC gene. *Clin. Genet.* 67, 275-280.
- Lathey, K.A., Bramley, B.R., Francis, I.L., (2010). Consumer acceptability, sensory properties and expert quality judgements of Australian Cabernet Sauvignon and Shiraz wines. *Aust. J. Grape Wine Res.* 16, 189-202.
- Llaudy, M.C., Canals, R., Canals, J.M., Rozes, N., Arola, L., Zamora, F., (2004). New method for evaluating astringency in red wine. *J. Agric. Food Chem.* 52, 742-746.
- Machado, B., Graça, A., Hirson, G., Heymann, H., (2011). Revealing the secret preferences for top-rated dry red wines through sensometrics. 16th International Oenology Symposium Bolzano, Italy, 145-149.
- Marin, A.B., Durham, C.A., (2007). Effects of wine bottle closure type on consumer purchase intent and price expectation. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 192-201.
- Marin, A.B., Jorgensen, E.M., Kennedy, J.A., Ferrier, J., (2007). Effects of bottle closure type on consumer perceptions of wine quality. *Am. J. Enol. Vitic.* 58, 182-191.
- Noble, A.C., (1994). Bitterness in wine. *Physiol. Behav.* 56, 1251-1255.
- Okamura, S., Watanabe, M., (1981). Determination of phenolic cinnamates in white wine and their effect on wine quality. *Agric. Biol. Chem.* 45, 2063-2070.
- Parr, W.V., Mouret, M., Blackmore, S., Pelquest-Hunt, T., Urdapilleta, I., (2011). Representation of complexity in wine: Influence of expertise. *Food Qual. Pref.* 22, 647-660.
- Ribéreau-Gayon, P., (1970). Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges. *Chimie Analytique* 52, 627-631.
- Sáenz-Navajas, M.P., Avizcuri, J.M., Ferreira, V., Fernández-Zurbano, P., (2012). Insights on the chemical basis of the astringency of Spanish red wines. *Food Chem.* 134, 1484-1493.
- Sáenz-Navajas, M.P., Echavarrí, F., Ferreira, V., Fernández-Zurbano, P., (2011). Pigment composition and color parameters of commercial Spanish red wine samples: linkage to quality perception. *Eur. Food Res. Technol.* 232, 877-887.
- Sáenz-Navajas, M.P., Fernández-Zurbano, P., Ferreira, V., (2012). Contribution of nonvolatile composition to wine flavor. *Food Rev. Int.* 28, 389-411.

Complimentary Contributor Copy

- Sáenz-Navajas, M.P., Fernandez-Zurbano, P., Ferreira, V., Dizey, M., (2010). Characterization of taste-active fractions in red wine combining HPLC fractionation, sensory analysis and ultra performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta* 673, 151-159.
- Sáenz-Navajas, M.P., Fernandez-Zurbano, P., Martín-Lopez, C., Ferreira, C., (2011). Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality perception. *Aust. J. Grape Wine Res.* 17, 9-19.
- Sáenz-Navajas, M.P., Fernandez-Zurbano, P., Tao, Y.S., Dizey, M., Ferreira, V., (2010). Relationship between nonvolatile composition and sensory properties of premium Spanish red wines and their correlation to quality perception. *J. Agric. Food Chem.* 58, 12407-12416.
- Sáenz-Navajas, M.P., Ferreira, V., Campo, E., Fernandez-Zurbano, P., Valentin, D., (2010). An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and astringency in wine. *Food Chem.* 121, 1139-1149.
- Sáenz-Navajas, M.P., Gonzalez-Hernandez, M., Campo, E., Fernandez-Zurbano, P., Ferreira, V., (2012). Orthonasal aroma characteristics of Spanish red wines from different price categories and their relationship to expert quality judgements. *Aust. J. Grape Wine Res.* 18, 268-279.
- Scaman, C.H., Dou, J., Cliff, M.A., Yuksel, D., King, M.C., (2001). Evaluation of wine competition judge performance using principal component similarity analysis. *J. Sens. Stud.* 16, 287-300.
- Scharbert, S., Holzmann, N., Hofmann, T., (2004). Identification of the astringent taste compounds in black tea infusions by combining instrumental analysis and human bioresponse. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3498-3508.
- Schlich, P., (1995). Preference mapping: Relating consumer preferences to sensory or instrumental measurements. In: *Bioflavour 95: Analysis - Precursor Studies - Biotechnology*, Eds. P. Etievant and P. Schreier pp. 135-150.
- Schlich, P., Mcewan, J.A., (1992). Preference Mapping - a Statistical Tool for the Food-Industry. *Sci. Aliment.* 12, 339-355.
- Sun, B.S., Ricardo-da-Silva, J.M., Spranger, and I., (1998). Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *J. Agric. Food Chem.* v46, 4267-4274.
- Urdapilleta, I., Parr, W.V., Dacremont, C., Green, J., (2011). Semantic and perceptive organisation of Sauvignon blanc wine characteristics Influence of expertise. *Food Qual. Pref.* 22, 119-128.
- Varela, P., Gambaro, A., (2006). Sensory descriptive analysis of Uruguayan Tannat wine: Correlation to quality assessment. *J. Sens. Stud.* 21, 203-217.
- Warmke, R., Belitz, H.D., Grosch, W., (1996). Evaluation of taste compounds of Swiss cheese (Emmentaler). *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* 203, 230-235. doi: 10.1007/bf01192869.
- Whiting, G.C., (1976). Organic-acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages - Review. *J. Inst. Brew.* 82, 84-92.

Complimentary Contributor Copy

Manuscript Number: FOODRES-D-14-01002R1

Title: EFFECT OF POST-BOTTLING STORAGE AND INITIAL OXYGEN DOSE ON THE SENSORY PROPERTIES OF SPANISH RED WINES

Article Type: Research Article

Keywords: wine; post-bottling storage; wine ageing; sensory analysis

Corresponding Author: Dr Purificación Fernández-Zurbano, Dr

Corresponding Author's Institution:

First Author: María-Pilar Sáenz-Navajas, Ph.D.

Order of Authors: María-Pilar Sáenz-Navajas, Ph.D.; Jose Miguel Avizcuri; Vicente Ferreira; Purificación Fernández-Zurbano

Abstract: Sixteen commercial Spanish red wines selected to cover a wide range of sensory properties were stored at 25°C for six months in air-tight containers. Five different samples of each of the 16 wines (total of 80 samples) containing different initial doses of oxygen (between 0 and 30 mg L⁻¹) were prepared in 1150-mL amber bottles, mimicking real and extreme bottling situations. The 16 initial samples (before storage) and the 80 stored samples (16 wines x 5 oxygen doses) were submitted to sensory analysis. Sensory changes related to post-bottling storage and initial oxygen dose were evaluated by means of discriminant and characterization sensory strategies.

The ageing process in the bottle has as general pattern of aroma evolution translated into significant increases in black fruits, dried fruits, woody, lactic and stronger increases in cooked vegetables and spicy notes. Remarkable departures to this general pattern have been observed, which can be related to the initial sensory properties of the wines and to their basic polyphenolic composition. The effect of post-bottling storage in bitterness is wine dependent, while global decreases in both global intensity and persistence evaluated in mouth are observed. Discrete increases in astringency are observed for wines with the lowest initial astringent scores. Little impact of the initial oxygen dose in the in-mouth sensory properties is reported.

Logroño, May 29, 2014

Dear Editor,

Changes suggested by the editor have been carried out and highlighted in red. The manuscript entitled “**Effect of post-bottling storage and initial oxygen dose on the sensory properties of Spanish red wines**” is submitted for being considered for publication in Food Research International.

The present work is new and original. All authors have contributed significantly and are in agreement with the content of the manuscript.

The novel results obtained in this work provides with useful methodological tools and very important results for the understanding wine aging.

Yours sincerely,

Dr. Purificación Fernández-Zurbano

Response to editor's comments

Associate Editor's Comments:

Before the manuscript can be considered for publication in Food Research International the authors should revise the terms selected for describing the sensory methodology. The authors refer to "Descriptive sensory analysis", which is a standard methodology, but used a different approach for evaluating the sensory characteristics of the wines. I recommend the authors to use the term "Sensory analysis" or "Sensory characterization". The authors can refer to Lawless & Heymann (2010) for more details.

The term "descriptive sensory analysis" has been changed along the text as the editor recommends

Action: done. See changes highlighted in red

Also, in the Materials and Methods section the authors claim that eighty bottles of wine were considered (Page 6 line 52) but it is not clear where they came from. In Line 28 they state that they considered 5 wine samples and introduced 5 different oxygen concentrations to each of them. Please clarify.

On the one hand, 16 initial wine samples were firstly analysed and called original wines. Besides, five bottles for each of these 16 wine samples were injected with 5 different levels of oxygen (16 wines * 5 oxygen doses = 80 bottles). These 80 samples were stored during 6 months at 25 °C and finally sensory analysed

Action: this point has been clarified (L27-28; L132)

Finally, the authors should standardize the format of the references included in the text.

Action: done, format of references has been revisited and highlighted in red

HIGHLIGHTS

- The effect of post-bottling storage on the sensory properties of red wines is studied
- Sixteen red wines were stored at 25°C for six months in air-tight containers
- The effect of initial oxygen dose on the sensory properties of red wines is studied
- The ageing process in the bottle has as general pattern of aroma evolution
- Initial sensory properties and polyphenolics influence wine aroma evolution

1 **EFFECT OF POST-BOTTLING STORAGE AND INITIAL OXYGEN DOSE ON THE**
2
3 **SENSORY PROPERTIES OF SPANISH RED WINES**
4
5
6
7

8 **María-Pilar Sáenz-Navajas¹, José-Miguel Avizcuri², Vicente Ferreira¹, Purificación**
9 **Fernández-Zurbano^{2*}**
10
11

12
13 ¹*Laboratory for Analysis and Enology, Department of Analytical Chemistry, Faculty of*
14 *Sciences, University of Zaragoza, Zaragoza, Spain*
15
16

17
18 ²*Instituto de Ciencias de la Vid y el Vino(UR-CSIC-GR), Department of Chemistry, University*
19 *of La Rioja, Logroño, La Rioja, Spain*
20
21

22
23
24 ***corresponding author: puri.fernandez@unirioja.es**
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **Abstract**
2

3 Sixteen commercial Spanish red wines selected to cover a wide range of sensory properties
4 were stored at 25°C for six months in air-tight containers. **Five different samples of each of**
5 **the 16 wines (total of 80 samples)** containing different initial doses of oxygen (between 0 and
6 30 mg L⁻¹) were prepared in 1150-mL amber bottles, mimicking real and extreme bottling
7 situations. The 16 initial samples (before storage) and the 80 stored samples (16 wines x 5
8 oxygen doses) were submitted to sensory analysis. Sensory changes related to post-bottling
9 storage and initial oxygen dose were evaluated by means of discriminant and **characterization**
10 sensory strategies.
11

12 The ageing process in the bottle has as general pattern of aroma evolution translated into
13 significant increases in black fruits, dried fruits, woody, lactic and stronger increases in
14 cooked vegetables and spicy notes. Remarkable departures to this general pattern have been
15 observed, which can be related to the initial sensory properties of the wines and to their basic
16 polyphenolic composition. The effect of post-bottling storage in bitterness is wine dependent,
17 while global decreases in both global intensity and persistence evaluated in mouth are
18 observed. Discrete increases in astringency are observed for wines with the lowest initial
19 astringent scores. Little impact of the initial oxygen dose in the in-mouth sensory properties is
20 reported.
21

22 **Keywords:** wine; post-bottling storage; wine ageing; sensory analysis
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1. Introduction

1.1. Literature review

The bottle storage period is critical in the wine value chain, since once the wine is bottled there are no further possibilities to control and much less to amend any sensory deviation. Although the pace of chemical changes during bottling storage slows down in relative terms, there are yet an ageing wide range of chemical reactions taking place, many of them capable of generating different sensory properties –both positive and negative– which could ultimately have a relevant effect on the consumer acceptance of the product (O’Brien, Francis, & Osidacz, 2009). Unfortunately, it is nowadays not possible to foresee the evolution of the sensory properties of bottled wines set aside for ageing and hence it is also not plausible to inform the consumer about the optimum consumption moment for reaching the desired sensory properties.

During bottle ageing, wine sensory changes in colour, aroma or in-mouth properties have been described. In red wines, increases in the yellow colour (absorbance at 420nm) and hue have been observed (Chira, Jourdes, & Teissedre, 2012; Chira, Pacella, Jourdes, & Teissedre, 2011). Besides, decreases in fresh fruit aroma nuances (He, Zhou, Peck, Soles, & Qian, 2013) or astringency (Gómez-Gallego, Gómez-García-Carpintero, Sánchez-Palomo, González Viñas, & Hermosín-Gutiérrez, 2013; McRae et al., 2012) as well as increases in the sour taste (Gómez-Gallego et al., 2013) have been reported. The evolution of wine sensory properties during bottling have shown to be dependent on different factors such as the temperature of storage (Hopfer, Buffon, Ebeler, & Heymann, 2013) or the exposition of wine to different oxygen concentrations provided along the ageing period (Caille et al., 2010).

Storage temperature plays an important role in general in all chemical reaction kinetics, such as those of browning and copigmentation (Czibulya, Kollar, Nikfardjam, & Kunsagi-Mate,

1 2012). Wine composition is important and so far, higher polyphenolic contents prevent
2
3 premature browning ageing (Czibulya et al., 2012). Temperature is widely reported to
4
5 accelerate the browning of white wines (Fernández-Zurbano et al., 1995) or the decrease in
6
7 colour intensity of certain red wines due to the precipitation of high molecular weight colour
8
9 matter (Hopfer et al., 2013). The storage of bottled wine at 40°C has shown to give rise to
10
11 aroma attributes such as cooked vegetables, roasted or dried fruit in Cabernet Sauvignon
12
13 (Hopfer et al., 2013) and Chardonnay wines (Hopfer, Ebeler, & Heymann, 2012) after six and
14
15 three months, respectively (Hopfer et al., 2013). Similarly, Merlot and Cabernet Sauvignon
16
17 wines (Robinson et al., 2010) seem to develop such aroma descriptors even after three weeks
18
19 of storage at 40°C. Moreover, decreases in the intensity of aromas of fresh fruit, berries,
20
21 cherry, citrus, floral or fresh vegetables in a Cabernet Sauvignon wine (Hopfer et al., 2013)
22
23 have been also linked to the appearance of those oxidation nuances.
24
25
26
27
28
29

30 On the other hand, together with the temperature and storage time, the presence of oxygen
31
32 during bottle storage is an important factor able to influence the development of wine sensory
33
34 properties. The oxygen concentration in bottle can be partially adjusted through the use of
35
36 different closures or containers, although one of the most important sources of oxygen is the
37
38 bottling process (Lopes et al., 2009). The use of bag-in-box has shown to result in wines with
39
40 more intense cooked vegetables, earthy or dried fruit aromas and lower in red fruit, grapefruit,
41
42 cherry, fresh vegetables, floral or black pepper nuances than glass bottles (Hopfer et al., 2013;
43
44 Hopfer et al., 2012) given their higher oxygen permeability. Notwithstanding, most of the
45
46 work aimed to study the evolution of the sensory properties of the wines in the presence of
47
48 different amounts of oxygen is carried out using different closures capable of generating
49
50 different oxygen transfer rates (OTR) in white (Godden et al., 2001; Hopfer et al., 2012), rosé
51
52 (Guaita et al., 2013; Wirth et al., 2012) or red wines (Caille et al., 2010; Gambuti, Rinaldi,
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Ugliano, & Moio, 2013; Puertolas, Saldana, Condon, Alvarez, & Raso, 2010). In white wines,
2
3 it is observed that closures with higher OTRs are prone to generate oxidised, cooked fruit,
4
5 toasted, honey and blue-like aroma nuances (Godden et al., 2001; O'Brien et al., 2009), while
6
7 lower OTRs result in increases in citrus, fresh fruit or reductive aromas such as cabbaged or
8
9 flint. In rosé and red wines higher OTRs (0.3 vs 9.5 mg L⁻¹ of oxygen) tend to generate wines
10
11 with higher colour intensity and hue as well as in red fruit o caramel aroma but lower in
12
13 animal nuances (Caille et al., 2010; Wirth et al., 2012). However, the impact of oxygen in the
14
15 in-mouth sensory properties seems to be limited. An increase in the total oxygen exposure is
16
17 able to decrease astringency in a wine with low polyphenolic content, while no effect was
18
19 observed in a higher polyphenolic wine, demonstrating that the effect of oxygen exposure
20
21 depended on wine composition (Gambutì et al., 2013). This fact attests to the importance of
22
23 polyphenolic content in the evolution of the sensory properties of real bottled wines, and is
24
25 supported by studies carried out with model solutions showing that certain compounds are
26
27 able to control the levels of dissolved oxygen (simply acting as antioxidants) through
28
29 oxidative phenomena (Chinnici, Sonni, Natali, & Riponi, 2013).

30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
Despite being aware of the importance of both the stage of ageing in the bottle and the initial
composition of the wine in the evolution of its sensory properties, so far the studies that have
addressed this issue have been conducted with a limited number of samples, often with one
(Godden et al., 2001; Guaita et al., 2013; **Hopfer et al., 2013, 2012**), two (Gambutì et al.,
2013; Wirth et al., 2012) or at most four (Caille et al., 2010) wines, with low variability in the
initial composition of wine samples, which seriously limits the generalizability of results and
the possibility of extracting behavioural patterns. Because of this, in the present work a
comprehensive study of the evolution of the sensory properties of a relatively large number of
red wines (6 months at 25 ° C in air-tight containers spiked with different levels of initial

1 oxygen) with a significant variability in their initial sensory properties and polyphenolic
2
3 composition has been carried out. It is hypothesised that the evolution of the sensory
4
5 properties of wines in the bottle is dependent on the initial sensory properties of wines as well
6
7 as on their polyphenolic composition.
8
9

10 11 12 **2. Methods and Materials**

13 14 15 2.1. Wines

16
17 Sixteen different Spanish red wines from different wine making areas were selected to cover a
18
19 wide range of polyphenolic content (TPI). The detailed list of samples, including sample
20
21 information and basic compositional data obtained following standard operating procedures,
22
23 is shown in Table 1.
24
25

26
27 **Five different samples of each of the 16 wines** were prepared in 1150-mL-amber bottles
28
29 supplied by Sigma-Aldrich (Aldrich Sure-Seal bottle) and manipulated in a purification glove
30
31 box equipped with a vacuum chamber (Jacomex, Dagneux, France). This system assured a
32
33 work overpressure with controlled atmosphere (<1 ppm of oxygen and water). The amber
34
35 bottles were closed with a silicone septum, a crimp cap and an external screw cap. Through
36
37 the internal septum, known amounts of oxygen were introduced in the headspaces with a
38
39 Hamilton Gastight Syringe (Samplelock™ syringe). Introduced oxygen volumes were
40
41 equivalent to the theoretical concentrations of 0, 1.1, 3.1, 10.6 and 30.4 mg of oxygen per litre
42
43 of wine. This range covers the normal levels introduced during normal wine bottling
44
45 operations and extend it to two unrealistic extreme situations (0 and 30.4, equivalent this last
46
47 one to 4-5 saturations of wine). Finally, the resulting eighty 1150-mL-bottles were double
48
49 sealed into plastic bags with known oxygen permeability (< 9 cc / m² 24 h) and stored in the
50
51 dark at 25°C for six months in an incubator (Climas GROW 360). The overall permeability of
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 the systems was independently checked with control samples containing a solution of indigo
2
3 carmine following the procedure developed by Lopes et al. (2009). Results suggested that the
4
5 total external atmospheric oxygen that penetrated into the samples after the 6 months of
6
7 storage was 0.9 ± 0.6 mg, which can be considered air-tight enough for the purposes of the
8
9 experiment.
10

11 2.2. Conventional oenological parameters

12
13 Conventional oenological parameters of wines were determined in accordance with official
14
15 OIV practices. Malic and lactic acids were determined by enzymatic methods in accordance
16
17 with official AOAC analysis methods (AOAC, 2002). Total Polyphenol Index (TPI) was
18
19 estimated as absorbance at 280 nm (Ribéreau-Gayon, 1970). The analysis of reducing sugars,
20
21 ethanol content, pH, reducing sugars, titratable and volatile acidities were determined by
22
23 Infrared Spectrometry with Fourier Transformation (IRFT) with a WineScanTM FT 120
24
25 (FOSS[®], Barcelona), which was previously calibrated with the official OIV methods.
26
27
28
29
30
31

32 2.3. Discriminant sensory analysis: Triangle tests

33
34 Discriminant sensory analyses were carried out with the aim of reducing the number of
35
36 samples submitted to **sensory characterization**. Therefore, triangle tests were performed to
37
38 evaluate sensory differences between samples stored during 6 months at 25°C but with the
39
40 addition of intermediate oxygen doses: 1.1 mg L^{-1} vs 10.6 mg L^{-1} . Therefore, three wines (two
41
42 of them were the same sample) labelled with 3-digit random codes and covered by plastic
43
44 Petri dishes according to a random arrangement were presented to a total of 40 expert subjects
45
46 (eight triads per subject). Fifteen-mL wine samples were presented in dark approved wine
47
48 glasses (ISO NORM 3591, 1977). Participants were asked to taste samples and to note the
49
50 different sample based in both aroma and in-mouth properties. Only when the triangle test
51
52 was significant ($P < 0.05$), both oxygen doses (1.1 mg L^{-1} and 10.6 mg L^{-1}) were submitted to
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 further **characterization sensory analysis**, otherwise the 10.6-dose was discarded. According to
2
3 Roessler, Warren, and Guymon (1948), 11 out of 20 participants had to find the correct
4
5 different sample in order to consider the test significant ($P < 0.05$).
6
7

8 *2.4. Characterization sensory analysis*

9

10 A total of 52 participants were recruited on the basis of their interest and their availability
11 during 9 months. They were not paid for their participation. For attendance reasons and
12 according to the reproducibility index (see panel consistency in data analysis section)
13 proposed by Campo, Do, Ferreira, and Valentin (2008), the responses of forty-one panellists
14 (17 males and 24 females from 21 to 57 years old, median = 28) were considered for data
15 analyses.
16
17

18 *2.4.1. Panel training*

19

20 The panellists received sensory training in eight sessions (ca. one hour per session) over a
21 period of 9 weeks. This training period included two phases: a general and a product specific
22 training phase. Wines selected for the general training phase presented intense and easily
23 recognizable taste and astringency properties and included red, white and rosé wines of
24 diverse grape varieties and origins. During the specific training phase panellists became
25 familiar with the type of samples of the study (red Spanish wines with different levels of
26 oxidation and polyphenol content).
27

28 During a typical training session the panellists became familiar with the specific vocabulary
29 of an initial list of 110 aroma descriptors (Sáenz-Navajas, Fernandez-Zurbano, Martin-Lopez,
30 & Ferreira, 2011) and with the rating of seven attributes evaluated in-mouth: sweetness,
31 acidity, bitterness, astringency, global intensity and persistence. Therefore, different reference
32 standards representative of aroma, taste and astringency terms were presented as described
33 elsewhere (Sáenz-Navajas et al., 2011). Then, they had to evaluate three to five different
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 wines by describing their odour properties (orthonasally) by choosing up to five descriptors
2
3 from the list and by rating tastes and astringency on a on a 10-point scale (0 = “absence”, 1 =
4
5 “very low” and 9 = “very high”), global intensity on a 9-point scale (1 = “very low” and 9 =
6
7 “very high”) and global persistence on a nine-point scale (1 = “very short” and 9 = “very
8
9 long”). The session ended with a discussion during which the panel leader compared the
10
11 aroma descriptors and the taste intensity scores given by panellists to describe each wine.
12
13 During the training, the panellists modified the initial list of terms by eliminating those terms
14
15 they considered irrelevant, ambiguous or redundant and by adding additional attributes they
16
17 considered pertinent. At the end of the training, the list included 113 terms.
18
19
20
21
22

23 *2.4.2. Sensory analysis characterization*

24

25 Trained panellists described wines following the procedure described in Campo et al. (2008)
26
27 and Saenz-Navajas et al. (2011). Fifteen-mL wine samples were presented in dark approved
28
29 wine glasses (ISO NORM 3591, 1977) labelled with 3-digit random codes and covered by
30
31 plastic Petri dishes according to a random arrangement. Each panellist completed eleven
32
33 sessions (ca. 45 min each) for the analysis of 90 samples (86 samples + 4 replicates for
34
35 evaluating the reproducibility of the panel) involving 8-9 wines per session. Panellists were
36
37 asked to smell each wine, describe their odour by choosing a maximum of five attributes from
38
39 the list of 113 according to the citation frequency method. Then, they were asked to rate
40
41 sweetness, sourness, bitterness, astringency, global intensity, and global persistence of the
42
43 samples using the above mentioned structured scales for each wine. Trained panellists rated
44
45 samples using a sip and spit protocol described by Colonna, Adams, and Noble (2004).
46
47
48
49
50

51 All wines were served at room temperature and were evaluated in individual booths.
52
53 Panellists were not informed about the nature of the samples to be evaluated.
54
55
56

57 *2.5. Data Analysis*

58
59
60
61
62
63
64
65

1 2.5.1. *Selection of significant aroma terms derived from the sensory description*
2

3 Thirty-four individual terms (out of 113) were determined to be used with frequencies of
4 citation (FC) higher than those expected by chance according to chi-square distribution as
5 described elsewhere (Sáenz-Navajas, Gonzalez-Hernandez, Campo, Fernández-Zurbano, &
6 Ferreira, 2012). Among them, individual terms belonging to the same sensory family category
7 were combined in order to obtain more general terms reaching higher FCs and higher ranges.
8 A total of 10 combined terms presented a significant chi-square distribution and were: black
9 fruits (formed by combining two individual terms: black fruit, blackberry), red fruits
10 (combination of red fruits, strawberry, cherry), dried fruits (combination of dried fruits,
11 prune), woody (combination of wood, fresh wood, smoky), roasted (combination of toasted
12 bread, coffee, caramel), spicy (combination of spices, liquorice, black pepper, vanilla),
13 cooked vegetables (combination of vegetal, vegetables, olive, cooked potato), herbal
14 (combination of fresh tobacco, thyme, menthol/fresh), animal (combination of animal,
15 leather) and lactic (combination of lactic, butter).
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 2.5.2. *Panel performance*
35

36 For evaluating the individual performance of panellists in the orthonasal aroma description, an
37 average reproducibility index (Ri) was calculated for each of the panellists from duplicate
38 assessments of four wines. The minimum Ri required to keep a judge response was set at 0.20
39 (Campo et al., 2008). Besides, a contingency table, in which rows were the wines (including
40 the replicates) and columns were the terms, was submitted to CA to explore the global
41 reproducibility of the panel by evaluating the projection of wine replicates on the two-
42 dimensional CA map
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 One PCA for each of the six attributes evaluated in mouth was run in order to assess judges'
54 agreement. For that, a table with the wines in rows and the judges in columns was employed.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 2.5.3. *Multivariate analysis on sensory characterization data*

2
3 *Aroma description.* Correspondence Analysis (CA) was performed on the contingency table
4 encoded in a wine x aroma attributes table, in which each cell represents the average FC for a
5 term in a wine. In order to choose the number of factors that should be retained, dimensions
6 with an eigenvalue higher than the mean eigenvalue (Kaiser law) were calculated for CA
7 spaces. The statistical software package used for these analyses was SPAD (version 5.5,
8 CISIA-CESRESTA, Montreuil, France). Hierarchical cluster analysis (HCA) with the Ward
9 criteria was applied to the factorial coordinates of the wines in the space defined by the CA
10 calculated with the aroma description of the 16 non-stored commercial wines. The clusters
11 identified by truncating the tree diagram were consolidated by aggregation around mobile
12 centres. The terms that best characterised each of the clusters were identified by using the
13 test-value parameter (Morineau, Lebart, L., Piron, M., 1995). The test-value corresponds to a
14 statistical criterion akin to a standardized variable (zero mean and unit variance). Significance
15 is obtained when the absolute test-value is ≥ 1.96 , which corresponds to an error threshold of
16 5%. Ranking of the terms according to their test-values provides a quick characterization of
17 each cluster (Morineau, 1984).

18 For the 16 wines (global storage effect) and for wines belonging to the same cluster (storage
19 effect for each cluster) differences between the average FC for each term after storage
20 (average of oxygen doses) and before storage were calculated. Significances of these
21 differences were evaluated with t-tests.

22 *In-mouth description.* Two-way ANOVA by judges and storage (before and after 6 months of
23 storage) were calculated to test for global differences (with the sixteen wines) and for
24 differences for each wine related to average in-mouth attributes (bitterness, astringency,
25 global intensity and persistence).

3. Results

3.1. Panel performance of the sensory panel

The overall panel reproducibility in the orthonasal aroma description is explored using the projection of wine replicates on a two-dimensional CA map (data not shown). Results show that wine replicates are close to each other on the map, thus the panel is globally reproducible when describing wines. Concerning individual reproducibility, the maximum value of the Ri index (which varies from 0 to 1) is 0.93, which corresponds to 93% of common terms between the two replicates for a subject. The minimum value is 0.20 (median = 0.58). The responses from all subjects are considered since all of them show a $R_i > 0.2$ (Campo et al., 2008).

A PCA run on the in-mouth attributes (judges in columns and wines in rows) reveals that judges' projections are grouped in the loading plot (data not shown) for bitterness, astringency, global intensity and persistence. This indicates that the panel agrees in the interpretation of these terms. On the contrary, for sweetness and sourness judges are spread over the loading plot, which could be explained by the fact that either the assessors do not interpret similarly these attributes or the sensory differences among wines for these sensory properties are too small for being perceived by most panellists. Hence, sweetness and sourness are not further considered in subsequent analyses.

3.2. Sensory properties of wines before storage

3.2.1. Orthonasal aroma properties

According to Kaiser criterion, the first three dimensions are retained, which explain more than 77% of the original variance. The projection of wines and aroma terms into CA plots can be seen in Figure 1 (Factor 1 vs Factor 2) and Figure 2 (Factor 1 vs Factor 3). The interpretation of the dimensions of the CA map is established by statistical indicators measuring the

1 contributions of each term to the inertia on such dimensions. Only those attributes showing a
2
3 contribution higher than the average are considered. The first factor, explaining more than
4
5 34% of the original variability, is mainly defined by attributes such as cooked vegetables
6
7 (21%), followed by roasted (17%), herbal (16%), woody (12%) and animal (11%) terms. This
8
9 factor opposes cooked vegetables, animal and woody (plotted on the left part of the plane) to
10
11 herbal and roasted aromas (plotted on the right). The second dimension, explaining almost
12
13 29% of the total variance, opposes red fruit (contributes 23% to factor 2) and cooked
14
15 vegetables (24%), which are plotted on the upper part of Figure 1, to woody (24%) and
16
17 roasted (16%) attributes (plotted on the lower part). The third factor (accumulates more than
18
19 14% of the original variability) opposes attributes such as animal (contributes 38% to factor
20
21 3) and herbal (21%), which are projected on the upper part of Figure 2, to spicy (22%) aroma
22
23 terms (plotted on the lower part).

24
25
26
27
28
29 Hierarchical clustering calculated on all CA factors reveals that the most natural partition of
30
31 the tree diagram (Figure 3) contains a total of four main clusters, formed by three, three, five
32
33 and five wines, respectively. For each cluster, the closest wine to the centre of gravity is
34
35 identified as the most typical exemplar of the cluster, and therefore, of the related sensory
36
37 characteristics (Figure 3). These samples are GC_B10 (cluster 1), SO_C07 (cluster 2),
38
39 BO_B10 (cluster 3) and RB_R06 (cluster 4). Figure 1 shows that the first factor opposes
40
41 cluster 2 (cooked vegetables and animal) to cluster 4 (herbal and roasted). This factor could
42
43 be partly related to wine oxidation: wines with highest oxidation-related aromas are projected
44
45 on the left part of the plots (Figures 1 and 2) and just in the opposite side are wines with
46
47 lowest oxidation level among this set of wines. The second factor opposes cluster 1 to cluster
48
49 3, and thus woody-related wines to non-wooded wines. This is in accordance with the fact that
50
51 wines belonging to cluster 3 (CD_C10, BO_B10, CH_R10, BE_R10, SC_R10) and plotted on
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 the upper part of Figure 1 are the youngest wines and have not been aged in oak barrels as
2
3 shown in Table 1. Chemically, it can be seen that all wines in cluster 1 and 2 have TPI above
4
5 54, have been aged in oak wood and have a ratio TPI/CI above 4.4.
6
7

8 *3.2.2. In-mouth sensory properties*

9

10 According to one-way ANOVA with repeated measurements (judges considered as repetition)
11
12 the effect of wine was significant for bitterness, astringency, global intensity and persistence
13
14 ($P < 0.001$), which suggests that these attributes are useful in characterising sensory
15
16 differences among this set of wines.
17
18

19
20 Global intensity and persistence are significantly correlated ($R^2 = 0.81$; $P < 0.001$) as has been
21
22 also observed in other sets of red wines (Sáenz-Navajas et al., 2011; Sáenz-Navajas, Ferreira,
23
24 Campo, Fernandez-Zurbano, & Valentin, 2010). Besides, both terms are also related to the
25
26 bitter taste of this set of studied wines ($R^2 = 0.33$ and 0.36 , respectively; $P < 0.05$), in clear
27
28 contrast to previous results (Sáenz-Navajas et al., 2011) that showed that they were especially
29
30 related to astringency. This result could be derived from the fact that the trained panel in
31
32 Sáenz-Navajas et al. (2011) did not have an aligned concept for bitter perception, which could
33
34 be the result of the lack of sensitivity to this taste. This is not surprising as roughly 25% of the
35
36 human population inherit a trait that renders them unable to detect bitterness (Kim & Drayna,
37
38 2005).
39
40

41
42 Leaving aside the terms global intensity and persistence, which are multidimensional terms
43
44 related to bitter taste in this set of wines, Table 2 shows wine scores for both bitterness and
45
46 astringency. Both in-mouth properties are not significantly correlated ($F = 0.70$; $P = 0.42$),
47
48 suggesting that they are independent sensory variables. Bitter scores range from 4.05 to 5.78
49
50 (difference = 1.73) and are positively correlated to wine alcohol content ($R^2 = 0.55$; $P < 0.01$).
51
52

53
54 This is well in accordance with bibliography (Colonna et al., 2004; Fontoin, Saucier,
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Teissedre, & Glories, 2008). Astringency scores range from 3.78 to 6.12 (difference = 2.43)
2
3 and present a significant positive linear correlation ($R^2 = 0.78$; $P < 0.001$) with the total
4
5 polyphenol content (measured by the TPI). Thus, differences in TPI are translated into
6
7 differences in sensory astringency in this set of wines.
8
9

10 *3.3. Sensory properties of wines after bottle storage*

11 *3.3.1. Selection of wine samples. Triangle tests*

12
13 Given the high number of samples (16 initial wines and 80 stored samples with different
14
15 oxygen doses: 0-4) and to rationally reduce the number of wines to be sensory described, 16
16
17 different discriminatory triangle tests were carried out for evaluating sensory differences
18
19 between the wines submitted to intermediate oxygen doses (dose 1 vs dose 3).
20
21

22
23 Triangle tests show that in most wines (eleven out of sixteen) oxygen doses 1 and 3 generate
24
25 sensory differences (Table 3). Only for wines GC_B10, CH_R10, AR_A08, RB_R06 and
26
27 CT_B07 no significant sensory differences between both oxygen doses are observed. Thus,
28
29 for these five wines, only doses 0, 2 and 4 were further sensory described (intermediate doses
30
31 1 and 3 were omitted).
32
33
34
35
36

37 *3.3.2. Orthonasal aroma properties*

38
39 *General changes caused by the storage.* Taking all the samples together, the ageing process in
40
41 the bottle has as general consequence translated in significant increases in several aroma
42
43 attributes. These results are shown in Table 4 and as can be seen, there are significant
44
45 increases in the scores of spicy (+5.8), cooked vegetables (+4.3), woody (+2.2), lactic (+2.0),
46
47 black fruits (+1.8) and dried fruits (+1.6). There are however some relevant departures from
48
49 this general behaviour depending on the cluster which will be further commented.
50
51
52
53

54
55 *Sensory evolution of cluster 1 (woody and spicy).* The projection of the three wines belonging
56
57 to cluster 1 (GC_B10, MG_V05, CT_B07) together with the aroma terms can be seen in
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Figure 4 and the average increments or decreases in FC scores are given in Table 4. Samples
2
3 belonging to this cluster (characterised by woody and spicy attributes) experiment consistent
4
5 sensory changes during bottling storage, some of them also consistently related to the initial
6
7 doses of oxygen introduced. As Figure 4 reveals, all the six-month old samples are displaced
8
9 to the right of their corresponding initial non-stored exemplars, so that the storage period has
10
11 as consequence a clear increment on the first dimension of the CA plot, regardless of the
12
13 initial dose of oxygen received by the samples. This means that after six months of storage,
14
15 the samples are considerably less woody (6.7 citations less in average), and considerably
16
17 richer in black (+6.3 citations), red (+4.3) and dried fruits (+3.6), cooked vegetables (+5.9),
18
19 herbal (+3.0) and lactic (+1.6) characters (see Table 4). It is important to remark that the
20
21 decrease in woody notes is against the general behaviour and so far it is only observed in the
22
23 wines from this cluster. There is also no increase in spicy notes in this cluster. Interestingly,
24
25 decreases in woody aroma are positively related to the polyphenolic content of wines
26
27 (measured by TPI). Thus, wines with higher TPI (GC_B10 and MG_V05) experiment higher
28
29 decreases in this aroma term. Just the opposite is observed for dried fruits, higher increases in
30
31 this aroma are linked to lower TPI (CT_B07 experiments the highest increase). Interestingly,
32
33 the rest of aroma changes do not seem to be related to the polyphenolic content (measured by
34
35 TPI) present in wines.

36
37
38 The effects of the initial dose of oxygen introduced in samples are less important in relative
39
40 terms, but also seem to be consistent. Leaving aside sample MG_V05_3 which developed a
41
42 precipitate which could affect its orthonasal characteristics, the three wines which received
43
44 minimum amounts of oxygen (MG_V05_0, GC_B10_0, CT_B07_0) are on the left with
45
46 respect to their corresponding samples which received higher levels. The effects are not
47
48 dramatic and the exact effect of the dose level depends on the sample (Figure 4). Sample
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 GC_B10 experiments a gradual shift, translated into sensory changes, from right (dose 0) to
2
3 left (dose 4). For sample CT_B07 the change is only obvious at highest levels (CT_B07_4),
4
5 while for sample MG_V05 the opposite is observed.
6
7

8 *Sensory evolution of cluster 2 (cooked vegetables and animal).* The projection of the three
9
10 wines belonging to cluster 2 (CZ_D08, AY_C05, S0_C07) together with the aroma terms can
11
12 be seen in the CA plot of Figure 5 and the average changes in FC scores in Table 4. Before
13
14 bottling, these samples are mainly characterised by cooked vegetables and animal attributes.
15
16 The changes induced by the six-month storage period are again very important but not all of
17
18 them are general. The strongest and most surprising change is the virtual disappearance of the
19
20 animal character of SO_C07 sample which passes from 12 to an average of 4.5 citations. In
21
22 contrast, the animal character of sample CZ_D08, which is much similar to that of SO_CO7,
23
24 remained unaltered.
25
26
27
28

29
30 As for the general changes (Table 4), the most striking observation is the general decrease of
31
32 the cooked vegetables note (-2.4 citations in average), which is noticeable in the three samples
33
34 of the cluster, although again is clearer in the SO_CO7 sample (-4.0). This change is specific
35
36 of samples from this cluster which are also the single ones for which dried fruit notes do not
37
38 clearly increase. A second relevant change also specific to samples in this cluster is the
39
40 relevant increase of roasted notes (+5.1 in average). Other less intense changes are similar to
41
42 those observed in cluster 1, such as increases in black (+3.9) and red fruits (+2.4), lactic
43
44 (+2.5) and herbal (+1.9). The FC for spicy notes also increases (+2.9) in this cluster.
45
46
47
48

49
50 In comparison to these changes directly linked to the ageing period, Figure 5 reveals that in
51
52 this case changes caused by the initial level of oxygen are much more subtle and it is really
53
54 difficult to identify any clear trend.
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 *Sensory evolution of cluster 3 (red and black fruit).* The projection of the five wines
2
3 belonging to cluster 3 (CD_C10, BO_B10, CH_R10, SC_R10, BE_R10) together with the
4
5 aroma terms into a bi-dimensional CA plot can be seen in Figure 6 and the average increment
6
7 in FC in Table 4. These samples, which are the youngest ones, are mainly characterised by red
8
9 and black aroma nuances and by an absence in woody-related aroma properties.

10
11
12 The most important sensory changes suffered by all the members of this cluster (just
13
14 apparently less clear for the CD_C10 sample) are summarized in the shifts towards the right
15
16 part of the CA plane (Figure 6), implying higher FC of cooked vegetables (+7.0), woody (5.1)
17
18 and spicy (5.5) attributes in detriment of red fruit aromas (-2.0). This is precisely the specific
19
20 difference of sample CD_C10 and the main reason because it appears on the right part of the
21
22 plane, the red fruit level of this sample strongly increases (+5). Other minor but also
23
24 noteworthy changes of samples in this cluster are slight increases in dried fruit (+1.9), lactic
25
26 (+1.9) and herbal (+1.9) characters. Interestingly, sample BE_R10, which presents the lowest
27
28 TPI among all the studied wines, shows the highest increase in the FC for dried fruit among
29
30 wines belonging to this cluster (changes in FC ranging from 2 to 8 units). This link between
31
32 low TPI and higher increases in dried fruit aroma has been already observed for wine CT_B07
33
34 of cluster 1.

35
36
37 As happened in cluster 2, the pattern of effect of the presence of oxygen at bottling is rather
38
39 erratic. Only in two of the samples (CD_C10 and CH_R10) there is a clear increment of the
40
41 cooked vegetal attribute with the initial level of oxygen, followed in the former by a clear
42
43 decrease on the red fruit notes.

44
45
46 *Sensory evolution of cluster 4 (herbal and roasted).* The projection of the five wines
47
48 belonging to cluster 4 (AR_A08, RB_R10, MC_R09, RM_R10, NJ_R09) together with the
49
50 aroma terms into a bi-dimensional CA plot can be seen in Figure 7 and the average increment
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 on FC are given in table 4. These samples are mainly characterised by herbal (term formed by
2 the combination of fresh tobacco, thyme, menthol/fresh) and roasted aromas. This cluster
3 experiments the most important sensory changes during bottling storage among the set of
4 studied wines. These samples show important shifts towards the right part of the plane, given
5 their important increases in the FC of spicy (+11 in average) and more modest increases in
6 cooked vegetables (+5.5), woody (+5.6) lactic (+2.2) and dried fruit (+1.7) and decreases in
7 herbal aroma (-5.3). The most different pattern is followed by RM_R10 for which in fact
8 woody does not increase while cooked vegetables and dried fruit strongly increase (+7.5 and
9 +5.6, respectively).

10 The role of initial oxygen is again less clear, although the level of red fruit significantly
11 decreases with the initial level of oxygen ($P < 0.05$) and the plot reveals that in general,
12 samples with higher initial levels of oxygen tend to be displaced towards the up-right part of
13 the plot, suggesting slight increments in cooked vegetables notes and slight decreases in lactic
14 nuances.

15 *3.3.3. In-mouth sensory properties*

16 Taking all the samples together, the ageing process in the bottle does not have a general
17 impact in bitterness as no significant differences are observed between the scores before and
18 after the 6 months of storage (Table 5). This is attributed to the fact that changes in bitterness
19 seem to be wine-dependent as it experiments a significantly increase for five wines (SC_R10,
20 CD_C10, BO_B10, CT_B07, CZ_D08), while it decreases for other four samples (RM_R10,
21 MC_R09, AR_A08, MG_V05). On the contrary, a surprising general significant increase in
22 astringency ($P < 0.01$, Table 6) is observed for this set of wines. This general trend is
23 attributed to significant increases in four wines: RM_R10, BO_B10, RB_R06 and SO_C07

1 (Table 6). Interestingly, these four wines present the lowest astringency before storage (Table
2
3 2).
4

5
6 A global significant decrease in global intensity evaluated in-mouth is observed ($P < 0.01$,
7
8 Table 7), which is explained by significant decreases in three wine samples (GC_B10,
9
10 MG_V05, AY_C05). Interestingly, these samples present the highest polyphenolic content
11
12 (TPI ranging from 71.4 to 83.4). Moreover, a tendency ($P < 0.1$, Table 8) of a global decrease
13
14 in persistence is shown, which is significant in exclusively two wine samples (AR_A08,
15
16 AY_C05).
17

18
19
20 Regarding the impact of initial oxygen dose on in-mouth attributes, only significant changes
21
22 in the astringency perception of three wines are observed. These samples are CD_C10 ($F =$
23
24 3.27 ; $P = 0.013$), MC_R09 ($F = 2.96$; $P = 0.021$) and BO_B10 ($F = 2.87$; $P = 0.025$).
25
26

27 28 **4. Discussion**

29
30 The two major aims of the present work were to evaluate the evolution of the sensory
31
32 properties of red wines during the post-bottling stage and to assess the influence on this
33
34 evolution of the initial level of oxygen provided to the wine.
35
36

37
38 Results show that there is a general pattern of evolution of the orthonasal sensory properties
39
40 of red wines during its ageing in the bottle. This general pattern is mainly characterized by
41
42 slight increases in black fruits, dried fruits, woody, lactic and stronger increases in cooked
43
44 vegetables and spicy notes. The work has also shown that there are remarkable departures to
45
46 this general pattern that can be related to the initial sensory properties of the wines and that
47
48 some of them seem also to be related to the basic wine polyphenolic composition.
49
50

51
52 For instance, the wines initially characterized by high levels of woody and spicy notes (cluster
53
54 1), logical consequences of long periods of straightforward wood ageing, evolve in the bottle
55
56 towards lesser levels of woody notes and show strong increases in black and red fruits and in
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 herbal notes. This pattern of behaviour is very often observed (and searched for) in
2
3 winemaking, and backs the colloquial knowledge that woody notes tend to blend much better
4
5 with time.
6

7
8 Wines showing initially high levels of animal and cooked vegetables notes (cluster 2), logical
9
10 consequences in this case of long periods of rather complicated (instead of straightforward)
11
12 wood ageing, with potential oxidation or Brett-related problems, evolve in the bottle in a
13
14 rather different way, characterized by a slight reduction of the cooked vegetables note, null
15
16 increments of dried fruit and woody notes and strong increments of roasted nuances.
17

18
19 On the contrary, non-wooded wines initially characterized by red and black fruits notes with
20
21 low levels of the notes related to ageing (woody character, animal and cooked vegetables),
22
23 evolve in the bottle increasing strongly their woody and cooked vegetable notes, and
24
25 decreasing their fruity character.
26
27

28
29 Finally wood aged wines which by different reasons have not developed much woody
30
31 character, but herbal and roasted notes (cluster 4), evolve in the bottle increasing spectacularly
32
33 the spicy and woody characters in detriment of their herbal and roasted notes.
34
35

36
37 As can be observed, there is a general trend and a series of peculiarities that most often are
38
39 linked to the decrease of a character that was at high level and to the increase of others that at
40
41 the beginning were just marginally present. It must then be observed that the bottle ageing
42
43 period is far from being a static storage, but is a rather dynamic process which bears, at least
44
45 in part, some similarities to a slow chemical equilibrium. In a chemical equilibrium all the
46
47 reagents or products that are in excess according to the mass law decrease their
48
49 concentrations, with concomitant increases in the opposite products or reagents. The truth
50
51 however, is that we are far from having a clear idea about the different equilibria in which all
52
53 the aroma compounds could be taking place. In fact, those equilibria could be pure chemical
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 equilibria, such as sulphite addition processes, or ester/acid hydrolyses; but they could also be
2
3 physicochemical equilibria, such as metal-ligand interactions or complex adsorption processes
4
5 on macromolecular material affecting not to the chemical nature of the molecules, but to their
6
7 availability and hence to their partition to the vapour phase, as we have been recently shown
8
9 (Zapata, Lopez, Herrero, & Ferreira, 2012), but it could be also just a perceptual issue.
10
11 Psychophysically, if one aroma dominates the mixture, and a second one increases in intensity
12
13 (as a consequence of an independent process, such as the hydrolysis of a glycosidic
14
15 precursor), the intensity of the first one will decrease when that of the second approaches the
16
17 region of co-dominance (Ferreira, 2012a, 2012b) and the consequence of the process will be
18
19 quite similar to the set of observations made here.
20
21
22
23
24

25 The second big consequence of the present set of data is that the role of the initial level of
26
27 oxygen at bottling these kind of wines, is just marginal in comparison to the storage time per-
28
29 se. It must be taken into account that the wines used in the present experiment are all of them
30
31 red wines with relatively high contents in total polyphenols. These wines can consume all the
32
33 oxygen in just few days.
34
35
36

37 A limited effect of wine storage in the in-mouth properties is shown. No general pattern of
38
39 evolution is observed for bitterness, this taste seems to be wine-dependent as both increases
40
41 and decreases are observed for 56% of the samples studied. However, no significant effect of
42
43 the initial dose of oxygen provided at bottling stage is observed. Contrary to our expectations,
44
45 discrete increases in astringency are observed for less astringent wines after the 6-month
46
47 storage. Besides, the oxygen doses applied seem to affect this sensory perception in a limited
48
49 way. Both bitterness and astringency sensations are reported to be mainly linked to phenolic
50
51 composition, which experiment different changes during wine maturation. On the one hand,
52
53 the formation of flavanol derivatives with ethyl bridges during wine ageing or the formation
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 of flavonol aglycones (especially myricetin or quercetin) (Preys et al., 2006; Sáenz-Navajas,
2
3 Fernandez-Zurbano, & Tena, 2009) could lead to the observed increases in wine bitterness.
4
5 On the other hand, polymerization of proanthocyanidins is reported to occur during wine
6
7 ageing, which could result in a decrease in bitterness. However, the correlation of the different
8
9 groups of phenolic compounds with sensory astringency and bitterness is far from being clear.
10
11 Thus, the sensory role played by these compounds is not predictable at the moment and the
12
13 increase in astringency experimented by less-astringent wines cannot be explained at the
14
15 moment. At the moment an important chemical study with the same samples is ongoing,
16
17 which will help to bring light to several of the sensory results observed.
18
19
20
21
22

23 More important changes related to the oxygen doses applied to wine were expected. This
24
25 could be related to the fact of adding the oxygen before (in the initial wine headspace) the
26
27 bottling stage instead of along the period of storage (through the closure) as in normal
28
29 bottling. This could result in different sensory evolutions of wine samples, thus this point is
30
31 being addressed at the moment in our research work.
32
33

34 **References**

- 35
36
37 AOAC. (2002). Method 993.05: L-Malic acid/total malic acid ratio in apple juice. In *Official*
38 *Methods of Analysis*.
39
40 Caille, S., Samson, A., Wirth, J., Dieval, J.-B., Vidal, S., & Cheynier, V. (2010). Sensory
41 characteristics changes of red Grenache wines submitted to different oxygen
42 exposures pre and post bottling. *Analytica Chimica Acta*, 660 (1-2), 35-42.
43
44 Campo, E., Do, B. V., Ferreira, V., & Valentin, D. (2008). Aroma properties of young
45 Spanish monovarietal white wines: a study using sorting task, list of terms and
46 frequency of citation. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14 (2), 104-
47 115.
48
49 Colonna, A. E., Adams, D. O., & Noble, A. C. (2004). Comparison of procedures for
50 reducing astringency carry-over effects in evaluation of red wines. *Australian Journal*
51 *of Grape and Wine Research*, 10 (1), 26-31.
52
53 Czibulya, Z., Kollar, L., Nikfardjam, M. P., & Kunsagi-Mate, S. (2012). The Effect of
54 Temperature on the Color of Red Wines. *Journal of Food Science*, 77 (8), C880-C885.
55
56 Chinnici, F., Sonni, F., Natali, N., & Riponi, C. (2013). Oxidative evolution of (+)-catechin in
57 model white wine solutions containing sulfur dioxide, ascorbic acid or gallotannins.
58 *Food Research International*, 51 (1), 59-65.
59
60
61
62
63
64
65

- 1 Chira, K., Jourdes, M., & Teissedre, P.-L. (2012). Cabernet sauvignon red wine astringency
2 quality control by tannin characterization and polymerization during storage.
3 *European Food Research and Technology*, 234 (2), 253-261.
- 4 Chira, K., Pacella, N., Jourdes, M., & Teissedre, P.-L. (2011). Chemical and sensory
5 evaluation of Bordeaux wines (Cabernet-Sauvignon and Merlot) and correlation with
6 wine age. *Food Chemistry*, 126 (4), 1971-1977.
- 7
8 Fernandez-Zurbano, P., Ferreira, V., Pena, C., Escudero, A., Serrano, F., & Cacho, J. F.
9 (1995). Prediction of oxidative browning in white wines as a function of their
10 chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43 (11), 2813-
11 2817.
- 12
13 Ferreira, V. (2012a). Revisiting psychophysical work on the quantitative and qualitative odour
14 properties of simple odour mixtures: a flavour chemistry view. Part 1: intensity and
15 detectability. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27 (2), 124-140.
- 16
17 Ferreira, V. (2012b). Revisiting psychophysical work on the quantitative and qualitative
18 odour properties of simple odour mixtures: a flavour chemistry view. Part 2:
19 qualitative aspects. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 27 (3), 201-215.
- 20
21 Fontoin, H., Saucier, C., Teissedre, P.-L., & Glories, Y. (2008). Effect of pH, ethanol and
22 acidity on astringency and bitterness of grape seed tannin oligomers in model wine
23 solution. *Food Quality and Preference*, 19 (3), 286-291.
- 24
25 Gambuti, A., Rinaldi, A., Ugliano, M., & Moio, L. (2013). Evolution of Phenolic Compounds
26 and Astringency during Aging of Red Wine: Effect of Oxygen Exposure before and
27 after Bottling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (8), 1618-1627.
- 28
29 Godden, P., Francis, L., Field, J., Gishen, M., Coulter, A., Valente, P., Hoj, P., & Robinson,
30 E. (2001). Wine bottle closures: physical characteristics and effect on composition and
31 sensory properties of a Semillon wine - 1. Performance up to 20 months post-bottling.
32 *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 7 (2), 62-105.
- 33
34 Gómez Gallego, M. A., Gómez García-Carpintero, E., Sánchez-Palomo, E., González Viñas,
35 M. A., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2013). Evolution of the phenolic content, chromatic
36 characteristics and sensory properties during bottle storage of red single-cultivar wines
37 from Castilla La Mancha region. *Food Research International*, 51 (2), 554-563.
- 38
39 Guaita, M., Petrozziello, M., Motta, S., Bonello, F., Cravero, M. C., Marulli, C., & Bosso, A.
40 (2013). Effect of the Closure Type on the Evolution of the Physical-Chemical and
41 Sensory Characteristics of a Montepulciano d'Abruzzo Rose Wine. *Journal of Food
42 Science*, 78 (2), C160-C169.
- 43
44 He, J., Zhou, Q., Peck, J., Soles, R., & Qian, M. C. (2013). The effect of wine closures on
45 volatile sulfur and other compounds during post-bottle ageing. *Flavour and Fragrance
46 Journal*, 28 (2), 118-128.
- 47
48 Hopfer, H., Buffon, P. A., Ebeler, S. E., & Heymann, H. (2013). The Combined Effects of
49 Storage Temperature and Packaging on the Sensory, Chemical, and Physical
50 Properties of a Cabernet Sauvignon Wine. *Journal of Agricultural and Food
51 Chemistry*, 61 (13), 3320-3334.
- 52
53 Hopfer, H., Ebeler, S. E., & Heymann, H. (2012). The Combined Effects of Storage
54 Temperature and Packaging Type on the Sensory and Chemical Properties of
55 Chardonnay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (43), 10743-10754.
- 56
57 **ISO NORM 3591. (1977). Sensory analysis: Apparatus wine tasting glass. International
58 Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.**
- 59
60 Kim, U. K., & Drayna, D. (2005). Genetics of individual differences in bitter taste perception:
61 lessons from the PTC gene. *Clinical Genetics*, 67 (4), 275-280.
- 62
63
64
65

- 1 Lopes, P., Silva, M. A., Pons, A., Tominaga, T., Lavigne, V., Saucier, C., Darriet, P.,
2 Teissedre, P.-L., & Dubourdieu, D. (2009). Impact of Oxygen Dissolved at Bottling
3 and Transmitted through Closures on the Composition and Sensory Properties of a
4 Sauvignon Blanc Wine during Bottle Storage. *Journal of Agricultural and Food*
5 *Chemistry*, 57 (21), 10261-10270.
- 6
7 McRae, J. M., Dambergs, R. G., Kassara, S., Parker, M., Jeffery, D. W., Herderich, M. J., &
8 Smith, P. A. (2012). Phenolic Compositions of 50 and 30 Year Sequences of
9 Australian Red Wines: The Impact of Wine Age. *Journal of Agricultural and Food*
10 *Chemistry*, 60 (40), 10093-10102.
- 11 **Morineau, A. (1984). Note sur la caractérisation statistique d'une classe par les valeurs-test. In**
12 ***Bulletin Technique Centre Statistique Informatique Appliquées*, 2, 20-27.**
- 13
14 Morineau, A., Lebart, L., Piron, M. (1995). *Statistique exploratoire multidimensionnelle*.
15 Paris: Dunod.
- 16
17 O'Brien, V., Francis, I. L., & Osidacz, P. (2009). Packaging choices affect consumer
18 enjoyment of wines. *Wine Industry Journal*, 24 (5), 48-54.
- 19
20 Preys, S., Mazerolles, G., Courcoux, P., Samson, A., Fischer, U., Hanafi, A., Bertrand, D., &
21 Cheynier, V. (2006). Relationship between polyphenolic composition and some
22 sensory properties in red wines using multiway analyses. *Analytica Chimica Acta*,
23 563, 126-136.
- 24
25 Puertolas, E., Saldana, G., Condon, S., Alvarez, I., & Raso, J. (2010). Evolution of
26 polyphenolic compounds in red wine from Cabernet Sauvignon grapes processed by
27 pulsed electric fields during aging in bottle. *Food Chemistry*, 119 (3), 1063-1070.
- 28
29 Ribéreau-Gayon, P. (1970). Le dosage des composés phénoliques totaux dans les vins rouges.
30 *Chimie Analytique*, 52, 627-631.
- 31
32 Robinson, A. L., Mueller, M., Heymann, H., Ebeler, S. E., Boss, P. K., Solomon, P. S., &
33 Trengove, R. D. (2010). Effect of Simulated Shipping Conditions on Sensory
34 Attributes and Volatile Composition of Commercial White and Red Wines. *American*
35 *Journal of Enology and Viticulture*, 61 (3), 337-347.
- 36
37 Roessler, E. B., Warren, J., & Guymon, J. F. (1948). Significance in triangular taste tests.
38 *Food Research*, 13 (6), 503-505.
- 39
40 Sáenz-Navajas, M. P., Fernandez-Zurbano, P., Martin-Lopez, C., & Ferreira, V. (2011).
41 Sensory properties of premium Spanish red wines and their implication in wine quality
42 perception. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 17 (1), 9-19.
- 43
44 Sáenz-Navajas, M. P., Fernandez-Zurbano, P., & Tena, M. T. (2009). Study of
45 hydroxycinnamic acids and malvidin 3-monoglucoside derivatives using capillary
46 zone electrophoresis and ultra-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*,
47 115 (2), 766-774.
- 48
49 Sáenz-Navajas, M. P., Ferreira, V., Campo, E., Fernandez-Zurbano, P., & Valentin, D.
50 (2010). An assessment of the effects of wine volatiles on the perception of taste and
51 astringency in wine. *Food Chemistry*, 121 (4), 1139-1149.
- 52
53 Sáenz-Navajas, M. P., Gonzalez-Hernandez, M., Campo, E., Fernández-Zurbano, P., &
54 Ferreira, V. (2012). Orthonasal aroma characteristics of Spanish red wines from
55 different price categories and their relationship to expert quality judgements.
56 *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 18 (3), 268-279.
- 57
58 Wirth, J., Caille, S., Souquet, J. M., Samson, A., Dieval, J. B., Vidal, S., Fulcrand, H., &
59 Cheynier, V. (2012). Impact of post-bottling oxygen exposure on the sensory
60 characteristics and phenolic composition of Grenache rose wines. *Food Chemistry*,
61 132 (4), 1861-1871.

1 Zapata, J., Lopez, R., Herrero, P., & Ferreira, V. (2012). Multiple automated headspace in-
2 tube extraction for the accurate analysis of relevant wine aroma compounds and for
3 the estimation of their relative liquid-gas transfer rates. *Journal of Chromatography A*,
4 1266, 1-9.
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **Figure Captions**
2

3 Figure 1. Projection of aroma descriptors and the 16 wines in the correspondence analysis
4 (CA) space (dimensions 1 and 2).
5

6
7
8 Figure 2. Projection of aroma descriptors and the 16 wines in the correspondence analysis
9 space (dimensions 1 and 3).
10

11
12
13 Figure 3. Tree diagram and the four clusters derived from the Hierarchical cluster analysis
14 calculated on all dimensions of the CA performed with the 16 wine samples.
15

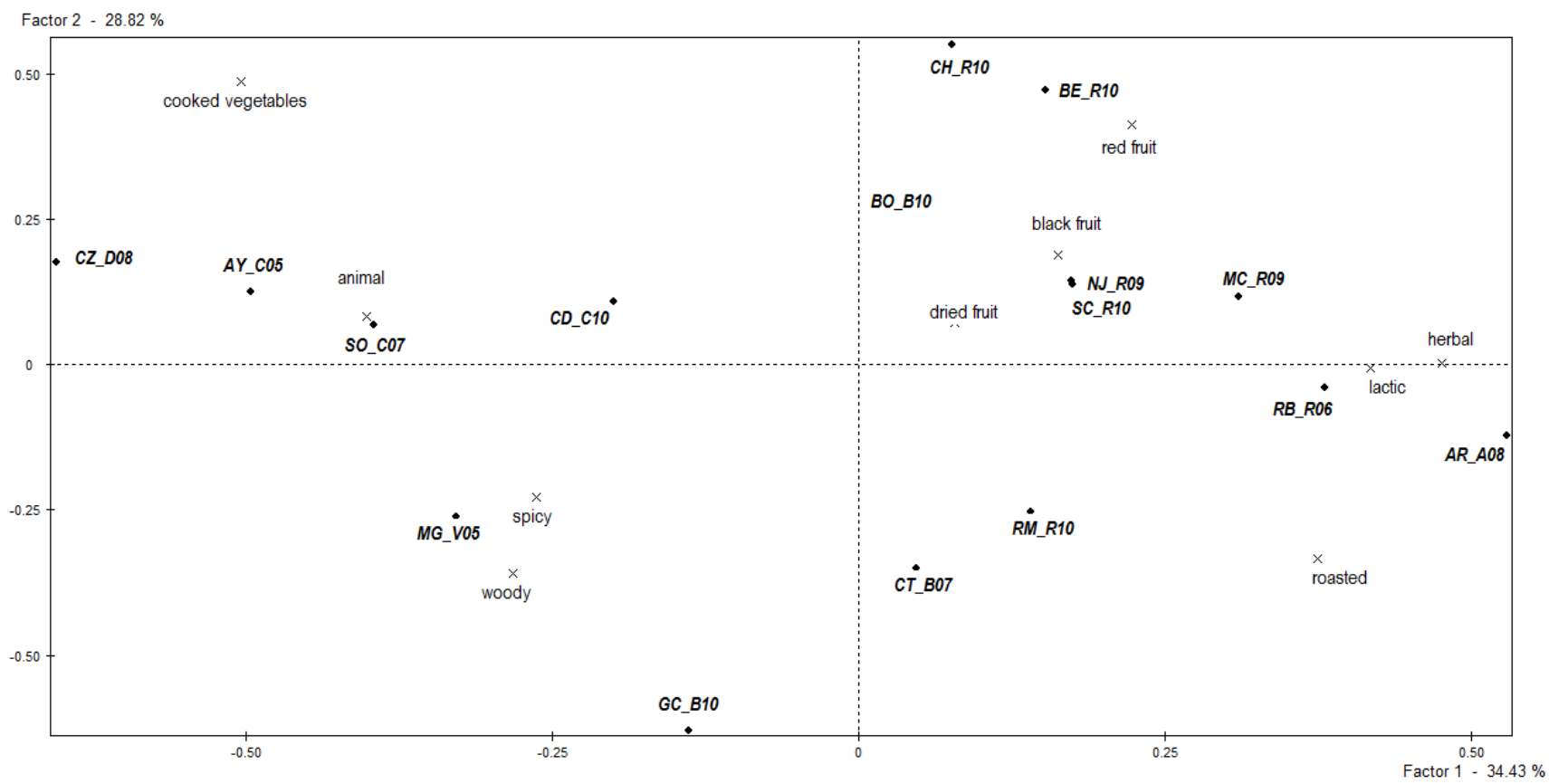
16
17
18 Figure 4. Projection of aroma descriptors and the three wines of cluster 1 in the
19 correspondence analysis space (dimensions 1 and 2).
20

21
22
23 Figure 5. Projection of aroma descriptors and the three wines of cluster 2 in the
24 correspondence analysis space (dimensions 1 and 2).
25

26
27
28 Figure 6. Projection of aroma descriptors and the three wines of cluster 3 in the
29 correspondence analysis space (dimensions 1 and 2).
30

31
32
33 Figure 7. Projection of aroma descriptors and the three wines of cluster 4 in the
34 correspondence analysis space (dimensions 1 and 2).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure



Figure

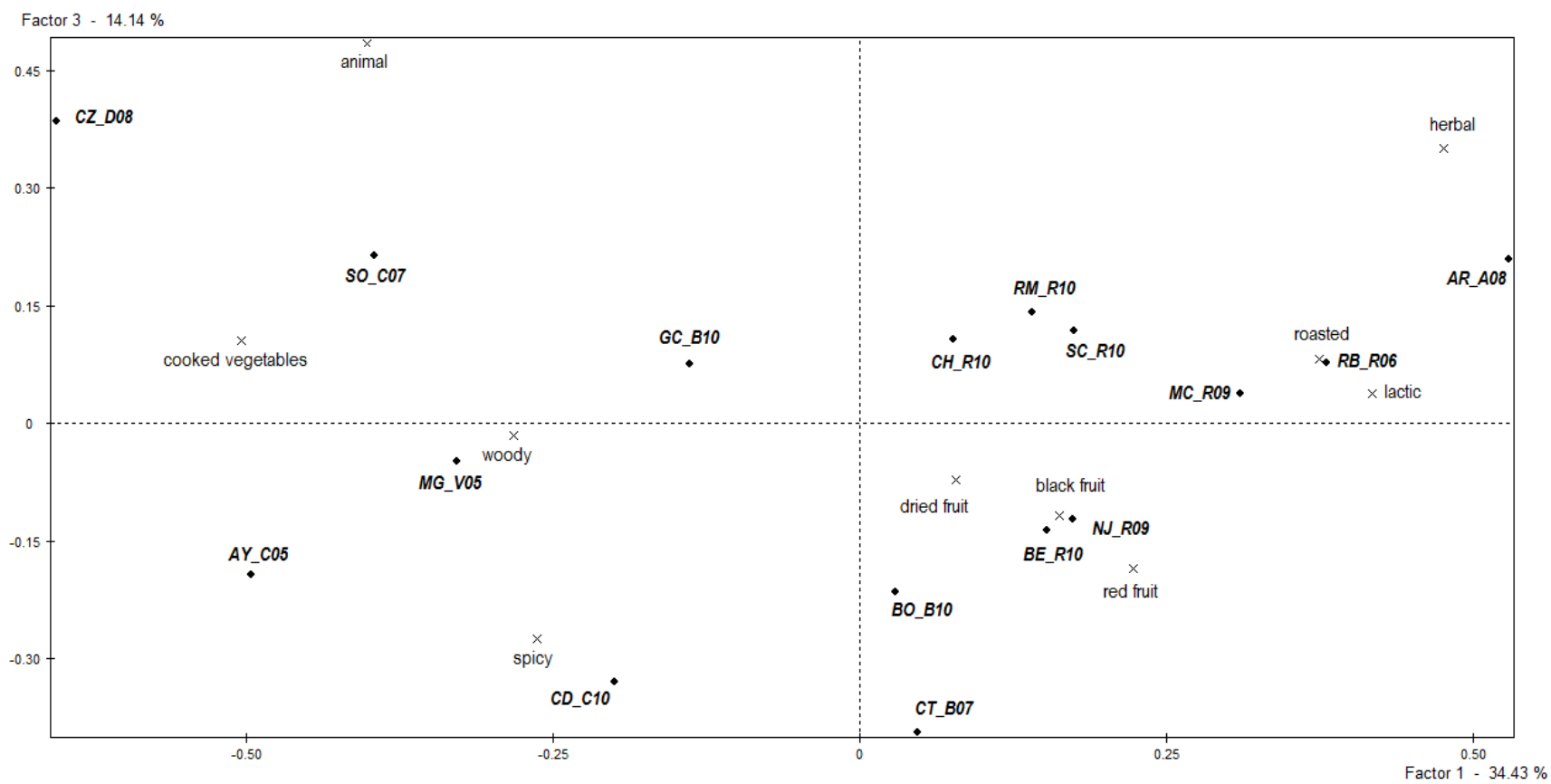
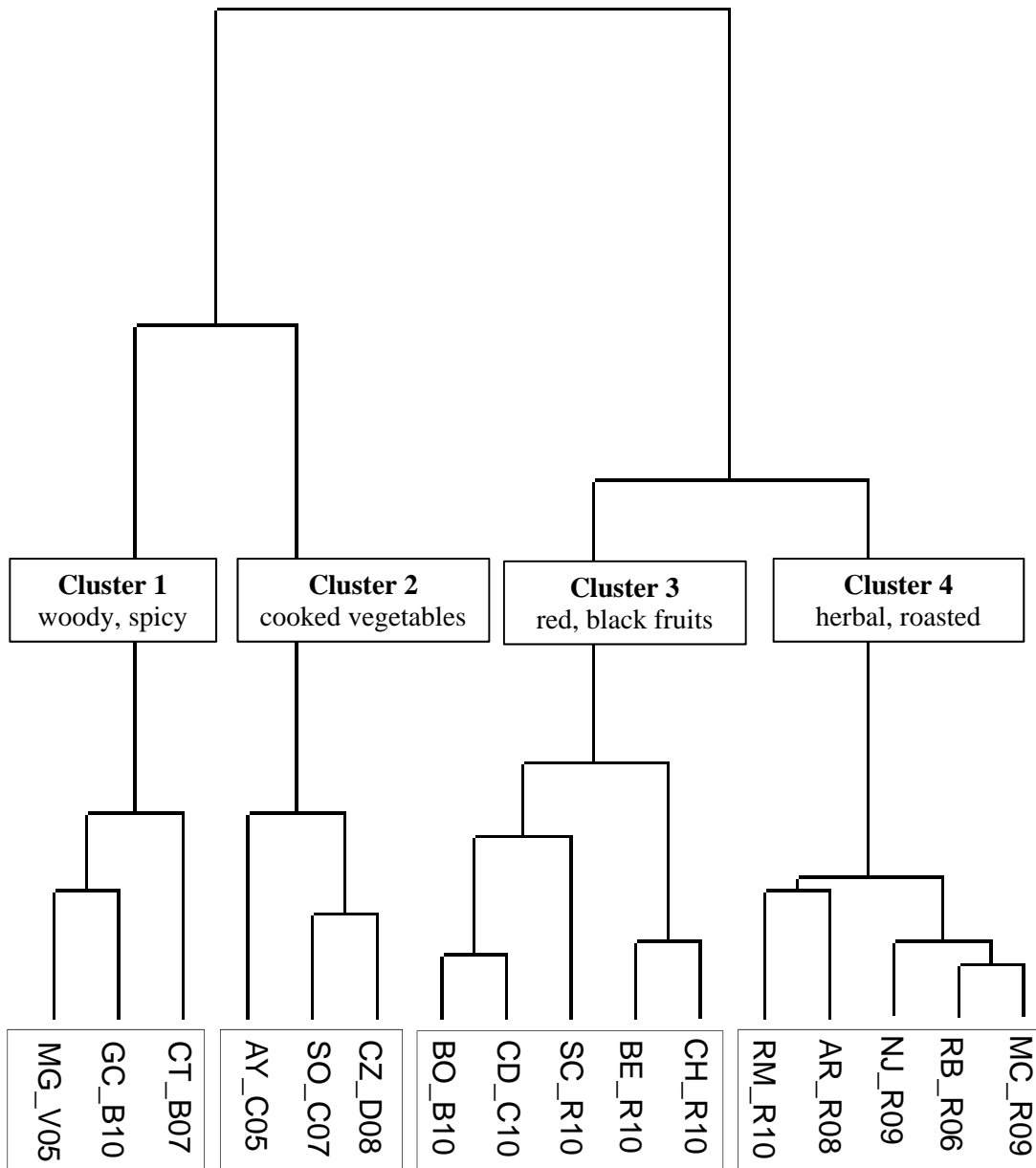
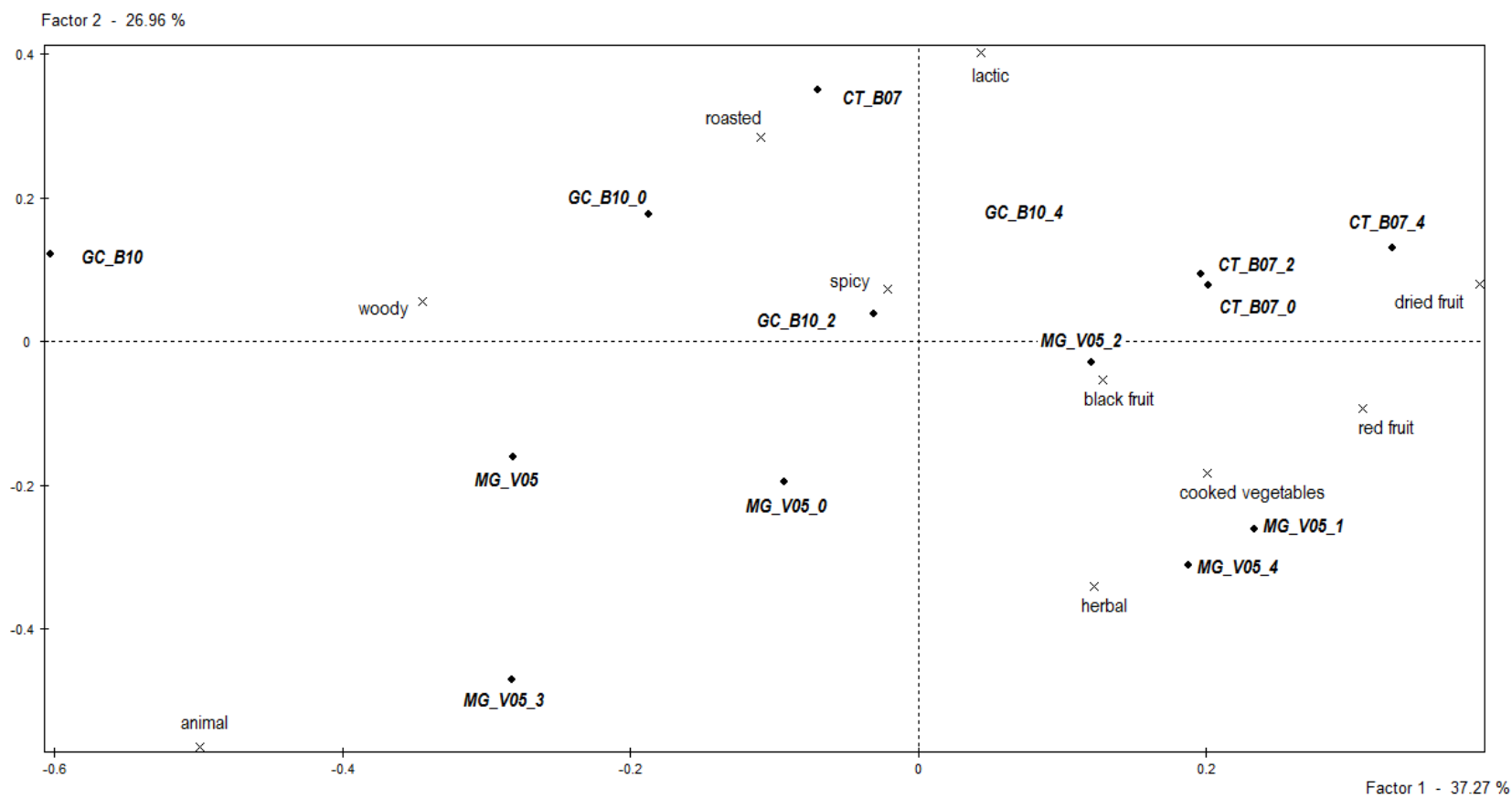


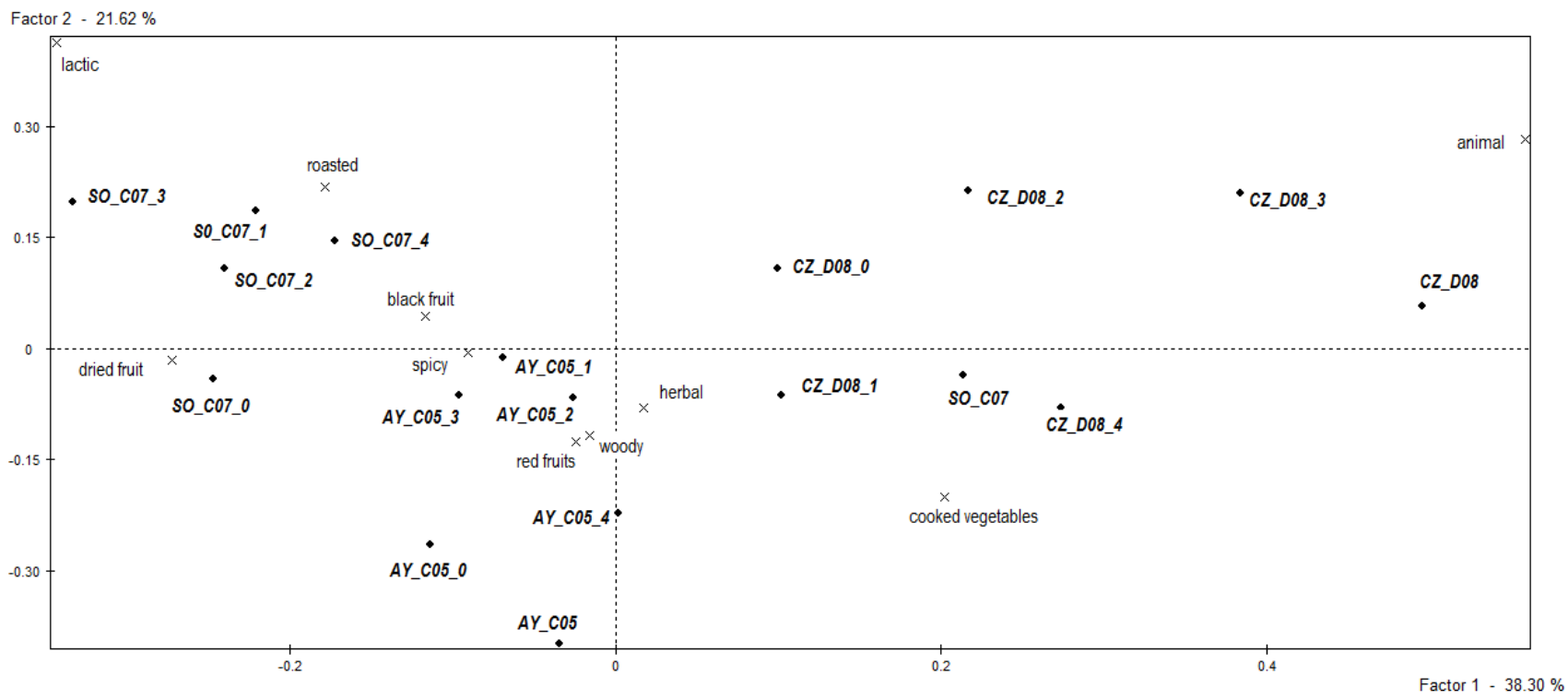
Figure 3



Figure

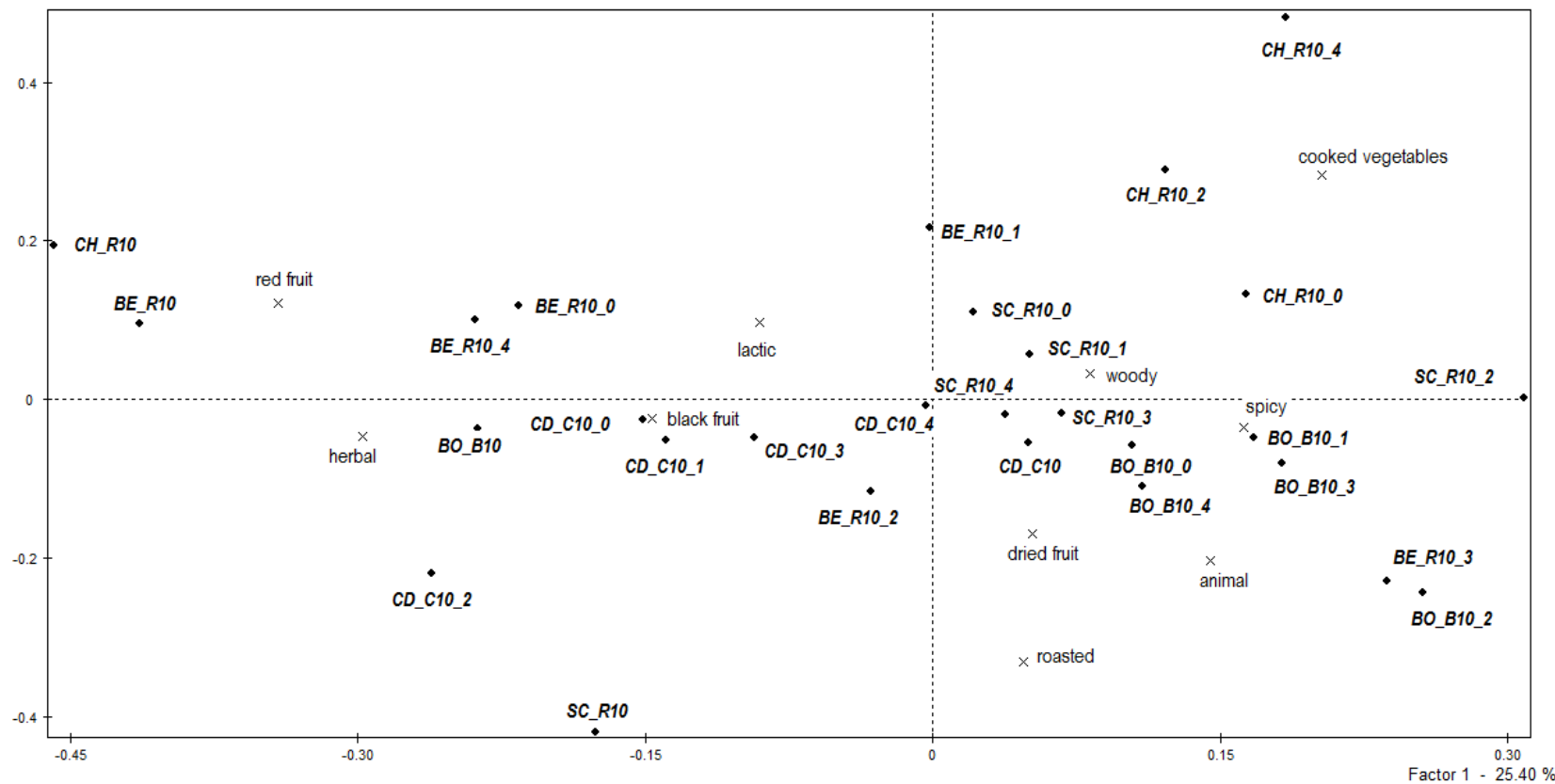


Figure



Figure

Factor 2 - 21.60 %



Figure

Factor 2 - 12.22 %

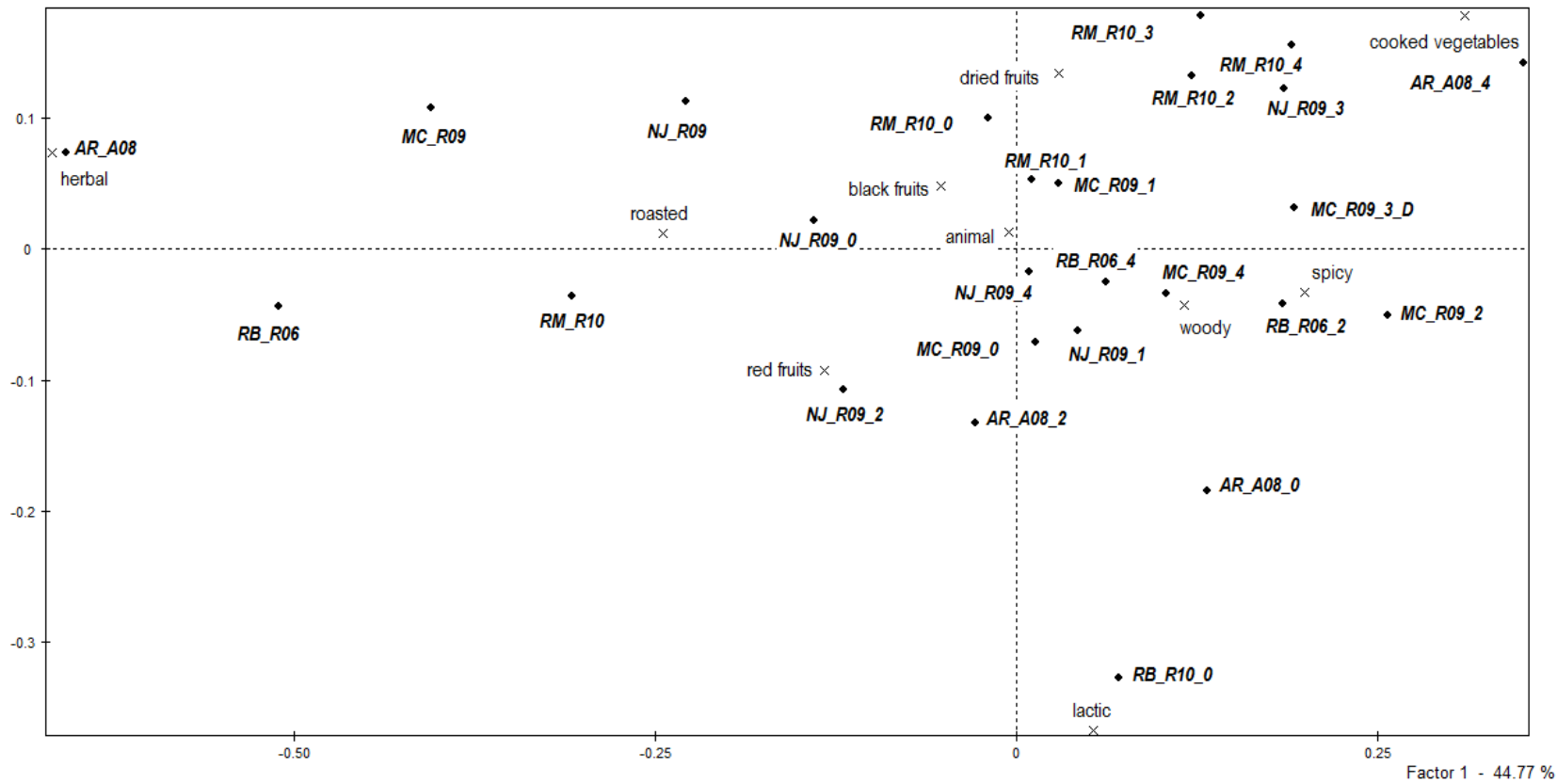


Table 1. The sixteen studied commercial wines and their original oenological parameters.

| wine code | origin | vintage year | grape variety | TPI ^a | CI ^b | Abs ₄₂₀ ^c | Oaking aging ^d | pH | TA ^e | AV ^f | RS ^g | MA ^h | LA ⁱ | Alcohol (% v/v) |
|-----------|-------------------------|--------------|---|------------------|-----------------|---------------------------------|---------------------------|------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| MG_V05 | DO Dominio de Valdepeña | 2005 | cabernet sauvignon | 83.4 | 19.3 | 7.3 | 12 | 3.65 | 4.91 | 0.56 | 4.35 | 0.29 | 0.77 | 15.2 |
| AY_C05 | DO Cariñena | 2005 | merlot, tempranillo, cabernet sauvignon | 74.3 | 10.8 | 4.7 | 10 | 3.52 | 5.86 | 0.69 | 3.39 | 0.33 | 1.00 | 14.3 |
| GC_B10 | DO Borja | 2010 | garnacha | 71.4 | 14.0 | 4.8 | 4 | 3.43 | 6.14 | 0.42 | 3.61 | 0.25 | 0.68 | 14.7 |
| RM_R10 | DOCa Rioja | 2010 | graciano | 66.4 | 18.7 | 6.6 | 8 | 3.57 | 5.80 | 0.41 | 2.31 | 0.19 | 1.45 | 14.8 |
| CD_C10 | DO Cariñena | 2010 | garnacha, tempranillo, cabernet sauvignon | 66.4 | 14.8 | 5.2 | 0 | 3.63 | 5.30 | 0.53 | 2.57 | 0.24 | 0.90 | 13.5 |
| CZ_D08 | DO Duero | 2008 | tempranillo | 62.0 | 9.6 | 3.6 | 18 | 3.65 | 5.33 | 0.57 | 1.71 | 0.35 | 2.47 | 13.4 |
| BO_B10 | DO Borja | 2010 | garnacha, syrah, tempranillo | 61.0 | 12.5 | 4.4 | 0 | 3.66 | 5.04 | 0.47 | 2.68 | 0.17 | 1.07 | 14.8 |
| CH_R10 | DOCa Rioja | 2006 | tempranillo, viura | 60.3 | 13.3 | 4.9 | 0 | 3.88 | 4.45 | 0.62 | 1.77 | 0.20 | 3.30 | 14.1 |
| CT_B07 | DO Borja | 2007 | garnacha | 59.1 | 9.2 | 3.6 | 15 | 3.47 | 5.66 | 0.51 | 4.34 | 0.30 | 0.75 | 13.9 |
| SC_R10 | DOCa Rioja | 2010 | tempranillo, garnacha | 57.8 | 11.0 | 3.9 | 0 | 3.72 | 4.84 | 0.48 | 2.32 | 0.18 | 2.52 | 13.4 |
| SO_C07 | DO Cariñena | 2007 | garnacha, tempranillo, cabernet sauvignon | 54.9 | 7.2 | 3.0 | 18 | 3.53 | 5.66 | 0.75 | 3.81 | 0.18 | 1.21 | 13.8 |
| AR_A08 | DO Arlanza | 2008 | tempranillo | 53.0 | 8.8 | 3.4 | 12 | 3.73 | 5.57 | 0.63 | 1.98 | 0.24 | 2.79 | 13.6 |
| MC_R09 | DOCa Rioja | 2009 | tempranillo, graciano, mazuelo | 52.3 | 8.8 | 3.4 | 12 | 3.64 | 4.92 | 0.52 | 2.09 | 0.21 | 2.11 | 13.7 |
| NJ_R09 | DOCa Rioja | 2009 | tempranillo, garnacha | 49.7 | 7.8 | 3.1 | 18 | 3.65 | 5.35 | 0.66 | 1.67 | 0.18 | 2.14 | 13.6 |
| RB_R06 | DOCa Rioja | 2010 | tempranillo, garnacha | 49.4 | 8.6 | 3.6 | 18 | 3.49 | 5.37 | 0.57 | 2.23 | 0.23 | 1.45 | 14.3 |
| BE_R10 | DOCa Rioja | 2010 | tempranillo, garnacha | 45.4 | 8.0 | 2.9 | 0 | 3.61 | 5.09 | 0.25 | 1.52 | 0.18 | 1.86 | 13.9 |

^aTotal Polyphenol Index^bColour intensity^cAbsorbance at 420nm measured in 2-cm cuvettes multiplied by five^dAging in oak barrels expressed in months^eTotal titratable acidity expressed in g L⁻¹ of tartatic acid^fVolatile acidity expressed in g L⁻¹ of acetic acid^gReducing sugars expressed in g L⁻¹^hMalic acid expressed in g L⁻¹ⁱLactic acid expressed in g L⁻¹

Table 2. Average sensory scores (\pm relative standard deviation) for bitterness and astringency provided by the trained panel for the 16 studied wines. Wines are arranged from maximal to minimal astringency.

| wine | bitterness | astringency |
|-------------|-------------------|--------------------|
| MG_V05 | 5.96 \pm 0.30 | 6.12 \pm 0.30 |
| AY_C05 | 5.24 \pm 0.31 | 6.12 \pm 0.33 |
| CZ_D08 | 4.34 \pm 0.35 | 5.73 \pm 0.28 |
| CD_C10 | 4.37 \pm 0.32 | 5.49 \pm 0.33 |
| SC_R10 | 4.32 \pm 0.28 | 5.29 \pm 0.29 |
| GC_B10 | 4.46 \pm 0.31 | 5.17 \pm 0.30 |
| CH_R10 | 4.61 \pm 0.36 | 5.05 \pm 0.36 |
| AR_A08 | 5.10 \pm 0.26 | 4.88 \pm 0.36 |
| CT_B07 | 4.05 \pm 0.27 | 4.76 \pm 0.28 |
| MC_R09 | 4.93 \pm 0.31 | 4.73 \pm 0.34 |
| NJ_R09 | 4.51 \pm 0.23 | 4.56 \pm 0.29 |
| BE_R10 | 4.22 \pm 0.30 | 4.49 \pm 0.33 |
| RB_R06 | 4.76 \pm 0.29 | 4.44 \pm 0.33 |
| SO_C07 | 4.51 \pm 0.28 | 4.22 \pm 0.27 |
| BO_R10 | 4.49 \pm 0.32 | 4.12 \pm 0.24 |
| RM_R10 | 5.39 \pm 0.33 | 3.78 \pm 0.32 |

Table 3. Number of correct responses and significance (*P<0.05, **P<0.01) of sixteen triangle tests for evaluating the sensory differences between samples stored during 6 months at 25°C with two different oxygen doses 1.1 and 10.6 mg L⁻¹

| wine code | correct responses | significance |
|-----------|-------------------|--------------|
| MG_V05 | 18 | ** |
| AY_C05 | 15 | ** |
| GC_B10 | 9 | ns |
| RM_R10 | 11 | * |
| CD_C10 | 12 | ** |
| CZ_D08 | 15 | ** |
| BO_B10 | 15 | ** |
| CH_R06 | 5 | ns |
| CT_B07 | 10 | ns |
| SC_R10 | 15 | ** |
| SO_C07 | 18 | ** |
| AR_A08 | 9 | ns |
| MC_R09 | 13 | ** |
| NJ_R09 | 15 | ** |
| RB_R10 | 8 | ns |
| BE_R10 | 13 | ** |

Table 4. Average changes in Absorbance at 420nm and frequency of citation (FC) of aroma terms during wine storage (difference between after and before storage) for the sixteen wines (Global) and for each cluster (Cluster 1- 4). Significant changes according to t-test are marked in bold (*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001).

| | Abs420nm | black fruit | red fruit | dried fruit | woody | roasted | animal | lactic | herbal | cooked vegetables | spicy |
|------------------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|----------------|----------------|-------------------|-----------------|
| Global | +0.31*** | +1.8*** | +0.3 | +1.6*** | +2.2** | +0.7 | +0.2 | +2.0*** | -0.1 | +4.4*** | +5.8*** |
| Cluster 1 | -0.04 | +6.3*** | +4.3*** | +3.6* | -6.7*** | -0.1 | -0.6 | +1.5* | +3.0* | +5.9*** | +0.3 |
| Cluster 2 | +0.51*** | +3.9*** | +2.4* | -0.3 | -0.5 | +5.1*** | -2.1 | +2.5** | +1.9* | -2.4** | +2.9** |
| Cluster 3 | +0.34*** | -0.8 | -2.0* | +1.9** | +5.1*** | +0.9 | +1.7* | +1.9** | +1.9* | +7.0*** | +5.5*** |
| Cluster 4 | +0.32*** | +0.9 | -0.7 | +1.7* | +5.6*** | -2.4 | +0.6 | +2.2** | -5.3*** | +5.5*** | +11.1*** |

Table 5. Average scores (\pm relative standard deviation) of the sixteen (global) and for each wine for bitterness before and after storage derived from the trained panel. Samples presenting sensory significant differences according to two-way ANOVA (judges and storage-before and after- as fixed factors) before and after storage are shown. The highest scores for bitterness within a wine are marked in bold.

| | Before | After | F | P |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|----------|------------|
| Global | 5.03 \pm 0.30 | 5.03 \pm 0.27 | 0.001 | ns |
| SC_R10 | 4.32 \pm 0.28 | 4.79\pm0.28 | 5.72 | 0.018** |
| RM_R10 | 5.39\pm0.33 | 4.78 \pm 0.28 | 9.07 | 0.003*** |
| CD_C10 | 4.37 \pm 0.32 | 4.80\pm0.25 | 4.13 | 0.043** |
| BO_R10 | 4.50 \pm 0.32 | 4.92\pm0.27 | 3.77 | 0.054* |
| MC_R09 | 4.93\pm0.31 | 4.48 \pm 0.25 | 4.17 | 0.042* |
| AR_A08 | 5.10\pm0.26 | 4.20 \pm 0.25 | 16.36 | < 0.001*** |
| MG_V05 | 5.96\pm0.30 | 5.19 \pm 0.31 | 12.64 | < 0.001*** |
| CT_B07 | 4.05 \pm 0.27 | 4.59\pm0.27 | 6.013 | 0.016** |
| CZ_D08 | 4.34 \pm 0.35 | 4.73\pm0.28 | 3.438 | 0.065* |

*P<0.1; **P<0.05; ***P<0.01

Table 6. Average scores (\pm relative standard deviation) of the sixteen (global) and for each wine for astringency before and after storage derived from the trained panel. Samples presenting sensory significant differences according to two-way ANOVA (judges and storage-before and after- as fixed factors) before and after storage are shown. The highest scores for astringency within a wine are marked in bold.

| | Before | After | F | P |
|---------------|-----------------|---------------------------------|----------|----------|
| Global | 5.35 \pm 0.32 | 5.54\pm0.26 | 6.75 | 0.009* |
| RM_R10 | 3.78 \pm 0.32 | 4.72\pm0.26 | 14.65 | <0.001** |
| BO_R10 | 4.12 \pm 0.24 | 4.63\pm0.24 | 7.01 | 0.009* |
| RB_R06 | 4.44 \pm 0.33 | 5.20\pm0.25 | 7.60 | 0.007* |
| SO_C07 | 4.22 \pm 0.27 | 4.88\pm0.22 | 9.23 | 0.003* |

*P<0.01; **P<0.001

Table 7. Average scores (\pm relative standard deviation) of the sixteen (global) and for each wine for global intensity before and after storage derived from the trained panel. Samples presenting sensory significant differences according to two-way ANOVA (judges and storage-before and after- as fixed factors) before and after storage are shown. The highest scores for global intensity within a wine are marked in bold.

| | Before | After | F | P |
|---------------|---------------------------------|---------------------------------|----------|----------|
| Global | 5.24\pm0.24 | 5.09 \pm 0.20 | 8.02 | 0.005** |
| SC_R | 4.42 \pm 0.21 | 4.78\pm0.20 | 4.240 | 0.041* |
| GC_B | 5.78\pm0.23 | 5.22 \pm 0.18 | 8.027 | 0.005** |
| MG_V | 5.52\pm0.27 | 5.11 \pm 0.22 | 4.435 | 0.037* |
| AY_C | 5.59\pm0.23 | 5.08 \pm 0.21 | 7.388 | 0.007** |

*P<0.05; **P<0.01

Table 8. Average scores (\pm relative standard deviation) of the sixteen (global) and for each wine for persistence before and after storage derived from the trained panel. Samples presenting sensory significant differences according to two-way ANOVA (judges and storage-before and after- as fixed factors) before and after storage are shown. The highest scores for persistence within a wine are marked in bold.

| | Before | After | F | P |
|---------------|---------------------------------|-----------------|----------|----------|
| Global | 5.24\pm0.26 | 5.09 \pm 0.21 | 3.79 | 0.052* |
| AR_A | 5.34\pm0.28 | 4.89 \pm 0.19 | 4.14 | 0.044** |
| AY_C | 5.88\pm0.25 | 5.45 \pm 0.19 | 4.92 | 0.028** |

*P<0.1; **P<0.05



Avances en el conocimiento de la percepción sensorial de vinos tintos y su relación con la composición química no volátil. Evolución químico-sensorial en la etapa de embotellado.