



Universidad de Valladolid



**ESCUELA DE INGENIERÍAS
INDUSTRIALES**

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID

ESCUELA DE INGENIERIAS INDUSTRIALES

Grado en Ingeniería Química

**“Análisis del contenido polifenólico en vinos
tintos mediante lengua electrónica, FTIR y
UV-vis”**

Autor:

García Carretero, María Luz

Tutor:

**Rodríguez Méndez, María Luz
García Hernández, Celia
Departamento Química Física y
Química Inorgánica**

Valladolid, Julio 2017.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, muchas gracias a la profesora D^a. María Luz Rodríguez Méndez por darme la oportunidad de realizar mi TFG dentro de su equipo de investigación, por su dedicación y por todo lo que he aprendido estos meses.

También me gustaría dar las gracias a todos mis compañeros del laboratorio, que me han ayudado siempre que lo he necesitado y que, gracias a su excelente acogimiento, han convertido estos meses de trabajo en un proceso agradable de aprendizaje. Pero en especial a Celia, por su paciencia, su atención y sobre todo por su interés y dedicación.

A Elena, compañera de carrera, de trabajos, de buenos y no tan buenos momentos. Gracias por compartir tantos momentos conmigo desde el primer día.

A José Luis, por sus consejos, que han hecho que no flaqueara en los momentos más duros, por su paciencia y por alegrar cada momento haciendo más ameno el camino que alguna vez que otra se complicó.

Y por último, al apoyo más importante que he tenido durante estos años, mi familia. En especial, a mis padres, por darme la oportunidad de formarme y recibir la mejor educación a lo largo de toda mi vida, dándome la oportunidad de estudiar esta carrera y, sobre todo, por el apoyo recibido por su parte durante estos últimos que han sido los más difíciles.

A todos vosotros, GRACIAS.



RESUMEN

En este Trabajo de Fin de Grado se ha analizado el contenido polifenólico de vinos tintos mediante diferentes técnicas de análisis multivariante: Lengua electrónica, espectroscopía FTIR, coordenadas CIELab y parámetros Glories, y se han comparado los resultados obtenidos entre las distintas técnicas. Para ello, se analizaron vinos tintos en diferente estado de maduración (Joven, Roble, Crianza, Reserva y Gran Reserva).

Además, se ha medido el índice polifenólico de los vinos mediante métodos oficiales tradicionales de análisis químico (IPT280 y Folin-Ciocalteu).

Se han realizado diferentes tratamientos estadísticos de los resultados obtenidos: Análisis de componentes principales (PCA) para discriminar las muestras de vino, Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-1) para comprobar la correlación entre los métodos de análisis y los parámetros químicos del contenido polifenólico y Máquinas de vectores soporte (SVM-R) para elaborar modelos de regresión capaces de predecir los índices IPT280 y Folin-Ciocalteu de los vinos.

PALABRAS CLAVE: *Lengua electrónica; FTIR; UV-Vis; vinos; contenido polifenólico.*



ABSTRACT

In this Degree's Final Project, the polyphenolic content of red wines has been analyzed using different multivariate analysis techniques: Electronic tongue, FTIR spectroscopy, CIELab coordinates and Glories parameters, and the results obtained with those different techniques have been compared. For this purpose, red wines were analyzed in different maturity stages (Joven, Roble, Crianza, Reserva and Gran Reserva).

In addition, the polyphenolic index of wines has been measured by traditional chemical analysis using official methods (IPT280 and Folin-Ciocalteu).

Different statistical treatments of the results obtained have been carried out: Principal Component Analysis (PCA) to discriminate wine samples, Partial Least Squares regression (PLS-1) to study the correlation between the results obtained with the different techniques and the chemical parameters of polyphenolic content and Support Vector Machines (SVM-R) to create regression models capable of predicting the IPT280 and Folin-Ciocalteu values of wines.

KEYWORDS: *Electronic tongue; FTIR; UV-Vis; wines; polyphenolic content.*



CONTENIDO

CAPÍTULO 1 : INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación	1
1.1. Objetivos	2
CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO	4
2.1. El vino y su producción	4
2.1.1. Componentes químicos del vino.....	6
2.1.2. Clasificación del vino según su período de envejecimiento.....	12
2.1.2.1. Características del vino según su crianza	13
2.1.3. Evolución del color y compuestos fenólicos durante la crianza del vino	14
2.1.4. Métodos utilizados para la determinación de compuestos fenólicos y	
parámetros de color en los vinos	15
2.1.4.1. Espectroscopía UV-visible	16
2.1.4.2. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier.....	22
2.2. Lengua Electrónica.....	23
2.2.2. Concepto y ventajas frente a los métodos tradicionales	27
2.2.3. Sentido del gusto.....	28
2.2.4. Analogía entre lengua humana y lengua electrónica	30
2.3. Sensores utilizados en lenguas electrónicas	31
2.3.2. Tipos de sensores	31
2.3.3. Sensores electroquímicos.....	33
2.3.3.1. Sensores Potenciométricos	36
2.3.3.2. Sensores Amperométricos	37
2.3.3.3. Sensores Voltamétricos	37
2.3.4. Sensores serigrafiados	44
2.4. Tratamiento estadístico multivariante de datos.....	45
2.4.2. Análisis de componentes principales.....	47
2.4.3. Regresión parcial de mínimos cuadrados	47
2.4.4. Máquina de vectores soporte	47
CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL ...	49



3.1.	Muestras de vino.....	49
3.2.	Reactivos y material	49
3.3.	Instrumentación	50
3.3.1.	Equipo Dropsens: Sensores y potencióstato	50
3.3.2.	Equipo de Espectrometría UV-vis	52
3.3.3.	Equipo de Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR) 53	
3.4.	Metodología experimental.....	55
3.4.1.	Medidas electroquímicas de los vinos con la lengua electrónica.....	55
3.4.1.1.	Preparación de las muestras de vino y procedimiento de medidas electroquímicas	55
3.4.1.2.	Estudio de los límites de detección.....	57
3.4.2.	Medidas de Espectrometría UV-vis	58
3.4.2.1.	Determinación del Índice Folin-Ciocalteu.....	59
3.4.2.2.	Determinación del Índice IPT 280	60
3.4.2.3.	Determinación de los parámetros CIELab	61
3.4.2.4.	Determinación de los parámetros Glories	61
3.4.3.	Medidas de Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier...	62
3.4.4.	Tratamiento estadístico multivariante de datos.....	62
	CAPITULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES	64
4.1.	Determinación del contenido polifenólico en los vinos: Índice IPT 280 y Folin Ciocalteu	64
4.2.	Determinación de los parámetros del color en los vinos: Glories y CIELab .	67
4.3.	Análisis de los vinos mediante espectroscopía FTIR	70
4.4.	Análisis electroquímico de los vinos con la lengua electrónica	73
4.4.1.	Respuesta voltamétrica de los sensores en KCl.....	73
4.4.2.	Respuesta voltamétrica de los sensores en catecol	75
4.4.3.	Estudio de la sensibilidad de los sensores. Límites de detección.....	78
4.4.4.	Respuesta voltamétrica de los sensores en los vinos	82
4.5.	Tratamiento de datos	86
4.5.1.	Regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS-1)	86
4.5.2.	Análisis de Componentes Principales (PCA).....	88
4.5.2.1.	PCA aplicada a la lengua electrónica.....	89



4.5.2.2.	PCA aplicada a FTIR.....	90
4.5.2.3.	PCA aplicada a los parámetros de color CIELab	92
4.5.2.4.	PCA aplicada a los parámetros del color Glories.....	93
4.5.3.	Máquina de vector soporte – Regresión (SVMR)	95
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN		97
5.1.	Conclusiones y líneas futuras de investigación.....	97
BIBLIOGRAFÍA.....		99



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -Diagrama de barras que muestra la ubicación de las regiones vinícolas con mayor producción a nivel mundial.	4
Figura 2 -Clasificación según su estructura de los poli-fenoles del vino.....	9
Figura 3 - a) Estructura de estilbeno. b) Estructura de resveratol.....	9
Figura 4 -Estructura de los flavonoides (2-fenil-cromona).....	10
Figura 5 -Estructura de las principales antocianinas.....	11
Figura 6 -Estructura de los flavan-3-oles.....	12
Figura 7 -Estructura de nuevos pigmentos (piranoantocianos).....	15
Figura 8 -Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.	18
Figura 9 -Parámetros CIELab del color [27].	20
Figura 10 -a) Papilas gustativas. b) Estructura células receptoras.....	29
Figura 11 -Analogía entre el sentido del gusto "humano" y la lengua electrónica [39].	30
Figura 12 -Componentes de un sensor.....	33
Figura 13 -a) Celda de dos electodos. b) Celda de tres electodos.....	35
Figura 14 - a) Barrido lineal de potenciales. b) Voltamperograma [50].	39
Figura 15 -a) Barrido de potencial en escalón. b) Voltamperograma [50].	39
Figura 16 -Variación del potencial aplicado en función del tiempo [50].	40
Figura 17 -Barrido triangular como señal de perturbación [43].	40
Figura 18 -Curva intensidad-voltaje de un voltamograma cíclico, con sus magnitudes de acuerdo al convenio planteado por la IUPAC [43].	41
Figura 19 -Celda convencional y Electrodo Serigrafiado.....	44
Figura 20 -Electrodo serigrafiado Dropsens.....	50
Figura 21 -a) Bipotenciostato/ Galvanostato μ Stat 400. b) Conector para electodos serigrafiados.....	52
Figura 22 -UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UV-2600 empleado en el proyecto.....	53
Figura 23 - Espectrofotómetro de Infrarrojo empleado.	55
Figura 24 -Electrodo Dropsens sumergido en la disolución 1:2	56



Figura 25- Parámetros de pre-tratamiento y parámetros de medida aplicados a la medición de las muestras.....	57
Figura 26- Muestras de vino y del blanco preparadas para ser analizadas por el método Folin-Ciocalteu.....	59
Figura 27- Muestras de los diferentes vinos preparadas para el método IPT 280.....	60
Figura 28- Espectro de absorbancia del índice Folin-Ciocalteu.....	65
Figura 29- Espectro de absorbancia del índice IPT.....	65
Figura 30- Espectro de absorbancia comprendido en un rango desde 250-350 nm con el que se obtiene el índice IPT.....	66
Figura 31- Espectro FTIR entre 4000-400 cm^{-1}	71
Figura 32- Espectro FTIR entre 1500-1000 cm^{-1} "huella dactilar".....	72
Figura 33- Señal de salida de cada uno de los electrodos en KCl 0,1 M.....	74
Figura 34- Respuesta de los electrodos en catecol 10^{-3} M.....	76
Figura 35- Proceso redox del catecol.....	77
Figura 36-LD: Voltamogramas de DRP-110 en catecol.....	78
Figura 37-LD: Voltamogramas de DRP-110 PANI en catecol.....	79
Figura 38-LD: Voltamogramas de DRP-110 CNT en catecol.....	79
Figura 39-LD: Voltamogramas de DRP-110 SWCNT en catecol.....	80
Figura 40-LD: Voltamogramas de DRP-550 en catecol.....	80
Figura 41-LD: Voltamogramas de DRP- 110 Ni en catecol.....	81
Figura 42-LD: Voltamogramas de DRP-Glu 10 en catecol.....	81
Figura 43- Voltamograma de la red de sensores en el vino Crianza (Toro).....	83
Figura 44- Voltamograma de la red de sensores en el vino Gran Reserva (Ribera).	84
Figura 45- Voltamograma de las señales de todos los vinos de estudio para el electrodo modificado DRP-110 PANI.....	85
Figura 46- PCA en 3D de la lengua electrónica.....	89
Figura 47- PCA en 2D de la lengua electrónica.....	90
Figura 48- PCA en 3D de FTIR.....	91
Figura 49- PCA en 2D de FTIR.....	92
Figura 50- PCA en 3D de CIELab.....	92
Figura 51- PCA en 2D de CIELab.....	93



Figura 52-PCA en 3D del Glories.....	94
Figura 53-PCA en 3D del Glories.....	94



LISTA DE TABLAS

Tabla 1 - Tabla resumen de los componentes principales del vino.....	7
Tabla 2 -Datos disponibles de los vinos proporcionados por las Estaciones Enológicas.	49
Tabla 3 - Adiones realizadas de catecol en KCl y su equivalente concentración final para el cálculo de los límites de detección.....	58
Tabla 4 -Resultados de los Índices Folin-Ciocalteu e IPT280.	64
Tabla 5 -Valores de las absorbancias obtenidas.....	67
Tabla 6 -Parámetros Glories.....	67
Tabla 7 -Parámetros de color obtenidos por el método CIELab.	69
Tabla 8 -Potenciales de oxidación/reducción de los electrodos en catecol.....	77
Tabla 9 - Límites de detección (mol/L) de los sensores Dropsens que forman la lengua electrónica	82
Tabla 10 - Resultado del análisis PLS-1.	87
Tabla 11 -Tabla resumen con los índices IPT y Folin.	95
Tabla 12 -Resultados para los modelos SVM-R.	96
Tabla 13 - Predicción del IPT280 e Índice Folin-Ciocalteu en muestras de vino después de aplicar los modelos de regresión realizados con SVM-R.....	96



LISTA DE ECUACIONES

Ecuación 1- Parámetro del color: croma.	21
Ecuación 2- Parámetro del color: tono.	21
Ecuación 3- Parámetros Glories: Intensidad del color.	21
Ecuación 4- Parámetros Glories: Densidad del color.	22
Ecuación 5- Parámetros Glories: Tono.	22
Ecuación 6- Parámetros Glories: Proporción de pigmentación roja aportada por los cationes de flavilo.	22
Ecuación 7- Parámetros Glories: Proporción de color amarillo presente en el vino.	22
Ecuación 8- Parámetros Glories: Proporción de color rojo presente en el vino. ...	22
Ecuación 9- Parámetros Glories: Proporción de color azul presente en el vino. ...	22
Ecuación 10- Potencial de equilibrio para el caso de una solución ideal.	36
Ecuación 11- Potencial de equilibrio para el caso de una solución no ideal.	37
Ecuación 12- Ecuación de Randles-Sevcik (a 25°C) para especies reversibles. ...	42
Ecuación 13- Ecuación de Randles-Sevcik (a 25°C) para especies irreversibles. 42	
Ecuación 14- Potencial formal de reducción para un proceso reversible 43	
Ecuación 15- Diferencia de potencial entre los picos en un sistema reversible. 43	
Ecuación 16- Potencial de medio pico para un sistema reversible (a 2°C). 43	
Ecuación 17- Límite de detección. 58	
Ecuación 18- Ecuación del índice Folin-Ciocalteu. 59	
Ecuación 19- Ecuación del índice IPT280. 60	



ABREVIATURAS

PCA: Análisis de Componentes Principales (de sus siglas en inglés)

PLS-1: Regresión de Mínimos Cuadrados Parciales (de sus siglas en inglés)

SVM: Máquina de Vector Soporte (de sus siglas en inglés)

FTIR: Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier

IPT: índice de polifenoles totales

IFC: índice Folin-Ciocalteu

Jv: joven

Rb: Roble

Cr: crianza

Rv: reserva

GRv: gran reserva

LD: Límite de Detección

Capítulo 1: Introducción



1.1. Justificación

La Industria de Alimentación y Bebidas, es un sector importante en la economía Española, que a lo largo de los años ha ido aumentando sus ventas y obteniendo numerosos beneficios, lo que la convierte en uno de los sectores industriales de gran transcendencia en el desarrollo de futuro de la economía.

Esta industria se afianza como el primer sector industrial del país tras lograr en 2016 sus máximos históricos en variables como la producción, el empleo y las exportaciones. El valor de la producción de este sector ha presentado un crecimiento nominal del 1,3%, cerrando en 2016 con unas ventas por valor superior a los 96.400 millones de euros y de los cuales 27.500 millones de euros fueron debidos a las exportaciones, que crecieron en ese año más de un 8%.

En comparación con las industrias de alimentación de otros países Europeos, España se consolida en la 6ª posición en el ranking exportador de la Unión Europea y la 10ª a nivel mundial.

En la clasificación por productos, los cárnicos y sus derivados siguen siendo los más exportados con una cifra superior a los 4.420 millones de euros, seguidos del aceite de oliva (3.366 millones), el pescado y sus conservas (2.905 millones) y el vino (2.745 millones) [1].

Ante su importante repercusión, la legislación que regula este sector cada vez está siendo más estricta, con el principal objetivo de proteger al consumidor para que los alimentos y bebidas que le lleguen sean de calidad y estén exentos de fraude.

Es por eso que, el desarrollo de métodos rápidos de análisis y de bajo coste que permitan evaluar la calidad de los alimentos, incluidas las mediciones in-situ, se presenta como un objetivo de interés en la industria de la alimentación.

Por otro lado, las técnicas de análisis de alimentos tradicionalmente usadas incluyen la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPCL), diversas versiones de Cromatografía de Gases y diversos tipos de espectroscopías. Estas técnicas pueden ser altamente selectivas y confiables, pero requieren instrumentación costosa, preparación de muestras y es difícil que puedan llegar a ser totalmente automatizadas. Es por ello que, es necesario evaluar el sabor y la calidad integral de los alimentos, características más importantes desde el punto de vista del cliente, por medio de una herramienta capaz de dar resultados fiables y reproducibles, pero además que sea de bajo coste, bajo consumo de energía, que sean portátiles y con la que se pueda realizar medidas in-situ.



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

Los microsensores de estado sólido cumplen todos estos requisitos debido a su pequeño tamaño, respuesta rápida y bajo consumo de energía. Además, la combinación de estos microsensores con herramientas quimiométricas para el procesamiento de las señales, proporciona un sistema analítico multiparamétrico novedoso llamado lengua electrónica [2].

La lengua electrónica presenta claras ventajas que han hecho que sea una herramienta atractiva y relevante en el control de la calidad de los alimentos y de su seguridad, siendo el vino una de las bebidas más utilizadas para probar la viabilidad de estos sistemas, por ser una bebida con una compleja composición [3].

El grupo de investigación UVaSens, dirigido por la Prof. María Luz Rodríguez Méndez, del Departamento de Química Física y Química Inorgánica de la Escuela de Ingenierías Industriales de la Universidad de Valladolid (UVa), en cual se ha realizado el presente Trabajo de Fin de Grado, está llevando a cabo numerosas investigaciones acerca de la aplicabilidad en diversos ámbitos de la lengua electrónica, así como del desarrollo de nuevos sensores modificados con nanomateriales que permitan detectar componentes en el sector de la alimentación, siendo el principal campo de aplicación el análisis de mostos y vinos.

1.1. Objetivos

El objetivo principal del proyecto es unir las ventajas analíticas que presentan los métodos tradicionales (espectroscopías FTIR y UV-vis) con las ventajas que proporciona una herramienta más novedosa, la lengua electrónica. Además de unir ambos tipos de técnicas para reforzar la complementariedad de los resultados, otro objetivo es el de comparar los resultados obtenidos por medio de la lengua electrónica con respecto a las técnicas tradicionales en cuanto a su capacidad de analizar los vinos según su contenido polifenólico.

Los objetivos específicos para llevar a cabo el trabajo de investigación son:

1. Aplicar las técnicas de análisis mencionadas en vinos tintos con diferente estado de maduración (Joven, Roble, Crianza, Reserva y Gran Reserva).
 - 1a. Estudiar el comportamiento electroquímico de la lengua electrónica frente a los fenoles (respuesta voltamétrica y límite de detección).
 - 1b. Caracterizar los vinos según sus espectros FTIR.



CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

- 1c. Analizar la relación entre los resultados obtenidos de los parámetros Glories y de las coordenadas CIELab mediante UV-Vis con el color del vino y su envejecimiento.
2. Medir el contenido polifenólico de los vinos (IPT280 e Índice Folin-Ciocalteu) siguiendo los métodos oficiales de la OIV y Panreac Química S.A.
3. Evaluar la capacidad de discriminación de las diferentes técnicas de análisis mediante el análisis estadístico PCA.
4. Obtener correlaciones entre los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas de análisis y los datos obtenidos de IPT280 e Índice Folin-Ciocalteu mediante el análisis estadístico PLS-1.
5. Elaborar modelos de regresión capaces de predecir los valores de IPT280 e Índice Folin-Ciocalteu en vinos mediante el análisis estadístico SVM-R

Capítulo 2: Fundamento teórico



2.1. El vino y su producción

Desde el punto de vista enológico, el término “vino” se define como aquella bebida que resulta de la fermentación del mosto producto de la maceración de la uva, producida generalmente por las células de la levadura.

El vino contiene numerosos componentes químicos que varían en composición y en proporciones debido a diversos factores como la calidad de la materia prima (la uva), las condiciones de elaboración, el almacenamiento y transporte.

Los componentes del vino son el agua, los alcoholes, ácidos, azúcares, compuestos fenólicos, compuestos nitrogenados, las vitaminas y varios compuestos volátiles, los cuales son capaces de aportar aromas y sabores únicos, al igual que afectan a la calidad percibida.

La calidad en la industria del vino ha ido tomando cada vez más relevancia en las últimas décadas. Esto se debe, a que en todo el mundo la producción del vino y por consiguiente su oferta ha crecido, llevando a una bajada de su precio y a una disminución de los márgenes rentables para sus productores. Por lo que surge la idea de que la industria vinícola debe velar más por la calidad del vino para liderar la competencia [4].

En la *Figura 1* se pueden observar un gráfico de barras obtenido a partir de los datos de la OIV (2015-2016) de los países más productores de vino en el mundo [5]. La mayor parte del vino producido a nivel mundial se elabora en Europa, destacando Italia, Francia y España como los países Europeos donde se produce más vino.

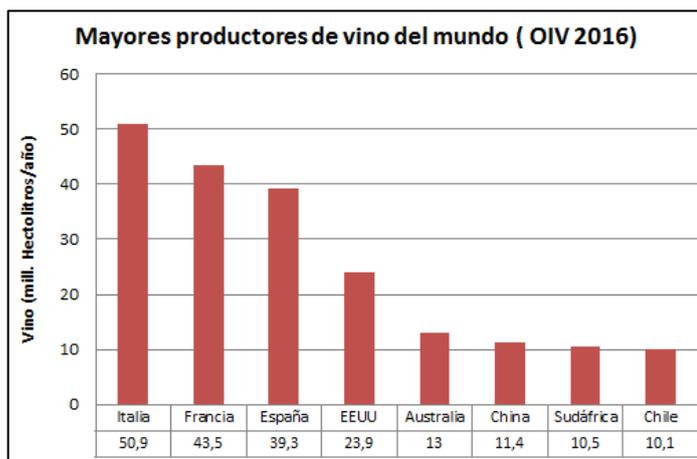


Figura 1-Diagrama de barras que muestra las regiones vinícolas con mayor producción a nivel mundial.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Europa Occidental constituye la región más significativa, tanto en términos de superficie vitivinícola como de cantidad de producción. Esto se debe a que esta región se caracteriza por inviernos fríos y húmedos y veranos cálidos y relativamente secos, siendo la viticultura tradicionalmente de secano y sin riego.

España se encuentra entre los líderes mundiales en la producción de vino. El territorio español consiste principalmente en una meseta rodeada de montaña con un promedio de 670 m de altitud. La altitud y las cordilleras a lo largo de las orillas del norte y noroeste producen una larga sombra de lluvias sobre la mayor parte de la meseta.

Su clima mediterráneo, caracterizado por veranos secos y calurosos e inviernos húmedos y lluviosos, ha influido notablemente en la práctica vitivinícola española.

La densidad de la vid se mantiene en las zonas más secas de la meseta (La Mancha), que tiene hasta 1.200 cepas/ha, para asegurar suficiente humedad durante los veranos calurosos. En áreas con precipitaciones más abundantes y uniformes, como es La Rioja, las densidades de siembra es de 3.000 - 3.600 cepas/ha.

Aunque España posee más superficie vitivinícola que cualquier otro país (1,2 millones de hectáreas), ocupa el tercer lugar en la producción de vino (39,3 millones de hectolitros anuales) y cuenta con 70 Denominaciones de Origen en vino, como por ejemplo: D.O. Rueda (Castilla y León), D.O. Ribera de Duero (Castilla y León), D.O. Somontano (Aragón), D.O. Rías Baixas (Galicia), etc.

La Denominación de Origen Protegida (D.O.) es un sistema utilizado para el reconocimiento de una calidad diferenciada, como consecuencia de características propias y diferenciales debidas al medio geográfico en el que se producen las materias primas, se elaboran los productos y la influencia del factor humano que participa en las mismas.

Además, existe una categoría superior a la D.O. llamada Denominación de Origen Calificada (D.O.Ca) y para que un vino pertenezca a esta categoría ha de pasar un sistema de control desde su producción hasta su comercialización para garantizar su calidad, el vino producido debe venderse embotellado y tiene que haber pasado al menos diez años desde su reconocimiento como vino con D.O., junto con las características necesarias para pertenecer a D.O. En España hay dos vinos que son D.O.Ca: D.O.Ca Rioja (Rioja) y D.O.Ca Priorato (Cataluña).

Aunque la reputación de los vinos tintos españoles se basa en gran parte en los cultivos como “Tempranillo”, “Cabernet” y “Garnacha”, la mayoría de los vinos se producen a partir de variedad “Cabernet”. Esta última es tan extensamente



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

cultivada, que es y sigue siendo la variedad de vid más cultivadas a nivel mundial [6].

2.1.1. Componentes químicos del vino

La gran mayoría de los productos químicos presentes en el vino son subproductos metabólicos de la actividad de la levadura durante la fermentación. En comparación, el número de compuestos aromáticos derivados de las uvas es menor. Sin embargo, éstos suelen constituir los compuestos que hacen distintivos los vinos [6].

A continuación, la *Tabla 1* muestra los componentes del vino y sus principales cualidades [7]. Los compuestos fenólicos se explicarán con más detalle ya que, la relación entre la calidad de un vino particular y su composición fenólica, constituyen uno de los principales retos para los enólogos. La huella de los antocianinos presentes en los vinos se considera una herramienta analítica para la certificación de su autenticidad.

El estudio de la composición fenólica de las uvas y los vino permite el establecimiento de uno o más biomarcadores específicos para un tipo particular de uvas, permitiendo evaluar su evolución química durante el crecimiento y maduración y desarrollar métodos nuevos y mejorados para la supervisión de dichos procesos y, como ya se ha mencionado, para la verificación de la autenticación del vino, protegiendo así a los consumidores contra el fraude.

Por todos estos motivos, en el proyecto se han utilizado varias técnicas de análisis fenólico en vinos, que se detallan más adelante [7].



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Tabla 1 - Tabla resumen de los componentes principales del vino.

	Efectos	Concentración	Tipos	Comentarios
Componentes Fenólicos	Color			
	Astringencia Amargor	-	-	-
Azúcares	Sabor Dulce	V.dulce: 9,5-16 g/l	Glucosa	-
		V. no dulce: 1,5 g/l	Fructosa	
Polisacáridos	-	500-1.500 mg/l	-	Se originan a partir de las paredes celulares de la uva y la autólisis de microorganismos de la levadura.
Proteínas	Enturbiamiento	-	Alinina Glicina Serina Treonina	-
Ácidos	Acidez	-	Tartárico Málico Cítrico Succínico	Se forma durante el crecimiento y maduración de la uva.
Componentes no volátiles	-	0,8-1,2 g/l	Alcoholes Ésteres Aldehídos Cetonas Terpenos Fenoles	-

Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son componentes no volátiles muy reconocidos como un componente esencial de la calidad del vino.

Los polifenoles son compuestos inestables, sus reacciones comienzan una vez que la uva es prensada o triturada, continuando a lo largo de la vinificación y envejecimiento. Estas reacciones pueden implicar interacción o unión con compuestos aromáticos, influyendo así en la liberación y percepción del aroma [4].

La composición fenólica no volátil del vino depende de numerosos factores, como la variedad y madurez de la uva, factores medioambientales en los viñedos (clima, suelo, estado sanitario) y la tecnología vinícola, así como también de las condiciones de fermentación y envejecimiento [7].

Los polifenoles constituyen una familia heterogénea de compuestos químicos con varios componentes, como son: Ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, estilbenos, cumarinas, lignanos, antocianinos y análogos de feniletanol.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Los compuestos fenólicos juegan un papel importante en las características sensoriales de las uvas y del vino, ya que influyen fuertemente en las propiedades organolépticas (aroma, color, sabor, amargor y astringencia). Además, son un potente antioxidante y se ha relacionado la ingesta de vino con beneficios muy saludables.

La oxidación es uno de los procesos más importantes en el deterioro de los productos alimenticios. Tiene grandes repercusiones en el color, sabor y textura de los alimentos. Los antioxidantes protegen la calidad de un alimento y previenen su deterioro ocasionado por reacciones oxidativas, por ser moléculas que inhiben la oxidación de otras moléculas, ya que, evitan la reacción química por la que se produce la transferencia de electrones o hidrógeno desde una sustancia hacia un agente oxidante. Las reacciones oxidativas originan radicales libres que actúan como sustancias indicadoras de reacciones en cadena, y si se producen en una célula pueden producir daños o la muerte de dicha célula.

El vino rico en compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides) imparte la actividad antioxidante. Entre los flavonoides que tienen propiedades antioxidantes y producen numerosos beneficios como: anti-inflamatorios, anti-alérgicos, anti-hemorrágicos y anti-cancerígenos, se pueden citar el canferol, la cuercitina, la mirecetina y la catequina [8].

El color del vino está fuertemente influenciado no sólo por la composición de la uva y las prácticas enológicas, sino también por las técnicas de elaboración del vino, la temperatura de almacenamiento y la exposición al oxígeno. Los antocianinos y los taninos son los compuestos más relevantes en relación al color y estabilidad en los vinos tintos.

Según su estructura se los puede agrupar en dos grandes grupos: Fenoles Flavonoides y Fenoles no Flavonoides, que a su vez se subdividen, como se puede apreciar en el diagrama de la *Figura 2* [9].



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO



Figura 2-Clasificación según su estructura de los poli-fenoles del vino.

La denominación **ácido fenólico** se aplica a todos los compuestos orgánicos que poseen como mínimo una función carboxílica y un hidroxilo fenólico. Existen de forma predominante como ácidos hidroxibenzoicos, que contienen 7 átomos de carbono, y hidroxicinámicos, que contienen 9 átomos de carbono.

Ambos están presentes tanto en la uva como en el vino. El vino tinto contiene aproximadamente 9,63 mg/100 ml ácidos hidroxicinámicos y 7,02 mg/ 100 ml ácidos hidroxibenzoicos.

Los **estilbenos** están formados por dos anillos aromáticos (bencenos) separados entre sí por un puente etano o eteno (*Figura 3a*). Pueden estar libres o formando heterósidos a veces poliméricos. El resveratol (*Figura 3b*) es el estilbeno más representativo, siendo el vino una de sus fuentes principales.

Este compuesto se produce en las hojas y en la piel de las uvas en respuesta a una infección o a un estrés inducido por herbicidas, fungicidas o la luz UV. El resveratol se encuentra como aglicón (trans- y cis- resveratol), o como glucósido (trans- y cis- piceído) y en formas diméricas (viniferin y pallidol).

El contenido en resveratol en la uva disminuye considerablemente durante la maduración del fruto, y en el vino está solamente a nivel de trazas, siendo su concentración en función de la técnica enológica utilizada en su vinificación [10].

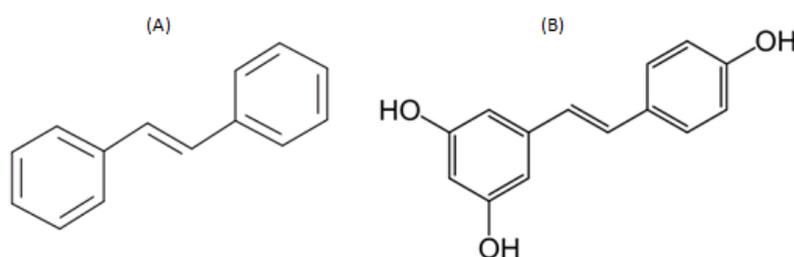


Figura 3- a) Estructura de estilbeno. b) Estructura de resveratol



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Los **flavonoides** son un grupo de pigmentos hidrosolubles y son los responsables de la coloración de flores, frutos e incluso de las hojas. Su estructura deriva de la 2-fenil-cromona (*Figura4*) [11].

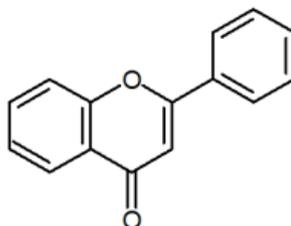


Figura 4-Estructura de los flavonoides (2-fenil-cromona).

Los compuestos flavonoides están formados por 15 átomos de carbono que se encuentran constituyendo dos anillos aromáticos unidos entre sí mediante una cadena carbonada de 3 átomos (que puede formar parte de un tercer anillo aromático) [7].

Es un grupo de gran diversidad y complejidad química que se encuentran de forma abundante en el vino y en la uva. Están presentes en la piel y en las semillas de la uva, así como en el vino. El vino contiene flavanoles, incluyendo proantocianinas (polímeros) y catequinas (monómeros). Los principales monómeros de los flavanoles son (+)-catequina y su enantiomero la (-)-epicatequina.

Los flavonoles siguen a los flavanoles como los flavonoides más abundantes en el vino. Los principales flavonoles en el vino tinto son quercetina 3-O-ramnósido y la quercetina 3-O-glucósido.

Dentro del grupo de los flavonoides, se clasifican a los antocianinos, los cuales tienen especial relevancia dentro del proceso de envejecimiento del vino.

Los **antocianinos**, están formados por dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado, insaturado y catiónico denominado ión flavilium.

Se distinguen cinco tipos de moléculas de antocianinos que difieren en el número de hidroxilos (OH) y grupos metilo (OCH₃) en el anillo B (*Figura 5*).



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

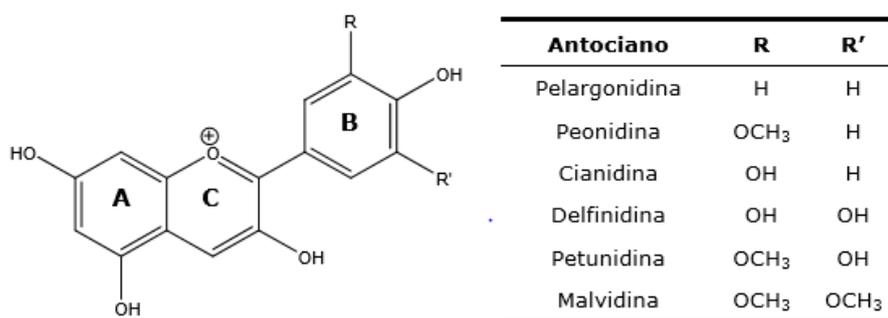


Figura 5-Estructura de las principales antocianinas.

Durante la conservación y envejecimiento de los vinos tintos, la concentración de antocianinos de la uva, inicialmente responsables de la co-pigmentación, disminuye debido a que reaccionan progresivamente con otros compuestos fenólicos, particularmente flavanoles, pudiendo ser esto la causa del cambio de color en vinos jóvenes de rojo-azulado a marrón-rojizo en vinos madurados; así como, la disminución de astringencia del vino a medida que envejece [12].

Los **taninos** son de particular importancia en el vino tinto, son los compuestos fenólicos más abundantes en las uvas y contribuyen a la astringencia percibida [4], [7].

Normalmente se dividen en dos clases: taninos hidrolizables y taninos no hidrolizables o condensados. Los taninos naturales presentes en uvas y vino, son predominantemente del tipo condensado. En vinos jóvenes, los taninos aparecen principalmente en forma de dímeros o trímeros. Sin embargo, la concentración de estas especies disminuye durante el envejecimiento debido a procesos de oxidación y precipitación [13].

Taninos hidrolizables

Los taninos hidrolizables son polifenoles complejos que pueden ser degradados mediante cambios en el pH, así como reacciones de hidrólisis tanto enzimática como no enzimática. El resultado de estas operaciones son azúcares y ácidos fenólicos [7].

Taninos condensados o proantocianidinas

Los taninos condensados o proantocianidinas poliméricas son precursores de las antocianidinas. Se han encontrado en cantidades residuales en los componentes sólidos de la uva como en la piel, en las semillas o en la pulpa.

CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Estos compuestos se transfieren al mosto durante el proceso de vinificación (prensado, maceración y fermentación).

Las proantocianidinas son moléculas de alto peso molecular que generalmente aparecen como oligómeros y polímeros de flavan-3-oles ligados entre sí por enlaces carbono-carbono. Los flavan-3-oles son productos del metabolismo de los flavonoides, se forman por hidroxilación en posición 3 de una flavanona.

Los monómeros flavan-3-oles están formados por dos anillos bencénicos unidos por un heterociclo oxigenado saturado, pudiendo encontrarse cuatro isómeros: (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-catequina y (+)-epicatequina (*Figura 6*). Los más abundantes son los dos primeros, así como también los derivados de la epicatequina en forma de éster gálico. Los taninos son complejos derivados de los compuestos anteriores [14].

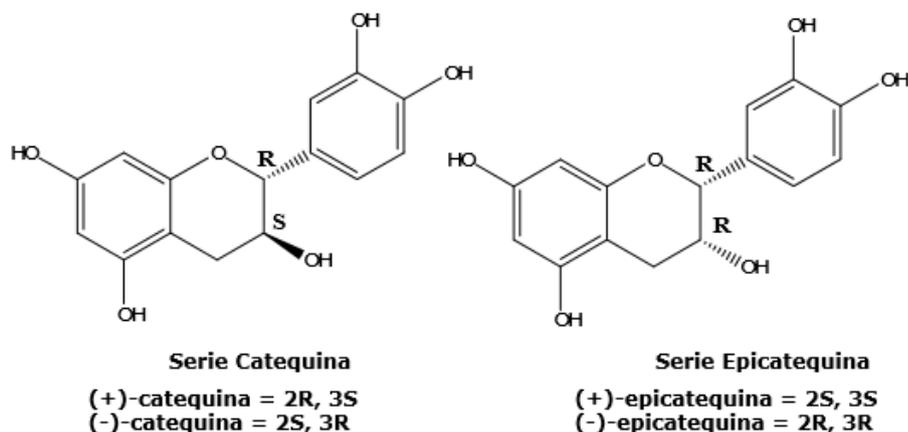


Figura 6-Estructura de los flavan-3-oles.

2.1.2. Clasificación del vino según su período de envejecimiento

Los vinos se dividen en vinos jóvenes, que son los que se embotellan después de la fermentación, y los vinos con crianza, que son los que pasan un tiempo en barricas de roble. Tanto los vinos jóvenes como los vino con crianza pueden ser blancos, rosados y tintos, aunque es más normal que los de crianza sean los tintos.

El tiempo de permanencia de un vino tanto en bodega como en botella, determina que sea Crianza, Reserva o Gran Reserva. El tiempo establecido puede variar según los Consejos Reguladores de las diferentes Denominaciones de Origen.

La crianza en bodega aporta sabores y olores al vino, según el tipo de roble (normalmente francés ó americano), según el nivel de tostado que se le haya dado



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

a la madera y según la edad de la barrica. En ellas se sucederá una serie de procesos físico-químicos que irán “envejeciendo” el vino, estableciendo su color y enriqueciendo sus aromas [15].

2.1.2.1. Características del vino según su crianza

Según el tiempo de envejecimiento de los vinos en barrica y en botella, los vinos tintos se pueden clasificar en Jóvenes, Semi-Crianza o Roble, Crianza, Reserva y Gran Reserva.

Jóvenes (o del año): También conocidos como vino cosechero, no ha pasado ningún tiempo en la barrica o no el suficiente para ser considerado “crianza”. Se comercializa en su primer año de viña, y no es necesario almacenarlo mucho tiempo.

Semi-Crianza o Roble: Es el vino que ha pasado menos de seis meses en la barrica, pero sin llegar a los periodos de crianza de los distintos consejos reguladores, y otros seis meses en botella. Una de las características más relevante de los vinos semi-crianza, es que tiene una vida un poco más larga que la de los vinos jóvenes.

Crianza: Se comercializa en su segundo o tercer año de vida, después de pasar al menos un año en barrica, en el caso de los tintos. El resto del tiempo envejece en botella antes de ser etiquetado. Estos vinos pueden aguantar de cinco a diez años de vida, en función de las condiciones de almacenaje.

Reserva: El vino se somete al menos a tres años completos de envejecimiento, aunque el periodo mínimo de permanencia en barrica coincide con el de crianza: un año.

Gran Reserva: A esta categoría sólo llegan las cosechas excepcionales, se caracteriza porque para su elaboración es necesaria una uva de gran calidad. Se suelen etiquetar después de permanecer como mínimo dos años en barrica y tres en botella. Es decir, el vino gran reserva necesita envejecer al menos cinco años.



2.1.3. Evolución del color y compuestos fenólicos durante la crianza del vino

Durante el proceso de envejecimiento del vino, la concentración de antocianinos libres va disminuyendo hasta incluso desaparecer, sin que el color del vino desaparezca en la misma proporción. Esta disminución se debe a reacciones de degradación y estabilización. Las reacciones de estabilización tienen, la mayoría de las veces, su origen en la formación de combinaciones entre antocianinos y taninos y otros compuestos derivados de los antocianinos.

A continuación, se muestran las reacciones que se dan en el vino a lo largo de su crianza, las cuales producen que disminuya el color del vino y, por consiguiente, el contenido total de polifenoles.

La evolución del color y el contenido polifenólico de los vinos se ve afectado por diferentes reacciones de condensación, formación de nuevos pigmentos y reacciones de polimerización que tienen lugar entre los diferentes componentes presentes en el vino [14]

Reacciones de condensación antocianino-tanino.

Estas reacciones están basadas en procesos de adición donde los antocianinos y los taninos pueden actuar tanto como agentes electrófilos, moléculas que presentan una deficiencia de electrones y tienden a unirse con moléculas con exceso de electrones, o como nucleófilos. Las condensaciones antociano-tanino son [16] :

- **Condensación tanino-antociano (T-A⁺)**
- **Condensación antociano-tanino (A⁺-T)**
- **Polimerización por puente de etilo**

Formación de nuevos pigmentos derivados de los antocianinos y taninos

En el vino se han identificado pigmentos nuevos derivados de los antocianinos y conocidos con el nombre de piranoantocianos.

Estos pigmentos se originan por reacción de los antocianinos (antocianos) con compuestos de bajo peso molecular, principalmente metabolitos producidos por las levaduras, como acetaldehído, ácido pirúvico o vinilfenoles, por medio de una reacción de cicloadición (Figura 7). También, puede incluir especies de más alto peso molecular, en las cuales la unidad de piranoantociano está unida a moléculas de tanino.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Los pigmentos formados absorben a longitudes de onda más bajas que los antocianinos, por lo que podría influir en el cambio de color malva a rojo anaranjado que sufren los vinos durante el envejecimiento. Son muy estables y resistentes a las variaciones del pH y de sulfuroso [17].

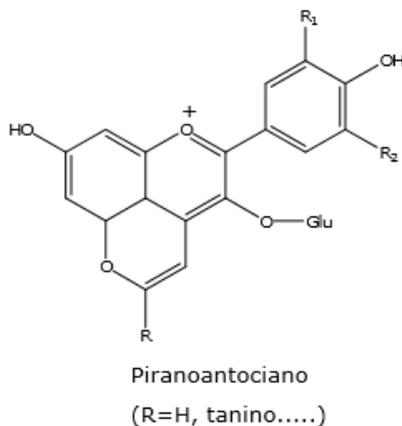


Figura 7-Estructura de nuevos pigmentos (piranoantocianos).

Polimerización de los taninos

En el vino, los taninos son muy reactivos y con el tiempo se producen reacciones de polimerización que tienden a incrementar el tamaño medio de la fracción procianidínica. La polimerización de estos compuestos se puede llevar por las siguientes vías:

- **Condensación directa (T-T).**
- **Condensaciones mediadas por acetaldehído.**

Estas reacciones influyen en la astringencia del vino, de tal forma la reacción de condensación directa (T-T) hacen que la astringencia, mientras que la reacción de condensación mediada por acetaldehído puede aumentar el amargor del vino y disminuye la astringencia. En ambos casos se produce un complejo de color amarillo que precipita y que influye en el color del vino [14].

2.1.4. Métodos utilizados para la determinación de compuestos fenólicos y parámetros de color en los vinos

Durante la producción del vino se hace imprescindible un elevado nivel de calidad y de seguridad, lo que ha llevado a desarrollar varios procedimientos analíticos para estudiar su perfil de composición [18], [19].



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Históricamente, la evaluación sensorial es el método más directo y ampliamente aplicado para evaluar la calidad del vino, así como para autenticar los productos vitivinícolas. Sin embargo, estos métodos son subjetivos y por muchos años de experiencia de la persona que los evalúe no son suficientes para asegurar un conocimiento completo de su composición química y propiedades. Además, estas evaluaciones requieren mucho tiempo y muchas veces conducen a conclusiones incorrectas sobre la calidad y la composición del vino.

Como consecuencia ante la necesidad de un análisis objetivo de la composición y propiedades de los diferentes vinos, se han desarrollado varios métodos analíticos para análisis físico, químico y microbiológico [19], [20].

La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) propone una lista de métodos y procedimientos analíticos, para analizar concentraciones, composiciones y diferenciar vinos, tales como: Cromatografía de gases, espectrometría de masas, espectrometría UV-vis y cromatografía líquida, entre otras [21]. Aunque son reconocidas por la comunidad internacional como exactas y precisas, estas metodologías tradicionales son lentas, costosas, laboriosas y destructivas, limitando su aplicación a un número restringido de parámetros y haciéndolos inadecuados para satisfacer todas las demandas de la industria vinícola.

Es por ello que, en las últimas décadas, se ha dedicado un mayor interés al empleo de otras metodologías más modernas capaces de superar las limitaciones descritas, asegurando simultáneamente un alto nivel de robustez y precisión. De este modo, se están utilizando también técnicas como la espectroscopía infrarroja y/o espectroscopía Raman en el análisis de vinos [19].

En el presente trabajo se han utilizado técnicas tradicionales de análisis como son la espectroscopía UV-Visible para la determinación de índices polifenólicos (Folin-Ciocalteu e IPT280) y para determinar parámetros de color en los vinos (espacio CIELab y parámetros Glories).

Por otra parte, los vinos también se han analizado mediante Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier, por lo que estos métodos se van a describir con más detalle.

2.1.4.1. Espectroscopía UV-visible

La espectrometría ultravioleta-visible (UV-vis) se ha convertido en uno de los métodos analíticos más importante en el laboratorio moderno. En muchas aplicaciones, se podrían emplear otras técnicas, pero no son tan competitivos cómo esta técnica debido a las **ventajas** que presenta este método, como son, su simplicidad, versatilidad, velocidad, precisión y rentabilidad [22].



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Mediante esta técnica se pueden analizar varios parámetros de interés en los vinos, que permiten clasificarlos según su envejecimiento, clase de uva, origen, etc

La espectrometría UV-vis permite determinar de forma sencilla el contenido polifenólico de los vinos mediante el índice de Folin-Ciocalteu y/o el índice IPT280, entre otros [23].

Aun así esta técnica también presenta algún **inconveniente**, siendo el más destacado su pobre selectividad, ya que en muchos casos los espectros del UV-visible muestran superposiciones fuertes en sistemas complejos, efecto que también sucedía en espectrometría de infrarrojo. Afortunadamente, los métodos multivariante proporcionan una forma de ampliar la aplicabilidad de los métodos espectrofotométricos para el análisis multicomponente, y les hace más ventajosos frente a métodos como HPLC, entre otros [22].

2.1.4.1.1. Índice Folin-Ciocalteu

Los compuestos fenólicos constituyen una de las principales clases de metabolitos secundarios de los vegetales, donde desempeñan diversas funciones fisiológicas. Se trata de compuestos que intervienen en el crecimiento y reproducción de las plantas, así como en procesos defensivos contra agentes patógenos, depredadores o radiación ultravioleta. Tradicionalmente, se han considerado como sustancias anti-nutritivas debido al efecto adverso de uno de sus componentes principales, los taninos, en la digestibilidad de proteínas. Sin embargo, actualmente existe gran interés en estos compuestos debido a la gran variedad de actividades biológicas que presentan, considerándose uno de los compuestos fitoquímicos alimentarios más importantes por su contribución al mantenimiento de la salud humana.

La actividad biológica de los polifenoles está relacionada con su carácter antioxidante, el cual es debido a su habilidad para quelar metales, inhibir la actividad de la enzima lipooxigenasa y actuar como atrapadores de radicales libres. La cantidad de compuestos polifenólicos y tipos presentes en un alimento varía en función de la especie vegetal, variedad y parte del vegetal considerada (fruto, semillas, brotes, hojas), horas de exposición solar, grado de madurez, condiciones de cultivo, procesado, condiciones de almacenamiento, etc.

Además de los efectos sobre la salud, muchos compuestos polifenólicos tienen un efecto sobre la calidad de los alimentos que los contienen, puesto que son responsables de algunas propiedades sensoriales.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Es por ello que, el análisis del contenido de compuestos polifenólicos en un alimento es importante, debido a la gran variedad de actividades biológicas que estos compuestos presentan.

Su determinación puede realizarse por medio de diversos métodos, entre ellos el índice Folin-Ciocalteu y el IPT280, que se aplican ampliamente en bebidas y/o alimentos, y cuyo procedimiento experimental está descrito por la OIV (poner referencia de la OIV).

El **índice Folin-Ciocalteu** se utiliza como medida del contenido de compuestos fenólicos totales en productos vegetales. Se basa en que los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu, a pH básico, dando lugar a una coloración azul, susceptible de ser determinada espectrofotométricamente a 750 nm. Este reactivo contiene una mezcla de wolframato sódico y molibdato sódico en ácido fosfórico y reacciona con los compuestos fenólicos presentes en la muestra. El ácido fosfomolibdotúngstico (formado por las dos sales en el medio ácido), de color amarillo, al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso, cuya intensidad es la que medimos para evaluar el contenido en polifenoles (*Figura 8*).

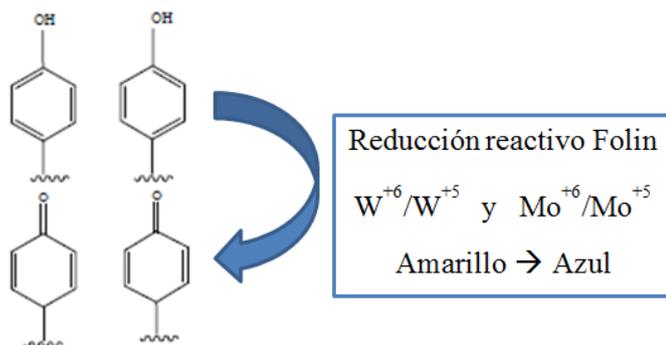


Figura 8-Mecanismo de acción del reactivo de Folin-Ciocalteu.

El mecanismo de reacción es una reacción redox, por lo que además puede considerarse también, como un método de medida de la actividad antioxidante total.

La oxidación de los polifenoles presentes en la muestra, causa la aparición de una coloración azulada que presenta un máximo de absorción en torno a 750 nm y es proporcional al porcentaje de compuestos fenólicos [24].



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1.4.1.2. Índice IPT 280

La determinación del contenido polifenólico mediante el índice IPT280 constituye otro método para obtener el contenido total de fenoles. El procedimiento experimental es más sencillo que en el caso del IFC y se obtiene a partir de la medida directa de la absorbancia a 280 nm. El núcleo bencénico característico de los compuestos polifenólicos presenta su máximo de absorbancia a esta longitud de onda [25].

2.1.4.1.3. Espacio de color CIELab

El color del vino tinto joven procede de la pequeña porción de antocianinas que se encuentra en la forma catiónica de flavilo y esta forma depende del pH y del contenido de dióxido de azufre del vino, aumentando el color rojo y la densidad del color a pH bajo y realzando el color azul a través de la decoloración a pH creciente.

Sin embargo, durante el envejecimiento tienen lugar la polimerización y copigmentación de antocianinas con taninos y otros compuestos fenólicos, lo que produce pigmentos más estables que cambian el color del vino a una tonalidad rojo ladrillo [26].

Hay varios métodos para estudiar el color del vino, siendo los más empleados el método CIELab y los parámetros de color del método Glories, los cuales son los que se usaron en el proyecto y que son definidos a continuación.

La Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) ha recomendado la caracterización del color del vino utilizando los parámetros CIELab: Rojo/verde (a^*), amarillo/azul (b^*) y claridad (L^*). El procedimiento se basa en las mediciones de los espectros de transmitancia entre 380-780 nm y el cálculo de las características cromáticas y los parámetros derivados (cromática (C^*) y tono (H^*)) utilizando la información de varias longitudes de onda. Este análisis crea parámetros de color univariados a partir de un perfil espectral multivariado.

El alcance de este método espectrofotométrico es medir y calcular la características cromáticas de los vinos derivados de componentes tricromáticos: X, Y, Z, de acuerdo con los resultados obtenidos [27].

El color de un vino puede describirse usando tres atributos o cualidades específicas de la sensación visual:



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

- Tonalidad
- Claridad
- Cromatismo

La **tonalidad** –la misma coloración- es la más característica: roja, amarilla, verde o azul.

La **claridad** es el atributo de la sensación visual según la cual un vino parece más o menos luminoso.

Sin embargo, el **cromatismo**, o el nivel de coloración, está relacionado con una intensidad de color más alta o más baja.

La combinación de estos tres conceptos nos permite definir los múltiples tonos de color que presentan los vinos. Las características cromáticas de un vino se definen por las coordenadas colorimétricas o de la cromaticidad (*Figura 9*) [27].

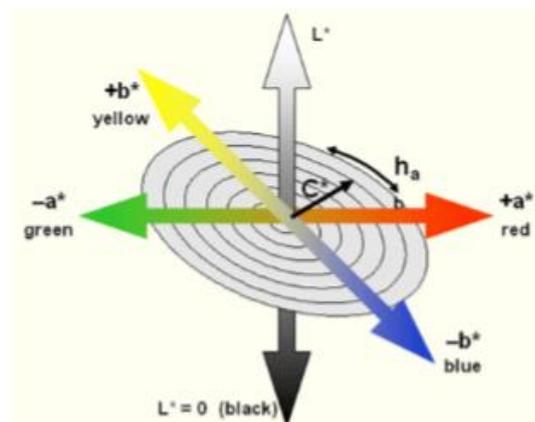


Figura 9-Parámetros CIELab del color [27].

Dónde los parámetros de la ilustración significan lo siguiente:

- (L^*) Claridad
- (a^*) Componente de color rojo/verde
- (b^*) Componente de color azul/amarillo
- (C^*) Croma
- (H^*) Tono
- [(a^*, b^*) o (C^*, H^*)] Cromaticidad

Los tres primeros parámetros se obtienen directamente de la espectrometría de UV-visible, sin embargo, los tres últimos son magnitudes derivadas que se calculan a partir de los anteriores.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Claridad (L*)

Se relaciona directamente con la sensación visual de luminosidad. Su símbolo es (L*).

Componente del color rojo/verde

Su símbolo es (a*).

Componente del color amarillo/azul

Se representa como (b*).

A partir de estos valores se obtienen matemáticamente los parámetros C* y H*.

Croma C*

Se define de acuerdo con la siguiente función matemática (*Ecuación 1*):

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

Ecuación 1- Parámetro del color: croma.

Tono H*

Sus unidades son expresadas en grados sexagesimales (°), siendo representado matemáticamente por la *Ecuación 2*:

$$H^* = \text{tg}^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

Ecuación 2-Parámetro del color: tono.

2.1.4.1.4. Índices colorimétricos de Glories

Los parámetros de Glories también se utilizan para definir el color del vino. Se determinan midiendo la absorbancia a longitudes de onda de 420, 520 y 620 nm [28] y a partir de las ecuaciones siguientes (*Ecuaciones 3-9*):

$$(CD) \text{Densidad de color} = (A_{420} + A_{520})$$

Ecuación 3-Parámetros Glories: Intensidad del color.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

$$(CI) \textit{Intensidad de color} = (A420 + A520 + A620)$$

Ecuación 4-Parámetros Glories: Densidad del color.

$$(T) \textit{Tono} = \left(\frac{A420}{A520} \right)$$

Ecuación 5-Parámetros Glories: Tono.

$$(dA\%) \textit{Proporción de color rojo producido por cationes de flavilo} \\ = \left(\frac{A520 - \frac{A420 - A620}{2}}{A520} \cdot 100 \right)$$

Ecuación 6-Parámetros Glories: Proporción de pigmentación roja aportada por los cationes de flavilo.

$$(Y\%) \textit{Proporción de color amarillo} = \left(\frac{A420}{CI} \cdot 100 \right)$$

Ecuación 7-Parámetros Glories: Proporción de color amarillo presente en el vino.

$$(R\%) \textit{Proporción de color rojo} = \left(\frac{A520}{CI} \cdot 100 \right)$$

Ecuación 8-Parámetros Glories: Proporción de color rojo presente en el vino.

$$(B\%) \textit{Proporción de color azul} = \left(\frac{A620}{CI} \cdot 100 \right)$$

Ecuación 9-Parámetros Glories: Proporción de color azul presente en el vino.

2.1.4.2. Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier

La espectrometría infrarroja (IR) se basa en la interpretación de los enlaces moleculares, en los rangos espectrales 14000-4000 cm^{-1} (infrarrojo cercano, NIR), 4000-400 cm^{-1} (infrarrojo medio, MIR) y 400-10 cm^{-1} (infrarrojo lejano), proporcionando información útil sobre las propiedades físicas y químicas de las muestras.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

El espectro MIR es el resultado de las vibraciones de estiramiento, flexión y rotación, mientras que el espectro NIR se caracteriza por complejas bandas de combinaciones de las vibraciones fundamentales.

Esta técnica se considera una técnica de huellas dactilares, capaz de proporcionar información valiosa sobre varias propiedades de una muestra.

En la últimas dos décadas, esta técnica ha demostrado su potencial en la industria del vino, ya que las bandas de absorción agudas y específicas que presenta el espectro MIR del vino hace que sea una técnica muy atractiva, permitiendo la asignación de bandas específicas a los parámetros de composición correspondientes de los vinos [19].

Esta técnica ofrece diversas **ventajas**, es una técnica no destructiva y respetuosa con el medio ambiente, que requiere una preparación de muestras mínima, permitiendo la estimación de varias propiedades en una sola medición en un corto período de tiempo. Además, es capaz de proporcionar simultáneamente un alto nivel de reproducibilidad y precisión.

Entre sus **inconvenientes**, la presencia de agua y etanol, que dominan la región infrarroja, interfieren con la determinación de otros compuestos menores. Pero estos inconvenientes son particularmente mejorados cuando se aplica la técnica a muestras de vino. Además, la complejidad de la matriz de vino, por contener cientos de compuestos químicos, y la similitud química entre los principales compuestos del vino, que hace que la absorción en el infrarrojo sea similar, complican aún más la extracción de información.

Otras limitaciones pueden ser el coste relativamente alto de los instrumentos comercialmente disponibles (que impide que muchos productores adopten este equipo para el control del proceso), la baja sensibilidad de la técnica, la calibración y la dependencia de conocimientos científicos específicos para llevar a cabo esta tarea [29].

2.2. Lengua Electrónica

Las investigaciones sobre el mecanismo de la recepción gustativa de las sustancias comenzaron en el año 2000 con el descubrimiento de los receptores del amargor en las células gustativas (Taste-2 o T2R), seguido del descubrimiento de los receptores del dulzor (T1R2+T1R3) y los receptores unami (T1R1+T1R3).

Pero mientras se llevaba a cabo la investigación sobre la biología molecular y celular de la recepción del gusto, ya se habían desarrollado en la década de los 90 tecnologías de detección para su evaluación objetiva, como la discriminación y



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

cuantificación de los sabores.-No obstante, las pruebas sensoriales llevadas a cabo por evaluadores experimentados (catadores), presentaban algunos problemas, como la baja objetividad y reproducibilidad. Fue entonces, cuando surgió la necesidad de desarrollar una tecnología de detección para discriminar objetivamente y para cuantificar el sabor de los alimentos [30].

La inspiración biológica de los sentidos del gusto y del olfato permitió a los científicos construir dispositivos para aplicaciones no solo en la industria alimentaria, sino también en el campo de la medicina y la vigilancia del medio ambiente.

Todo comenzó en 1982, cuando el concepto de nariz electrónica como una herramienta compuesta de sensores para clasificar los olores fue introducido por Persaud y Dodd [31]. El objetivo de su trabajo era crear una herramienta capaz de emular el sistema olfativo para reconocer diferentes olores y dar respuestas reproducibles.

La nariz electrónica desarrollada comprendía una matriz de sensores para simular los receptores del sistema olfatorio humano, una unidad de procesamiento de datos que realizaría la misma función que el bulbo olfatorio y un sistema de reconocimiento de patrones que reconocería los patrones olfativos de la sustancia bajo estudio.

Debido a la capacidad de la nariz electrónica para discriminar y reconocer una variedad de diferentes gases y olores utilizando sólo un pequeño número de sensores, y que los primeros resultados obtenidos de la investigación en este campo fueron prometedores, hubo un gran interés en este tema en la comunidad científica [31]. A partir de ese momento, el término "nariz electrónica" fue ampliamente reconocido.

En 1985, Otto y Thomas presentaron el primer sistema de análisis líquido basado en matriz multisensor [32]. Desde entonces se han presentado algunos dispositivos de este tipo, denominados "lengua electrónica".

En 1989, Toko y colaboradores solicitaron una patente de su sensor de sabor y desarrollaron un electrodo multicanal con membranas de polímero lipídico, conocido como "sensor de sabor" [32]. Este sensor fue considerado como una lengua electrónica con selectividad global, cuyo objetivo era descomponer las características de una sustancia química en cada tipo de gusto para cuantificarlas, en lugar de discriminar las sustancias químicas de forma individual. El sensor del sabor presenta electrodos de trabajo a los que se le une la membrana polimérica lipídica y un electrodo de referencia, y mide los cambios en el potencial de membrana generado cuando estos electrodos están sumergidos en una solución



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

con sustancias químicas. Con este sistema se permitió la clasificación de las cervezas, el café y otros productos alimenticios [32].

Actualmente, existen tres lenguas electrónicas comerciales. Una de ellas es ASTREE, fabricado por AlphamOS (Francia), cuyos sensores son transistores de efecto de campo selectivos de iones (ISFETs), que se utiliza para discriminar las muestras de una solución. Además, es empleado por la industria farmacéutica principalmente, para estudiar las formulaciones de fármacos desde el punto de vista del gusto; sin embargo, su incursión en el mercado del control de la calidad de los alimentos aún no se ha consolidado. Las otras dos lenguas electrónicas comerciales son el resultado de la investigación dirigida por el profesor Toko y se fabrican en Japón. El dispositivo se denomina sensor del sabor SA 402B y TS-5000Z, y se venden a través de la empresa Intelligent Sensor Technology (INSENT). Se utilizan principalmente para cuantificar la intensidad de cada tipo de sabor identificado, por lo que es empleado en la industria de los alimentos.

En 1995, se propone una de lengua electrónica basada en sensores químicos no específicos y de reconocimiento de patrones [32]. En los siguientes años, en 1997, Winqvist y Lundström desarrollaron una lengua electrónica voltamétrica con la que se pudo discriminar entre las diferentes marcas de naranja y jugo de manzana [32].

También, Legin y colaboradores utilizaron sensores potenciométricos no selectivos basados en electrodos cristalinos de estado sólido a base de vidrio calcogenuro para formar una lengua electrónica. Con este dispositivo se clasificaron aguas minerales, el vino y el café empleando el análisis de componentes principales PCA (de sus siglas en inglés) y técnicas de red neuronal [32].

En el año 2000, se desarrolló una lengua electrónica híbrida, combinando las tecnologías de medición de potenciometría, voltamperometría y conductividad. La lengua consistía en una red de seis electrodos metálicos y se utilizó el análisis PCA para analizar los datos obtenidos y discriminar los alimentos [30].

Hasta no hace muchos años, el desarrollo del análisis voltamperométrico estaba limitado por los materiales electrolíticos disponibles, dado que sólo era posible utilizar el electrodo de gotas de mercurio, un metal o el electrodo de carbono. Éstos pueden considerarse los precursores de los electrodos de superficie modificada. Un electrodo de superficie modificada pretende ejercer un mayor control sobre sus características e influir no sólo en el potencial aplicado sino también en la reactividad superficial, pudiendo seleccionar o anticipar la respuesta del electrodo modificado hacia especies externas.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

El material modificador se elige de tal manera que sea o bien selectivo a un analito, o bien capaz de mediar reacciones redox que son lentas, o incluso imposibles, para el electrodo sin modificar. De esta forma, los procesos redox que ocurren entre el electrodo y el analito en disolución están influidos por las características del modificador empleado.

La gama de materiales modificadores utilizados es muy amplia, variando desde depósitos metálicos o capas de óxidos metálicos, hasta el uso de materiales orgánico, enzimas o polímeros [33].

En los años 2003-2004, el grupo de investigación UVaSens del Departamento de Química Inorgánica y Química Física de la Universidad de Valladolid, desarrolló la primera lengua electrónica voltamétrica basada en electrodos modificados químicamente. Esta lengua electrónica estaba basada en sensores preparados con pasta de grafito donde las ftalocianinas se mezclaron con polvo de grafito y aceite mineral (Nujol) y se aplicaron en el análisis de vinos [34], [35]. En los años siguientes, se publicaron numerosos trabajos basados en lenguas electrónicas voltamétricas con electrodos modificados con ftalocianinas en el análisis de vinos y uvas. Estos trabajos empleaban una lengua electrónica para discriminar vinos distintos, formados por diferentes variedades de uva o vinos con diferente grado de madurez. Dentro de este grupo, destaca, entre otros muchos trabajos, la aplicación de la lengua electrónica para analizar cómo se ve influenciado el proceso de envejecimiento de un vino tinto por piezas de madera y la micro-oxigenación, y para ello estudiaron su composición fenólica [36].

Dentro del campo de las lenguas y narices electrónicas hay que destacar el importante papel que ha jugado la nanotecnología, una ciencia multidisciplinar con mucho auge y relevancia en los últimos años. Esta tecnología ha ayudado a desarrollar nuevos productos y materiales con propiedades mejoradas a los ya existentes, teniendo una gran importancia en el campo de la química y materiales avanzados.

La nanotecnología reduce el tamaño de los materiales a la escala nanométrica y ofrece dos importantes fenómenos: la *“elevada área superficial relativa”* que favorece la reactividad química en la superficie de las nanopartículas y se aprovecha en muchas aplicaciones tales como la catálisis, y el *“confinamiento cuántico de electrones y huecos del material”*, que hace que los nanomateriales obtengan propiedades ópticas, eléctricas, electrónicas, electromagnéticas y magnéticas diferentes a las que tenían cuando su tamaño es mayor [37].

Todas estas ventajas hacen que surjan nuevos materiales como son las nanopartículas metálicas o nanotubos de carbono con propiedades muy favorables para ser utilizados en los electrodos que forman la lengua electrónica.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Por otra parte, las enzimas se han podido aplicar con éxito en el reconocimiento molecular de analitos, convirtiéndose en los últimos años, junto con los nanomateriales, en uno de los principales objetivos de la Química Analítica moderna para determinar de forma selectiva aquellos analitos que se encuentran en una solución a bajos niveles de concentración y/o en presencia de sustancias interferentes.

Las enzimas funcionan como catalizadores biológicos acelerando, de manera específica, un gran número de reacciones químicas a temperatura ambiente y presión normal.

Así, y con el uso de enzimas aplicadas en sensores, surge el concepto de *biosensor* introducida por Clark y Lyons en 1962 y se caracteriza por la combinación espacial directa de una sustancia biológicamente activa, el llamado receptor, unida a una matriz, con un dispositivo electrónico para la transducción de la señal [33].

En los últimos años, se están aplicando biosensores electroquímicos para conformar lenguas bioelectrónicas. Estos nuevos dispositivos analíticos se presentan como una alternativa muy interesante para el análisis de fenoles y azúcares en alimentos gracias a su elevada especificidad, sensibilidad y selectividad.

Actualmente, hay varios grupos de investigación a nivel internacional, como es el grupo UVaSens, que están centrando sus esfuerzos en mejorar las propiedades del diseño de las lenguas electrónicas con diferentes materiales sensibles y biológicos para el análisis de alimentos.

2.2.2. Concepto y ventajas frente a los métodos tradicionales

Debido a la creciente demanda de una producción sostenible y de alta calidad en la industria alimentaria, se ha incrementado la importancia por el control y seguridad de los alimentos, promoviendo el desarrollo de sistemas analíticos más automatizados, sofisticados y precisos, que monitoricen la calidad de los productos [3].

En la industria agroalimentaria, es fundamental el control de la calidad y la medición de parámetros de interés en las bebidas alcohólicas en las diversas etapas de la producción, que permite tomar decisiones que afectan a la calidad final del producto.

Para ello, existen dispositivos comercialmente disponibles que permiten la medición cuantitativa de la mayoría de los parámetros relacionados con la calidad



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

de las bebidas alcohólicas, tales como, el grado alcohólico, el pH o el color. Sin embargo, estos dispositivos requieren instalaciones de laboratorio, no son portátiles y, a menudo, el coste del análisis es elevado. Por lo tanto, es interesante el desarrollo de sistemas multi-paramétricos que sean portátiles y de bajo coste, que requieran bajo consumo de energía y que puedan realizar mediciones in-situ.

El término de **lengua electrónica**, tal como la definen los grupos de investigación significativos que trabajan en este tema, puede resumirse como: “Un instrumento analítico que comprende una serie de sensores químicos no específicos y poco selectivos con especificidad parcial (sensibilidad cruzada, junto con una herramienta quimiométrica apropiada para el procesamiento de datos” y, según el informe de IUPAC, queda definida como: ”Un sistema multisensor, que consta de un número de sensores de baja selectividad y utiliza procedimientos matemáticos avanzados para el procesamiento de señales basadas en un patrón de reconocimiento y/o análisis de datos multivariados Redes neuronales artificiales (RNAs), Análisis de componentes principales (PCA), y así sucesivamente” [38].

Un ejemplo de esta nueva metodología son los sensores de estado sólido, que cumplen muchos de estos requisitos debido a su pequeño tamaño, respuesta rápida y bajo consumo de energía. Por lo cual, la combinación de estos sensores con herramientas quimiométricas para el procesamiento de señales proporciona sistemas analíticos multi-paramétricos o lengua electrónica, con múltiples aplicaciones y muy atractivas para el análisis de los alimentos [39].

2.2.3. Sentido del gusto

La lengua electrónica se diseñó para imitar, de forma aproximada, el sentido del gusto de los seres humanos.

El sentido del gusto comprende cinco sabores básicos: dulce, amargo, salado, ácido y unami (sabroso). Al degustar un alimento o una bebida, se percibe cada tipo de gusto en los órganos sensoriales llamados papilas gustativas [30].

Las papilas gustativas se encuentran cubriendo el principal órgano gustativo, la lengua (*Figura 10 a*). Se pueden clasificar en cuatro tipos:

1. Fungiformes
2. Circunvaladas: especializadas en el sabor amargo y ácido.
3. Foliadas: especializadas en el sabor agrio.
4. Filiformes



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Las papilas gustativas, responsables del sentido del gusto, están formadas por un racimo de células receptoras rodeadas de células de soporte (*Figura 10 b*) [40].

Se conocen los receptores (T2R), receptor del amargor, receptor del dulzor (T1R2+T1R3) y los receptores del umami (T1R1+T1R3). Cada receptor del sabor recibe múltiples sustancias químicas que constituyen un único sabor. Los receptores del sabor presentan alta selectividad, lo que significa la correspondencia de cada uno con una sustancia química particular [30].

Dichas células tienen un poro externo pequeño, a través del cual se proyectan finas prolongaciones de las células sensoriales ciliadas expuestas a la saliva que entra por los poros.

Por lo tanto, un alimento introducido en la boca y disuelto en saliva, interactúa con los receptores ciliares generando un impulso nervioso que es transmitido al cerebro por medio de los cuatro nervios craneales. La sensación del sabor se obtiene una vez que en el cerebro se hayan recibido las señales de todas las células sensoriales para cada una de las sustancias presentes, y éste las transforma en un sabor concreto mediante complejos sistemas de reconocimiento.

La frecuencia con que se repiten los impulsos indica la intensidad del sabor y es probable que un tipo de sabor quede registrado por un tipo de células que hayan respondido de una forma más específica al estímulo [40].

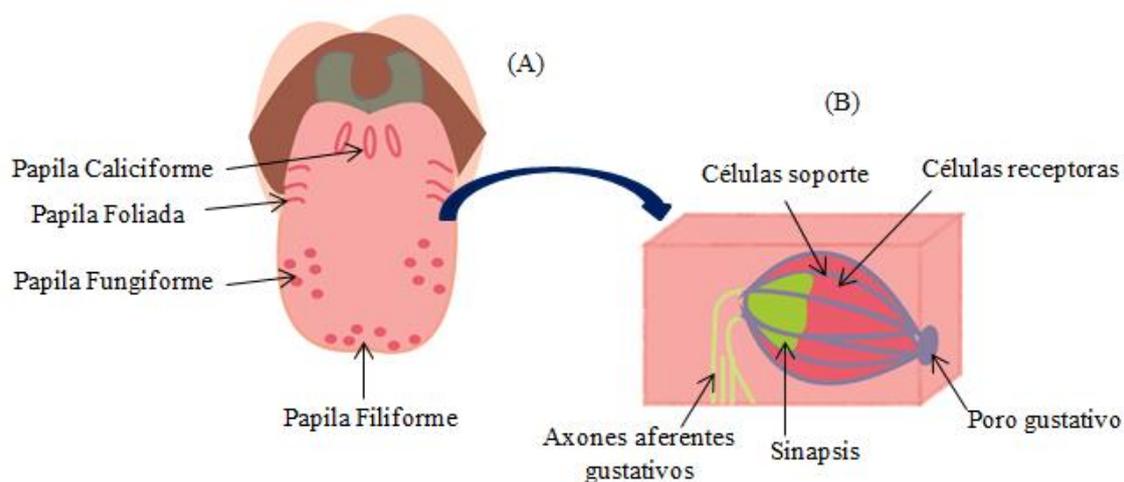


Figura 10-a) Papilas gustativas. b) Estructura células receptoras.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

2.2.4. Analogía entre lengua humana y lengua electrónica

En el caso de la lengua electrónica, en lugar de papilas gustativas se utilizan una serie de sensores inespecíficos que responden a diversos compuestos químicos en solución y que emulan las terminaciones nerviosas. Las señales obtenidas de estos sensores son procesadas por una herramienta quimiométrica de la misma forma que el cerebro trata los pulsos nerviosos (*Figura 11*).

Así mismo, el tratamiento cerebral de los cinco sabores básicos y las sinergias de los mismo, se asemejaría al tratamiento quimiométrico de la respuesta multidimensional, que se simplifica y clasifica mediante softwares estadísticos de análisis multivariante como, por ejemplo, el análisis de componentes principales (PCA, de sus siglas en inglés) [39], [41].

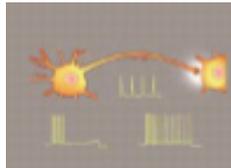
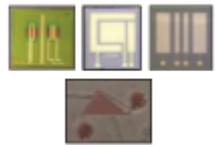
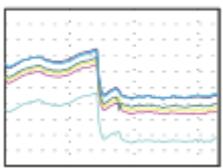
Elemento de reconocimiento	Obtención de datos	Tratamiento de datos	Resultados
 Lengua (papilas gustativas)	 Transmisión del pulso nervioso	 Cerebro	Sentido del gusto: Dulce Salado Amargo Ácido Umami
 Red de sensores	 Señales (eléctrica, óptica, etc.)	 Herramienta de procesamiento quimiométrico	Análisis cualitativo Análisis cuantitativo

Figura 11-Analogía entre el sentido del gusto "humano" y la lengua electrónica [39].



2.3. Sensores utilizados en lenguas electrónicas

Con respecto al tipo de sensores que se pueden utilizar en una lengua electrónica, suelen principalmente, electroquímicos (potenciométricos, voltamétricos y amperométricos), gravimétricos y ópticos [38]. Entre ellos, destacan los potenciométricos y voltamétricos más ampliamente utilizados en el análisis de alimentos y bebidas [42].

Inicialmente, la lengua electrónica basada en sensores potenciométricos predominó frente a otro tipo de sensores, sin embargo, la tecnología voltamétrica ha progresado por presentar una alta sensibilidad y versatilidad, ya que es posible modular el rango de potencial, la forma de la curva y el material del electrodo. Esta versatilidad permite obtener diferentes unidades sensibles con diferente selectividad, y es muy utilizada para el análisis de vinos.

2.3.2. Tipos de sensores

Un sensor, es un dispositivo capaz de transformar una información de un parámetro físico o químico en una señal analítica útil, la cual puede ser procesada facilitando información de una manera rápida.

Un sensor consta de dos elementos básicos de reconocimiento (*Figura 12*):

Un **receptor o elemento de reconocimiento**, es un elemento interno sensible que interactúa de manera selectiva con el analito generando una señal primaria, la cual es transportada hasta un dispositivo de medida, el transductor, donde se procesa la información capturada.

El analito es reconocido de forma selectiva por dicho receptor, y en base a esta selectividad se diferencian tres tipos de sensores [43], [44]:

1. **Físicos:** Dispositivos empleados para medir cantidades físicas, tales como fuerza, presión, temperatura, velocidad, etc. Es decir, no hay reacciones químicas involucradas en la detección.
2. **Químicos:** Dispositivos que responden a un analito particular de manera selectiva a través de una reacción química y que puede utilizarse para la determinación cualitativa o cuantitativa del analito. Proporciona información analítica como la concentración de una o más especies en la muestra.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

3. Biosensores: Son sensores químicos en que el sistema de reconocimiento se basa en mecanismos biológicos o bioquímicos. El analito que este tipo de sensores detecta puede ser puramente químico, aunque los componentes biológicos pueden ser el objetivo.

El **transductor**, está conectado al receptor y convierte la señal primaria en una señal secundaria fácilmente procesable. El término transductor se refiere tanto a un material con unas propiedades determinadas de transducción como a un dispositivo que facilita un tipo de transducción. Atendiendo a los tipos de transducción, se pueden clasificar en [43], [45]:

1. Ópticos: Transforman la señal óptica resultante de la interacción del analito con el receptor en una señal eléctrica.
2. Gravimétricos: La interacción entre el analito y el receptor produce una variación de masa sobre la superficie del receptor, la cual es convertida por el transductor en una señal eléctrica.
3. Magnéticos: Basados en el cambio de las propiedades magnéticas de los gases.
4. Resistivos: La interacción del analito con el receptor da lugar a un cambio en la conductividad que se transforma en señal eléctrica.
5. Térmicos: Transforman el cambio de temperatura que tiene lugar en la superficie del receptor, producido por la interacción entre el analito y el receptor, en una señal eléctrica.
6. Electroquímicos: transforman en señal eléctrica la señal electroquímica producida por la interacción analito-receptor.

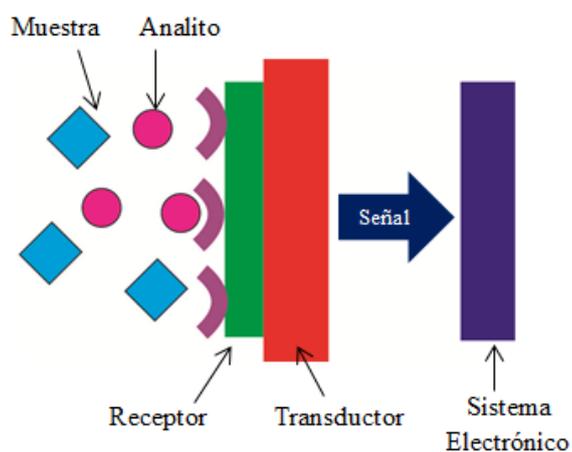


Figura 12-Componentes de un sensor.

Como ya se ha mencionado, los sensores más utilizados para conformar redes de sensores en el desarrollo de lenguas electrónicas, son los electroquímicos, gravimétricos y ópticos.

En este proyecto se ha trabajado con sensores químicos y transductores electroquímicos ya que, en los últimos años, se han aplicado ampliamente en diversos campos de investigación debido a sus numerosas ventajas frente a otro tipo de sensores, como pueden ser: su alta selectividad y sensibilidad, análisis rápido, simplicidad, fácil fabricación, un bajo coste y que son fácilmente miniaturizables [46], [47]. La opción de obtener sistemas miniaturizados de análisis permite prescindir de equipos mucho más voluminosos y costoso (técnica de cromatografía, espectroscopía IR, espectroscopía UV-Vis, etc.) [48].

Además, en los sensores electroquímicos, se puede modificar su superficie fácilmente con materiales sensibles, como nanopartículas metálicas, o con enzimas, para mejorar sus propiedades electroanalíticas y su especificidad.

2.3.3. Sensores electroquímicos

Es un tipo de sensor basado en transductores electroquímicos los cuales transforman los efectos que produce la interacción electroquímica entre el analito y el electrodo en una señal útil en forma de señal eléctrica. Los efectos de interacción pueden ser fruto de la interacción espontánea o estimulada eléctricamente mediante equipos [49].



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Debido a que existe una amplia variedad de sensores electroquímicos y se ha establecido una clasificación basada en su principio de operación: potenciométricos, amperométricos y voltamétricos.

Los **procesos electroquímicos** implican procesos de transferencia de electrones, es decir, estudian la pérdida de electrones (oxidación) o ganancia de electrones (reducción) que sufre un material durante la estimulación eléctrica. Estas reacciones de reducción y oxidación se conocen como reacciones redox, y pueden proporcionar información sobre la concentración, cinética y/o mecanismos de reacción, estado químico, entre otros comportamientos de una especie en solución.

En un experimento electroquímico, se puede medir uno o más de cuatro parámetros: potencial (E), corriente (i), carga (Q) y tiempo (t). La respuesta de un sistema depende de qué parámetro se utilice como señal de excitación.

Las reacciones electroquímicas tienen lugar en celdas electroquímicas, que, en la forma más simple, constan de dos conductores electrónicos distintos (electrodos) sumergidos en una solución electrolítica. No obstante, la forma más habitual es trabajar con una celda de tres electrodos, los cuales están conectados a un potencióstato que controla el potencial del electrodo de trabajo y mide la corriente resultante. Por lo que, la función principal de los electrodos es controlar y monitorear una reacción electroquímica [50].

Electrodo de trabajo (ET): es el electrodo donde tiene lugar la reacción analítica y sobre el cual se realiza la imposición de potencial o corriente.

Electrodo de referencia (ER): se emplea para medir el potencial del electrodo de trabajo. En consecuencia, su composición debe ser constante y conocida. El potencial del electrodo de referencia es fijo, por lo que cualquier cambio en la celda es atribuible al electrodo de trabajo. De esta manera, decimos que observamos o controlamos el potencial del electrodo de trabajo con respecto a la referencia.

Electrodo auxiliar (EA): Sirve para cerrar el circuito eléctrico de la celda. Sobre este electrodo acontece el proceso electroquímico contrario al que pasa sobre el ET [43].

Cada electrodo puede, en principio, intercambiar electrones con especies en disolución, ya sea espontáneamente o bajo el efecto de un voltaje aplicado.

Las celdas convencionales son la herramienta típica para el análisis electroquímico, las cuales están formadas por una celda electroquímica (recipiente de vidrio que contiene la disolución para analizar), fuente de corriente continua (externa), aparatos de medida (multivoltímetros, microamperímetros, etc) y los electrodos, que están en contacto con la disolución.

CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Hay celdas con dos electrodos (*Figura 13 a*), y pueden estar en la misma celda o en celdas diferentes. Si se encuentran en celdas diferentes, las disoluciones de cada celda han de estar en contacto, y para ello está el puente salino que es una pared porosa que permite que ambas disoluciones estén en contacto sin llegar a mezclarse y permitiendo el paso de cargas.

Pero lo más normal es el montaje con tres electrodos (*Figura 13 b*), para corregir la caída óhmica que se puede producir en el montaje de dos electrodos.

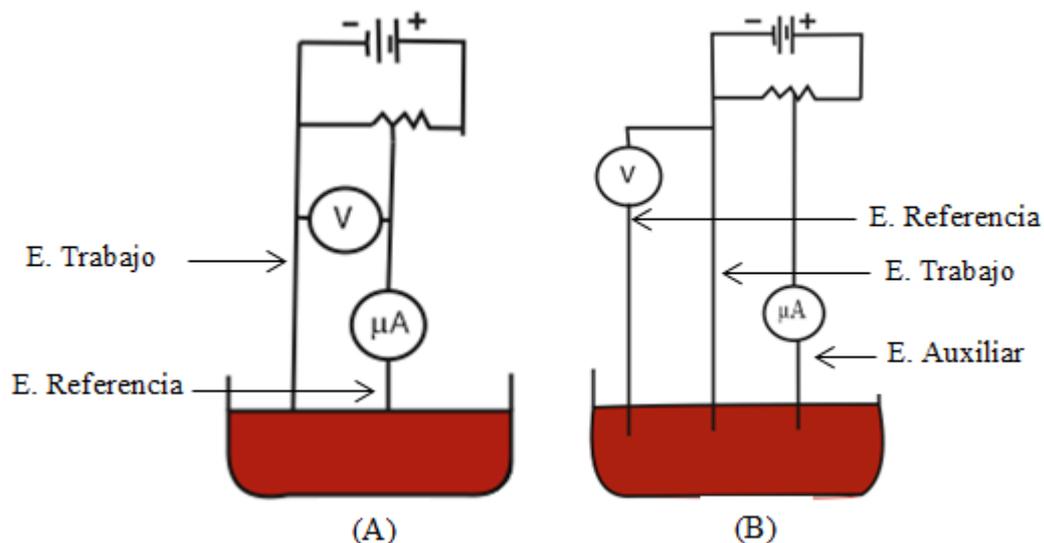


Figura 13-a) Celda de dos electrodos. **b)** Celda de tres electrodos.

El funcionamiento eléctrico de una celda electroquímica se basa en que a través de la celda pasa una corriente de intensidad (i), produciendo una diferencia de potencial (V) entre el electrodo de trabajo y el de referencia [51].

La detección electroquímica abarca una gran variedad de técnicas. Dentro de la detección basada en las reacciones faradaicas; es decir, aquellas en las que existe intercambio directo de electrones entre las moléculas en disolución y el electrodo, las más utilizadas son la voltamétrica, amperométrica y potenciométrica. Estas técnicas se basan principalmente en la medida de la corriente como una función del potencial del electrodo constante o cambiante. Durante este trabajo se ha utilizado la técnica de análisis voltamétrica, es por ello que se explicará con más detalle [46].

Por lo tanto, teniendo en cuenta la amplia variedad de sensores electroquímicos utilizables actualmente, se establece una clasificación basada según el principio de operación, lo que permite que se diferencien tres grandes grupos: Potenciométricos, Amperométricos y Voltamétricos.



2.3.3.1. Sensores Potenciométricos

La potenciometría es un método analítico electroquímico basado en la medida de la diferencia de potencial entre dos electrodos (el de referencia y el de trabajo) sumergidos en una disolución, siendo el potencial de uno de los electrodos función de la concentración de determinados iones presentes en la solución. Este potencial depende de la actividad iónica existente en el electrolito, donde se halla el sensor. Las condiciones de operación se establecen a “potenciometría a corriente nula”, es decir, sin circulación de corriente eléctrica a través del circuito de medida.

La medida de los potenciales de los electrodos permite obtener de forma directa la concentración de una sustancia o seguir su evolución a lo largo de una reacción química. Aparecen, pues, tres tipos de electrodos bien tipificados para estas determinaciones:

- Electrodos de medida para óxido-reducciones
- Electrodos de pH
- Electrodos específicos

La ley de Nernst relaciona la diferencia de potencial media entre los electrodos con la concentración del analito; para el caso de una solución ideal, el potencial de equilibrio E vendrá dado por la *Ecuación 10*:

$$E = E_0 + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln\left(\frac{C_1}{C_2}\right)$$

Ecuación 10- Potencial de equilibrio para el caso de una solución ideal.

Dónde:

E = potencial de equilibrio.

E_0 = potencial en condiciones estándar.

R = constante de los gases.

T = temperatura.

n = cantidad de mol de electrones que participan en la reacción.

F = constante de Faraday (aproximadamente 96.500 C/mol)



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

C_1 y C_2 = concentración de la especie que se oxida y se reduce, respectivamente.

Para el caso de una disolución no ideal (*Ecuación 11*) se sustituye C_i por a_i (actividad), de acuerdo con la expresión siguiente, siendo α el coeficiente de actividad:

$$a = \alpha \cdot C_i$$

$$E = E_0 + \left(\frac{RT}{nF}\right) \ln\left(\frac{a_1}{a_2}\right)$$

Ecuación 11-Potencial de equilibrio para el caso de una solución no ideal

2.3.3.2. Sensores Amperométricos

Los sensores amperométricos están basados en el principio de amperometría. La amperometría (y la voltametría, por ser un caso particular de amperometría) son técnicas analíticas basadas en la medida de intensidad de corriente que atraviesa una celda electroquímica en determinadas condiciones, siendo esta intensidad función de la concentración del material electroactivo y del potencial aplicado. En la mayoría de los casos se efectúa una oxidación o reducción de una especie en un electrodo, sirviendo el otro como referencia.

Si aplicamos al electrodo de trabajo un potencial variable E y registramos la curva de intensidad-potencial $i=f(E)$, la altura de i respecto al umbral límite de difusión es proporcional a la concentración de la sustancia oxidada o reducida en el electrodo [48].

2.3.3.3. Sensores Voltamétricos

Los sensores voltamétricos son un tipo particular de sensores dentro de los amperométricos. Éstos recaban información del analito a partir de los valores de intensidad de corriente obtenidos al aplicar un potencial variable con respecto al tiempo. Existen varios tipos de técnicas voltamperométricas en función de las señales de excitación aplicadas (barrido lineal, cíclico, de onda cuadrada, de pulsos, etc.).

Las técnicas voltamperométricas se pueden emplear para el estudio de la composición de una solución, mediante las relaciones corriente-potencial obtenidas en una celda electroquímica, y con una respuesta corriente-tiempo a potencial controlado de un electrodo. La señal de excitación aplicada sobre la



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

celda electroquímica es, por lo tanto, un potencial variable, y origina una respuesta en forma de corriente.

El resultado, a través de la intensidad de la corriente obtenida en función del potencial aplicado (curva de corriente-potencial), proporciona información acerca de la reacción que tiene lugar en el electrodo.

Los sensores voltamétricos pueden ser utilizados para detectar de forma eficiente diferentes compuestos en disoluciones, por ejemplo en bebidas, manteniendo la sensibilidad hacia otros compuestos, por lo tanto este tipo de sensores ha sido elegido porque ofrecen ventajas importantes para el análisis como su alta selectividad y sensibilidad, alta relación señal-ruido, bajo límite de detección y gran versatilidad [42].

En este trabajo se han utilizado sensores voltamétricos y la técnica de voltametría cíclica para el análisis de vinos. La voltametría cíclica proporciona una mayor versatilidad y las curvas obtenidas en el análisis, llamadas voltamogramas, aportan más información que el resto de técnicas.

Existen distintos tipos de técnicas voltamétricas, según la forma de aplicar el voltaje.

Voltametría de barrido lineal

Consiste en el aumento o disminución del potencial del electrodo de trabajo de forma lineal.

Los parámetros más importantes son el potencial de pico (E_p) y la intensidad de pico (I_p), que aportan información analítica y, permiten estudiar la reversibilidad del proceso y determinar las constantes de interés físico-químico.

La *Figura 14* muestra un barrido lineal de potenciales junto con su voltamperograma, en el cual se puede ver que al inicio la corriente es nula pero a medida que el voltaje alcanza valores más reactivos la intensidad de la corriente comienza a subir hasta que el pico de intensidad (I_p) alcanza un valor de voltaje (E_p), y una vez sobrepasado dicho valor la corriente comienza a disminuir. El valor I_p marca el potencial de reacción máximo, es decir, el valor para el cual la superficie del electrodo se ha oxidado o reducido completamente y el flujo de electrones cesa [50].



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

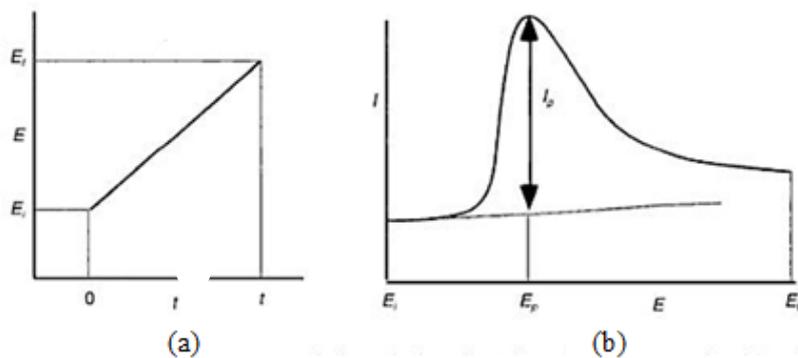


Figura 14- a) Barrido lineal de potenciales. b) Voltamperograma [50].

Voltimetría de barrido en escalón

La señal de excitación consiste en una serie de pulsos en forma de escalera, donde el potencial de base aumenta gradualmente en pequeños intervalos (ancho de pulso, ΔE_s , entre 10-100 mV) y la amplitud de pulso, ΔE_p , se mantiene constante con respecto al potencial de base. (Figura 15).

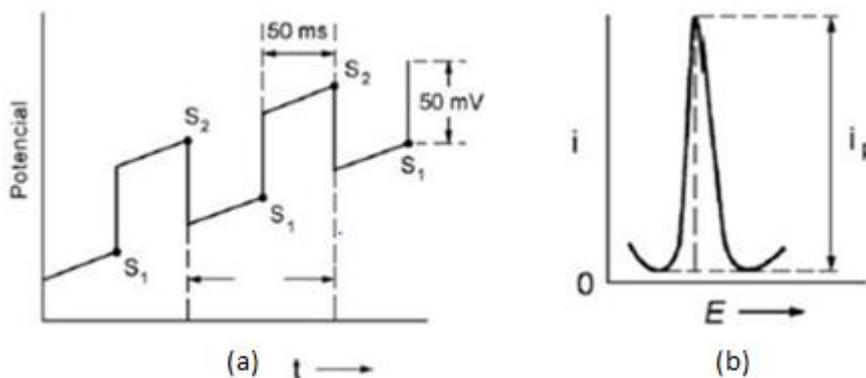


Figura 15-a) Barrido de potencial en escalón. b) Voltamperograma [50].

Voltimetría de salto potencial

Consiste en la aplicación de un potencial el cual se mantiene constante a lo largo del tiempo (Figura 16).



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

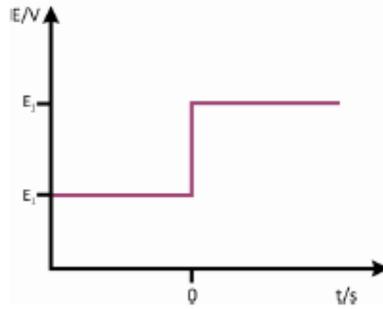


Figura 16-Variación del potencial aplicado en función del tiempo [50].

Voltametría cíclica

Es una de las técnicas que más se emplea para estudiar mecanismos de reacción, ya que aporta información rápida acerca del comportamiento redox de las especies de las reacciones químicas que participan y en determinación de parámetros termodinámicos.

La señal de excitación es de tipo triangular (*Figura 17*). El ciclo puede darse varias veces, y los potenciales en los que acontece el cambio de la dirección de barrido reciben el nombre de potenciales de inversión (E_λ).

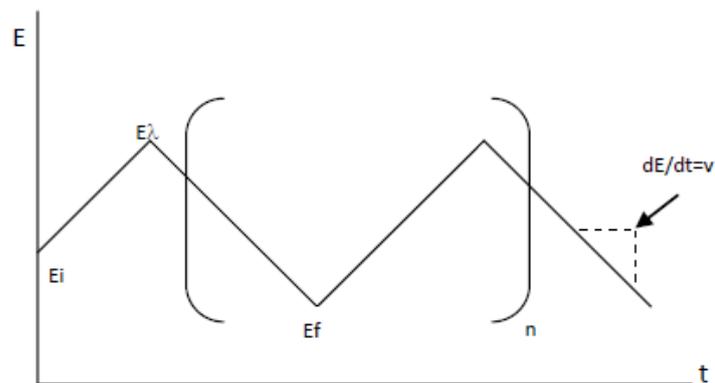


Figura 17-Barrido triangular como señal de perturbación [43].

La respuesta a esta señal de perturbación se llama voltamperograma cíclico (comúnmente, voltamograma) y se obtiene al graficar la corriente leída al potencial asociado, en una curva del tiempo $E=f(i)$. La *Figura 18* muestra un ejemplo de voltamograma donde se señalan las magnitudes físicas de este patrón de respuesta.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

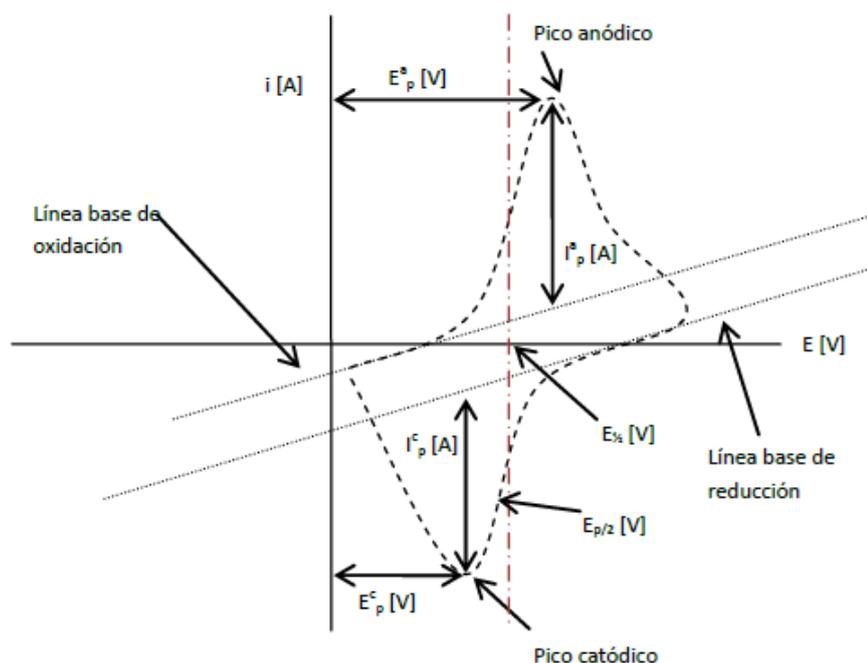


Figura 18-Curva intensidad-voltaje de un voltamograma cíclico, con sus magnitudes de acuerdo al convenio planteado por la IUPAC [43].

Dónde los parámetros del voltamograma cíclico, significan lo siguiente:

- E_p^c = potencial de pico catódico
- E_p^a = potencial de pico anódico
- i_p^c = intensidad de corriente de pico catódico
- i_p^a = intensidad de corriente de pico anódico

La especie que reacciona parte de un estado reducido y el potencial de partida es menor que el potencial de oxidación, con lo cual al principio no hay corriente anódica asociada a la conversión del estado reducido al oxidado. A medida que se incrementa el potencial, la intensidad de dicha corriente anódica sube hasta alcanzar un pico anódico, un máximo. Éste máximo se produce una vez que se ha oxidado la totalidad de la especie reactante sobre la superficie del electrodo. Una vez superado dicho potencial la corriente disminuye, ya que se ha consumido toda la especie que reacciona.

En el barrido inverso la especie o especies que se encuentran oxidadas son reducidas obteniendo picos catódicos, de reducción, simétricos a los obtenidos en el barrido de potenciales creciente pero con un desplazamiento de los potenciales respecto a los picos anódicos. Por lo tanto, esta técnica permite electrolizar una especie e invertir el potencial para comprobar la formación de su par redox, de



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

esta forma es posible dilucidar mecanismos de reacción. Al variar la velocidad de barrido se puede estudiar la cinética de las reacciones o bien, detectar la aparición de especies intermedias en procesos redox. Además, la intensidad de la corriente de los picos es proporcional a la cantidad de especie electroactiva presente en la disolución de la celda electroquímica, haciendo que la voltametría cíclica pueda ser empleada para realizar tanto análisis cualitativos como cuantitativos ya que, en función de la situación de los picos, podremos distinguir entre distintas especies electroactivas y, en función de la magnitud de los picos, se puede determinar si hay una mayor o menor cantidad de dicha especie.

La **ecuación de Randles–Sevcik** establece una proporcionalidad entre el perfil de la corriente obtenida del barrido del primer ciclo y la intensidad de corriente, concentración y velocidad de barrido (*Ecuación 12*).

$$i_p = (2,69 \cdot 10^5) \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2}$$

Ecuación 12-Ecuación de Randles-Sevcik (a 25°C) para especies reversibles.

Dónde:

- i_p = intensidad de corriente de pico.
- n = número de electrones transferidos.
- A = área superficial del electrodo [cm^2].
- D = coeficiente de difusión de la especie electroactiva [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$].
- C = concentración de la especie electroactiva [$\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$].
- v = velocidad de barrido [$\text{V} \cdot \text{s}^{-1}$].

Para un sistema **reversible** la gráfica de $i_p=(v^{1/2})$ presenta el perfil de una línea recta, cuya pendiente permite extraer información analítica importante, como el número de electrones intercambiados o el valor del coeficiente de difusión de la especie electroactiva. Cuanto más rápida es la velocidad de barrido, mayor es la intensidad de corriente de pico, mientras el sistema continúe siendo reversible; sin embargo, si la especie electroactiva se está adsorbiendo en las inmediaciones del electrodo, la intensidad de corriente de pico es directamente proporcional a la velocidad de barrido en lugar de su raíz cuadrada.

Para especies **irreversibles** la ecuación de Randles–Sevcik (*Ecuación 13*) se modifica debido a la corrección de términos cinéticos:

$$i_p = (2,99 \cdot 10^5) \cdot \alpha^{1/2} \cdot n \cdot A \cdot D^{1/2} \cdot C \cdot v^{1/2}$$

Ecuación 13-Ecuación de Randles-Sevcik (a 25°C) para especies irreversibles.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Un proceso redox es **reversible** si se mantiene en equilibrio al ser sometido a un barrido de potencial, es decir, los valores de la concentración en las superficies tanto de oxidación como de reducción cumplen la ecuación de Nerst.

Un criterio para identificar la reversibilidad de un sistema consiste en realizar el cociente de las señales de corriente anódica y catódica para diversas concentraciones o diversas velocidades de barrido. Debe cumplirse que $i_p^a/i_p^c = 1$ para una electro-reducción y $i_p^c/i_p^a = 1$ para una electro-oxidación.

El potencial de media onda ($E_{1/2}$) se aproxima al valor del potencial normal (E^0) para un sistema reversible, de acuerdo a la *Ecuación 14*:

$$E^0 \cong E_{1/2} = \frac{E_p^c + E_p^a}{2}$$

Ecuación 14-Potencial formal de reducción para un proceso reversible

La ecuación anterior se cumple, siempre que los coeficientes de difusión de ambas especies sean próximos.

Los sistemas reversibles que son lo suficientemente rápidos como para mantener las concentraciones de reactivo y producto en la superficie del electrodo muestran un comportamiento típico, pues el potencial donde se manifiestan los picos anódico y catódico presentan una diferencia constante (*Ecuación 15*):

$$\Delta E = |E_p^a - E_p^c| = 2,303 \cdot \frac{RT}{nF}$$

Ecuación 15-Diferencia de potencial entre los picos en un sistema reversible.

Los argumentos anteriores permiten calcular el término voltamperométrico $E_{p/2}$ (potencial de medio pico) para un sistema reversible (*Ecuación 16*), que indica una mejor estimación del punto medio entre los picos de un voltamograma (el valor de potencial correspondiente para $i_{p/2}$) [43].

$$E_{p/2} = E_{1/2} \pm 1,09 \cdot \frac{RT}{nF} = E_{1/2} \pm \frac{28,0mV}{n}$$

Ecuación 16-Potencial de medio pico para un sistema reversible (a 2°C).



2.3.4. Sensores serigrafiados

En los últimos años se han popularizando los electrodos serigrafiados como herramienta para el análisis electroquímico, en sustitución de las celdas convencionales (*Figura 19*).

Un **electrodo serigrafiado** consiste en es una pequeña tarjeta donde se encuentra un circuito eléctrico integrado que consiste en los electrodos en sí (trabajo, referencia y contra-electrodo), junto a contactos eléctricos para su conexión al sistema de medida. Los primeros trabajos con electrodos serigrafiados aparecieron en la década de los 90, por lo que es una tecnología relativamente moderna. En la actualidad se aplican para el análisis en ámbitos tan variados como el industrial, medioambiental, agroalimentario y/o farmacéutico.

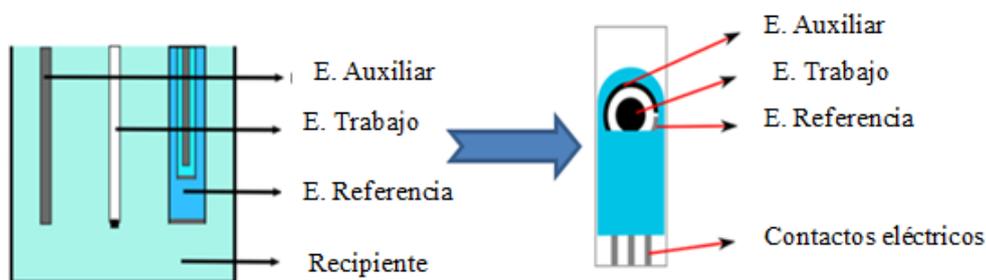


Figura 19-Celda convencional y Electrodo Serigrafiado.

Su proceso de fabricación es sencillo, consiste en la deposición de una tinta sobre un sustrato determinado utilizando una plantilla con la geometría deseada. Tras la etapa de sintetizado a una cierta temperatura, se recubre con un aislante para dejar libre solamente las conexiones y el área de trabajo del electrodo.

La variedad de las tintas para serigrafiar es enorme, existen de muchos materiales como grafito, oro, platino, plata, nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas de oro, etc. Los materiales más comunes para el sustrato sobre el que se deposita la tinta son materiales cerámicos y materiales plásticos.

Las principales ventajas de estos dispositivos como plataforma analítica frente a otras herramientas son las siguientes:

Bajo coste: El precio de estos dispositivos, al poder ser producidos en masa de forma automatizada, es relativamente bajo. Por esta razón, poseen un carácter desechable, son de usar y tirar.

Flexibilidad del diseño: El diseño del dispositivo serigrafiado puede ser personalizado, y por tanto, adaptarse a las necesidades del cliente. Por otro lado,



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

la gran variedad de materiales usados para su fabricación permiten su aplicación para resolver diferentes problemas analíticos.

Pequeño tamaño: Son dispositivos muy pequeños, portables y que pueden ser manejados fácilmente. Estas características junto a la sencilla instrumentación necesaria para emplearlos en análisis electroquímico permiten su utilización en análisis *in situ* (normalmente se pone en cursiva porque viene del latín o con un guión entre medias) en el lugar donde se necesite, sin tener que transportar las muestras al laboratorio. Otra ventaja relacionada con su tamaño, es que se utilizan bajos volúmenes de muestra, alrededor de 50 μL o menos, que se depositan sobre la tarjeta. También se pueden sumergir los electrodos en disolución y, aun así, los volúmenes utilizados siguen siendo muy pequeños (5 mL).

Posibilidad de modificaciones: la superficie de los electrodos serigrafiados puede ser fácilmente modificada con otros materiales sensibles para la mejora de sus propiedades o para la resolución de un problema analítico determinado.

Otra ventaja que ofrece el uso de estos sensores serigrafiados es que los potenciostatos que se utilizan son muy pequeños y ligeros, se pueden transportar y hacer medidas *in situ* y tienen un software incorporado de tratamiento de datos [52].

2.4. Tratamiento estadístico multivariante de datos

El tratamiento de datos multivariante es una herramienta estadística, muy utilizada durante los análisis de alimentos y bebidas. Tiene como objetivo principal aislar las características que distinguen los vinos hechos de diferente variedad de uva, vinos con diferente edad de maduración, vinos de diversas regiones o que se hacen por un proceso particular [6].

Cuando se analizan alimentos o bebidas, con una red de sensores (lengua electrónica) o mediante espectrometría infrarroja, se genera una gran cantidad de datos, ya que se obtienen diversas respuestas al ser un material de análisis con una composición compleja. Al disponer de numerosos datos se hace difícil su visualización y la correlación que hay entre ellos, por ello es necesario aplicar un análisis estadístico multivariante de datos como herramienta quimiométrica para la extracción de información.

Durante el tratamiento estadístico de los datos multivariantes se siguen una serie de etapas: reducción de dimensionalidad, procesamiento de datos y reconocimiento de patrones.



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

Reducción de dimensionalidad. La complejidad intrínseca, la riqueza y la selectividad cruzada de las señales generadas por las matrices de sensores voltamétricos son una ventaja porque el conjunto de datos contiene información significativa sobre la muestra. Al mismo tiempo, esta complejidad puede dar lugar a dificultades para procesar los datos. Una solución es simplificar la alta dimensionalidad y emplear una etapa de extracción de información útil. Algunos de los métodos utilizados para tal fin son los polinomios de Legendre, la transformada de Fourier o los Kernels.

Procesamiento de datos. Existen métodos no supervisados, que discriminan muestras entre sí y métodos supervisados, que permiten clasificar muestras.

Si el objeto es el análisis cualitativo se usan métodos no supervisados, siendo el más empleado el análisis de componentes principales (PCA, de sus siglas en inglés). Utilizando el método PCA, es posible discriminar entre muestras con características diferentes.

Pero si el propósito es cuantitativo, hay varias herramientas que dan información numérica como resultado final, destacando la regresión de componentes principales (PRC), regresión parcial de mínimos cuadrados (PLSR), máquina de vectores soporte (SVM) o redes neuronales artificiales (ANN), entre otras.

Reconocimiento de patrones. Es una tarea de clasificación que aborda el problema de la identificación de una muestra desconocida y de la asignación a un cierto conjunto de muestras previamente categorizadas. Los modelos de clasificación típicos utilizados en las lenguas electrónicas son el análisis de discriminación lineal (LDA) o las redes neuronales artificiales (ANN) [53].

En el presente trabajo se han utilizado los siguientes métodos estadísticos, los cuales se van a explicar a continuación más detenidamente.

- Análisis de componentes principales (PCA), para estudiar la capacidad de discriminación de los métodos de análisis empleados.
- Regresión parcial de mínimos cuadrados (PLSR), para establecer correlaciones entre los datos obtenidos mediante los diferentes análisis y el contenido polifenólico de los vinos.
- Máquina de vectores soporte (SVM), para predecir valores del contenido polifenólico de muestras de vino.



2.4.2. Análisis de componentes principales

El Análisis de componentes principales (PCA) es el método de referencia para la reducción de la dimensión y visualización de los datos de medición multivariable. Su objetivo principal es reducir el número de variables perdiendo la menor cantidad de información posible, siendo los nuevos componentes principales una combinación lineal de las variables originales e independientes entre sí.

Las nuevas variables se construyen según el orden de importancia en función a la varianza total que recoge de la muestra, por lo tanto, la PC1 que es la primera componente principal recoge la mayor parte de la varianza que hay en el conjunto de datos, siguiéndole la PC2 y PC3 con la siguiente mayor parte de la varianza, respectivamente.

Cuando se dé una correlación significativa, sucederá que el número de componentes principales útiles será menor que el número de variables originales, quedando reducido en gran medida la cantidad de datos a manejar [54].

2.4.3. Regresión parcial de mínimos cuadrados

El método estadístico de Regresión de mínimos cuadrados parciales (PLS-1) establece correlaciones entre los resultados obtenidos a partir de métodos como, la lengua electrónica, Raman o UV-vis, y los parámetros químicos obtenidos al utilizar los métodos químicos clásicos.

El objetivo de la regresión PLS-1 es establecer un modelo predictivo, considerando las respuestas obtenidas por el análisis instrumental correspondiente como el conjunto de variables X y el parámetro químico correspondiente como variable Y, de tal forma que, PLS-1 modela las variables X e Y simultáneamente para encontrar las variables latentes en X que mejor predicen las variables latentes en Y. La calibración ajusta el modelo a los datos disponibles, mientras que la validación comprueba el modelo para nuevos datos [42], [54].

2.4.4. Máquina de vectores soporte

La teoría de las Máquinas de Vectores de Soporte (SVM por su nombre en inglés, *Support Vector Machine*) fue desarrollada por Vapnik [55] basándose en la idea de minimización del riesgo estructural (SRM), y es una herramienta de modelado



CAPÍTULO 2: FUNDAMENTO TEÓRICO

de datos empíricos para construir un modelo de un sistema, del cual se espera deducir las respuestas que aún no se han observado o analizado.

El principio de Minimización del Riesgo Estructural (MRS, de sus siglas en inglés) es superior al principio de Minimización de Riesgo Empírico (ERM), empleado por las Redes Neuronales Artificiales (RNA) durante la fase de entrenamiento, ya que minimizan un límite superior al riesgo esperado a diferencia del ERM que minimiza el error sobre los datos de entrenamiento.

La formulación matemática de las Máquinas de Vectores Soporte varía dependiendo de la naturaleza de los datos; es decir, existe una formulación para los casos lineales y, por otro lado, una formulación para casos no lineales.

Las SVM han sido desarrolladas como una técnica robusta para clasificación y regresión aplicada a grandes conjuntos de datos complejos con ruido; es decir, con variables inherentes al modelo que para otras técnicas aumentan la posibilidad de error en los resultados pues resultan difíciles de cuantificar y observar. Además, emplea la función núcleo o kernel, atribuyéndole una gran capacidad de generalización, incluso cuando el conjunto de entrenamiento es pequeño [55].

Capítulo 3: Materiales y metodología experimental



3.1. Muestras de vino

En este trabajo de investigación se han seleccionado 8 vinos tintos con diferente grado de envejecimiento (Joven, Crianza, Roble, Reserva y Gran Reserva) y con diferente D.O. (Ribera, Rioja y Toro). Las muestras de vino fueron suministradas por la Estación Enológica de Castilla y León-Rueda y la Estación Enológica de la Rioja-Haro.

A continuación, en la *Tabla 2* se recogen los datos proporcionados por las Estaciones Enológicas:

Tabla 2-Datos disponibles de los vinos proporcionados por las Estaciones Enológicas.

Tipo	Elaboración	Denominación de Origen	Añada	Estación enológica
Tinto	Joven	Ribera	2016	Rueda
Tinto	Joven	Toro	2016	Rueda
Tinto	Roble	Toro	2015	Rueda
Tinto	Crianza	Toro	2014	Rueda
Tinto	Crianza	Ribera	2014	Rueda
Tinto	Reserva	Ribera	2014	Haro
Tinto	Reserva	Rioja	2011	Haro
Tinto	Gran Reserva	Ribera	2006	Rueda

3.2. Reactivos y material

- Matraces aforados de 10 y 100 mL.
- Pipetas de Pasteur.
- Cubetas de vidrio de 1 y 10 mL para espectrofotometría.
- Vasos de precipitados de 5, 10, 20 y 50 mL.
- Micro-pipetas de 200 μ L y 1000 μ L.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu 2M (respecto al ácido). Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Catecol (CAS 7447-40-7). Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- KCl (CAS 120-80-9). Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.3. Instrumentación

3.3.1. Equipo Dropsens: Sensores y potenciostato

La lengua electrónica utilizada en el análisis de los vinos está compuesta por electrodos serigrafados electroquímicos de **DropSens** (DropSens, S.L., Oviedo, Spain) (*Figura20*) [56]:

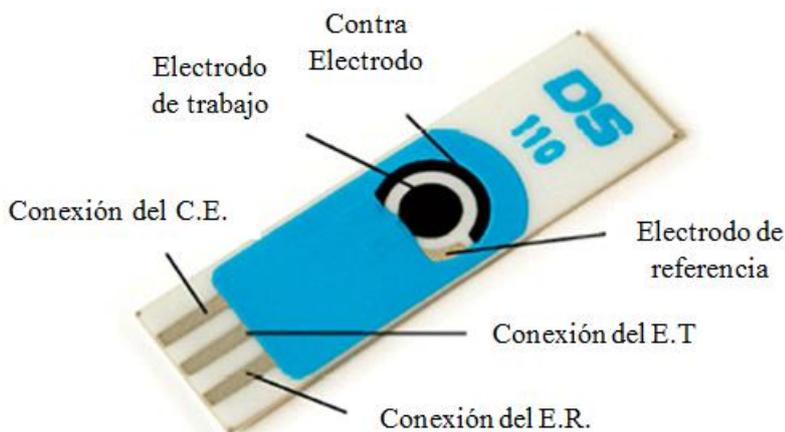


Figura 20-Electrodo serigrafado Dropsens.

Los sensores serigrafados DropSens se han utilizado en el análisis electroquímico en las áreas de medioambiente, clínica o agroalimentaria. Son sensores de bajo precio y desechables, diseñados para trabajar con microvolúmenes de muestra. Pueden trabajar inmersos en celdas electroquímicas de 5 ml o depositarse directamente sobre él una gota de la muestra

Estos electrodos consisten en un sustrato cerámico con unas dimensiones de 3.4 x 1.0 x 0.05 cm. El electrodo de referencia y los contactos eléctricos son, generalmente, de plata, el contra electrodo es de carbón y el electrodo de trabajo, con un diámetro de 4 mm, puede ser de diferentes materiales como grafito, oro, platino, plata, nanotubos de carbono, grafeno, nanopartículas de oro, etc. La versatilidad, en cuanto al material del electrodo de trabajo, permite elegir el sensor en función del análisis a realizar.

En este estudio, se han utilizado siete sensores DropSens con diferentes electrodos de trabajo con el fin de obtener una mayor variabilidad en los resultados del análisis. A continuación se nombran los electrodos serigrafados empleados y se describen sus propiedades:



CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

- **DRP-110:** El electrodo de trabajo y contra electrodo son de carbón, mientras que el electrodo de referencia y los contactos eléctricos son de plata.
- **DRP-110 CNT:** El electrodo de trabajo está hecho de nanotubos de carbono (de paredes múltiples), el contra electrodo es de carbón y el electrodo de referencia y los contactos eléctricos son de plata.
- **DRP-110 SWCNT:** El electrodo de trabajo está hecho de nanotubos de carbono (de pared simple), el contra electrodo es de carbón y el electrodo de referencia y los contactos eléctricos son de plata.
- **DRP-110 PANI:** El electrodo de trabajo está hecho de carbón/PANI (polianilina), el contra electrodo es de carbón y el electrodo de referencia y los contactos eléctricos son de plata.
- **DRP-GLU 10:** El electrodo de trabajo está hecho de ferrocianuro/carbón/glucosa oxidasa, el contra electrodo es de carbón y el electrodo de referencia y los contactos eléctricos son de plata.
- **DRP-110 Ni:** El electrodo de trabajo está hecho de óxido de níquel (II)/carbón, el contra electrodo es de carbón y el electrodo de referencia y los contactos eléctricos son de plata.
- **DRP-550:** El electrodo de trabajo y el contra electrodo están hechos de platino, mientras que el electrodo de referencia y los contactos eléctricos son de plata.

Para realizar los análisis electroquímicos se utiliza el biopotenciostato/galvanostato portátil **μSTAT 400** (DropSens, S.L., Oviedo, Spain) (*Figura 21a*). Los sensores se introducen a través de una ranura a un microprocesador/conector (*Figura 21b*) que está conectado al potenciostato. El potenciostato a la vez está directamente conectado al PC mediante un cable USB (también permite la opción de conexión por Bluetooth). Por lo tanto, el microprocesador/conector interconecta el potenciostato con el sensor DropSens, controla el potencial o la corriente aplicada al sensor y mide la respuesta o el potencial.

En general, el instrumento se utiliza con sensores electroquímicos o células electroquímicas con tres electrodos: electrodo de trabajo, electrodo de referencia y auxiliar o contra-electrodo. Pero además, puede utilizarse en modo bipotenciostático,

CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

con un sistema de dos electrodos de trabajo, un electrodo de referencia y un electrodo auxiliar.

Este equipo permite un fácil manejo, es portable, pequeño, de bajo coste y, además, permite aplicar diferentes técnicas electroquímicas voltamétricas: de barrido lineal, cíclica, de onda cuadrada, diferencias de pulso, etc., y, también, amperométricas: detección, de pulso, rápida, etc.

El software utilizado por el potenciostato para seleccionar las condiciones de medida es el llamado **DropView 2.0**.

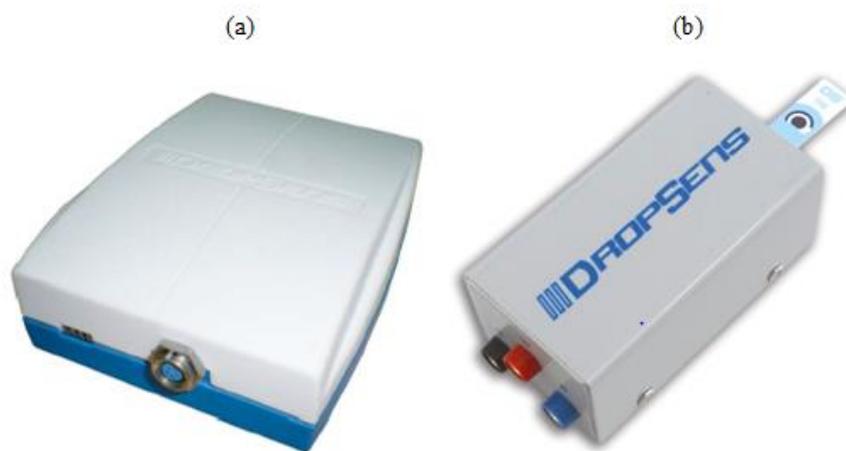


Figura 21-a) Bipotenciostato/ Galvanostato μ Stat 400. b) Conector para electrodos serigrafiados.

3.3.2. Equipo de Espectrometría UV-vis

Se ha empleado un espectrofotómetro UV-vis modelo UV-2600 (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) para medir la cantidad total de polifenoles mediante el índice de Folin-Ciocalteu e IPT280, así como para determinar el color de los diferentes vinos por los parámetros Glories y el espacio de CIELab (*Figura 22*).

Este equipo universal de grado de investigación se adapta fácilmente al objetivo de medición. Tiene una esfera de integración opcional que permite que el rango de longitud de onda convencional (200 nm-1000 nm) se pueda extender a 1400 nm, así como hacer medidas en reflexión y no sólo en transmisión. Los softwares empleados para la obtención de espectros y el tratamiento de datos que se han utilizado son el UVProbe y Color Analysis (en el caso de la obtención de las coordenadas de CIELab), ambos de Shimadzu ((Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan).



Figura 22-UV-VIS SPECTROPHOTOMETER UV-2600 empleado en el proyecto.

3.3.3. Equipo de Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier (FTIR)

Los espectros de infrarrojo por Transformada de Fourier realizados a los vinos se obtuvieron empleando un equipo de espectroscopía infrarroja modelo FT/IR 6600 mediante Reflectancia Total Atenuada ATR (Jasco Corporation, Tokyo, Japan)

Este equipo se caracteriza por su alto rendimiento, flexibilidad, tamaño compacto, bancada anti-vibraciones, detector de alta sensibilidad y excelente relación señal/ruido.

La espectroscopía de reflexión interna, más conocida como de reflexión total atenuada (RTA, o ATR en sus siglas en inglés) se basa en la reflexión que experimenta la radiación en la interfaz de separación de dos medios de distinta densidad óptica (distinto índice de refracción) cuando esta viene del medio más denso. Se producen dos fenómenos: la refracción y la reflexión, observándose más el fenómeno de reflexión cuanto mayor es el ángulo de incidencia. Cuando se supera el ángulo crítico de incidencia se produce la reflexión total de radiación.

En espectroscopía ATR la muestra está en contacto con un cristal de alto índice de refracción y buenas propiedades de transmisión de la radiación de IR, este cristal puede ser de diamante, seleniuro de zinc (ZnSe) o germanio; siendo el diamante el cristal del equipo empleado en el trabajo.

El estrecho contacto entre la muestra y el cristal hace que cuando la radiación IR atraviesa el cristal con un ángulo de incidencia igual o superior al crítico, la radiación experimentará reflexión total en la interfaz muestra-cristal. En la muestra se crea lo que se llama una “*onda evanescente*” que penetra en ella entre



CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2 y 15 μm . La intensidad de esta onda evanescente va decayendo a medida que se aleja de la interfaz.

La onda evanescente atraviesa la muestra y ésta absorbe radiación de las regiones del espectro IR. La cantidad de radiación de estas regiones que se refleja es menor que la incidente. Por eso se dice que la reflexión está *atenuada*. El **espectro ATR** de la muestra no es más que la representación gráfica del grado en que se absorbe la radiación en función de la longitud de onda.

Normalmente, los espectros ATR son similares a los convencionales excepto en las regiones de longitudes de onda más cortas porque, en general, estas radiaciones penetran menos en la muestra y, por tanto, se absorben menos. Por todo ello, en el espectro ATR se suelen observar bandas menos intensas respecto al IR convencional en las regiones de longitud de onda más corta (números de ondas altos).

Otras diferencias entre los espectros surgen del efecto de dispersión que origina una dependencia complicada del grado de penetración con la longitud de onda o de los efectos relacionados con la superficie de separación de la muestra y el cristal (por eso es necesario un buen contacto muestra-cristal) [57].

Además, posee óptica con espejos “corner cube mirrors”, que es un tipo de espejo que permite corregir automáticamente cualquier desviación de la trayectoria de la luz, proporcionando una estabilidad óptica en todo momento.

Este instrumento puede medir desde el IR cercano (15000 cm^{-1}) hasta IR lejano (50 cm^{-1}) y emplea el software de adquisición y tratamiento de espectros **Spectra Manager** (Jasco Corporation, Tokyo, Japan).

A continuación, se muestra en la *Figura 23* el espectrofotómetro infrarrojo con el accesorio ATR que se ha empleado en este trabajo.



Figura 23- Espectrofotómetro de Infrarrojo empleado.

3.4. Metodología experimental

3.4.1. Medidas electroquímicas de los vinos con la lengua electrónica

3.4.1.1. Preparación de las muestras de vino y procedimiento de medidas electroquímicas

Antes de medir las muestras de vino, ha de realizarse la medida del blanco en KCl 0,1 M en las mismas condiciones que posteriormente se medirán los vinos. Para ello, en un vaso de precipitados de 5 mL (que se ha utilizado como celda por, por mayor comodidad) se añade la suficiente cantidad de KCl para cubrir el sensor y se tomaban las medidas electroquímicas

Una vez medido el blanco para un cierto sensor, se procedía a la medida electroquímica del vino con ese mismo sensor, también en un vaso de 5 mL de capacidad. Las muestras de vino, una vez agitadas de forma vigorosa, se diluían en KCl (dilución 1:2), para aumentar la fuerza iónica de la disolución, y se homogeneizaban en ultrasonidos durante unos segundos. El sensor ha de sumergirse en la muestra de tal forma que el electrodo de trabajo quede bien cubierto (*Figura 24*).

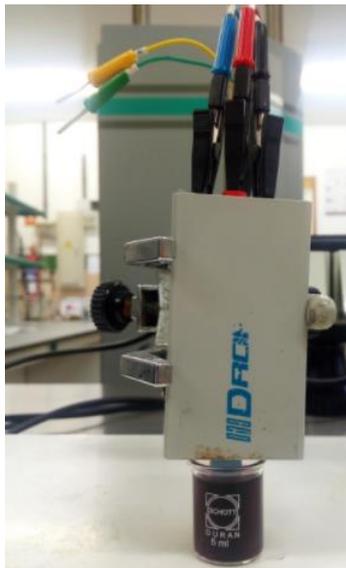


Figura 24-Electrodo Dropsens sumergido en la disolución 1:2 .

Las medidas electroquímicas se realizaron seleccionando las siguientes condiciones (*Figura 25*) en el software DropView 2.0:

- Técnica voltamétrica de medida: Voltametría Cíclica (CV).

Parámetros de Pretratamiento:

- T_{cond} : tiempo de acondicionamiento. **T_{cond} (s): 5**

Parámetros de medición

- E_{begin} : potencial de inicio de escaneo, aplicable a un rango de potencial entre -4 V a +4 V.
 E_{begin} (V): 0. El escaneo de las muestras comienza a 0 V.
- E_{vtx1} (CV): Potencial donde se invierte la dirección de escaneo.
 E_{vtx1} (V): 1
- E_{vtx2} (CV): Potencial donde la dirección de escaneo se vuelve a invertir de nuevo. **E_{vtx2} (V): -1**
- E_{step} : paso de potencial. Referido a cada cuántos voltios toma información. **E_{step} (V): 0,01.**
- S_{rate} : velocidad de barrido. **S_{rate} (V/s): 0,1.**
- N_{scans} : número de ciclos. **N_{scans} (CV): 10.**

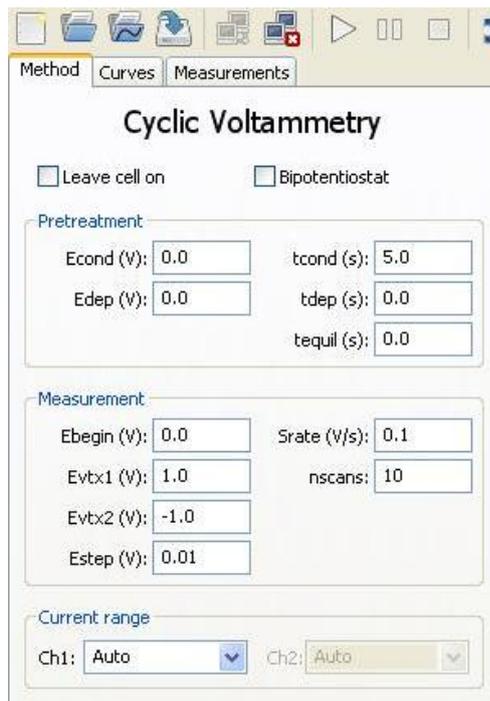


Figura 25- Parámetros de pre-tratamiento y parámetros de medida aplicados a la medición de las muestras.

3.4.1.2. Estudio de los límites de detección

La medida de los límites de detección es importante, para determinar la capacidad de detección de los sensores que se han utilizado.

Para ello, se preparó una disolución madre de 100 mL de catecol 10^{-3} M en KCl 0,1 M.

La primera medida que se realiza es la medida del blanco y, posteriormente, se van adicionando volúmenes conocidos de la disolución madre de catecol 10^{-3} M. En este trabajo, al estar utilizando una “celda” con un volumen tan pequeño (5 mL), que prácticamente no permite hacer adiciones, lo que se hizo fue: en un vaso de precipitados de 100 mL se añadían 50 mL de disolución de KCl 0,1 M y 200 μ L de catecol 10^{-3} M, llevando la mezcla a agitación al ultrasonidos para homogeneizar y realizando después la medida electroquímica de una muestra en la “celda” de 5 mL. Después, se repetía el procedimiento pero añadiendo otro volumen de catecol a la mezcla anterior. De este modo, las adiciones de catecol fueron de: 200, 1000, 2000, 3000, 4500 y 6500 μ L, sucesivamente.

En la *Tabla 3* siguiente se recogen las adiciones realizadas y la concentración equivalente final:



CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Tabla 3- Adiones realizadas de catecol en KCl y su equivalente concentración final para el cálculo de los límites de detección.

Volumen final adicionado de catecol (μL)	Concentración final (M)
200	4,00E-06
1000	2,00E-05
2000	4,00E-05
3000	6,00E-05
4500	9,00E-05
6500	1,30E-04

A medida que se hacen las adiciones, se observarán en los voltamogramas un pico de oxidación y reducción correspondientes al catecol y cuya intensidad máxima aumenta al aumentar la concentración. Terminado el procedimiento, se representa la concentración final frente a la intensidad máxima del pico (tanto para la oxidación como para la reducción) y se obtiene la pendiente de la relación lineal.

La ecuación matemática (*Ecuación 17*) que se ha utilizado para el cálculo del límite de detección es:

$$LD (\text{catecol}) = \frac{3 \cdot SD}{m}$$

Ecuación 17-Límite de detección.

Siendo *SD* la desviación típica del valor de la intensidad de corriente para los cuatro-cinco últimos ciclos del sensor en KCl (blanco) al potencial donde se observa en pico de oxidación/reducción y *m* el valor de la pendiente obtenida.

Para representar los voltamogramas superpuestos a diferentes concentraciones se ha utilizado el software OriginPro v8 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

3.4.2. Medidas de Espectrometría UV-vis

A continuación, se explican los diferentes métodos llevados a cabo utilizando el equipo de espectrometría UV-vis. Antes de la adquisición de los espectros de la muestra se ha realizado siempre una línea base al aire entre 200-1000 nm. Se han utilizado cubetas de cuarzo de 1 mm y 10 mm de paso óptico.



3.4.2.1. Determinación del Índice Folin-Ciocalteu

Se ha medido el índice Folin-Ciocalteu según el método Panreac Química S.A. y OIV.

El método Folin-Ciocalteu requirió de la preparación de las muestras de vino antes de ser medidas.

Para ello, en un matraz de 10 mL, se introdujeron, respetando el siguiente orden: 0,1 mL de la muestra de vino (diluida 1:5 en agua destilada), 5 mL de agua destilada, 0,5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu, 2 mL de solución de carbonato de sodio (20% w/w) y se llevó a enrase con agua destilada. Cada muestra se traspasó a un tubo de ensayo y se agitó la mezcla (*Figura 26*), finalmente se esperaron 30 minutos para que la reacción se estabilizara y se midió la absorbancia en torno a 750 nm. Se utilizaron cubetas rectangulares de cuarzo de 10 mm para las mediciones.

Para preparar el blanco, se llevó a cabo el mismo procedimiento pero sustituyendo la muestra de vino por 0,1 mL de agua destilada.



Figura 26-Muestras de vino y del blanco preparadas para ser analizadas por el método Folin-Ciocalteu.

Una vez obtenidos los valores de absorbancia en el máximo (en torno a 750 nm), se determinó el índice Folin-Ciocalteu a partir de la siguiente ecuación matemática (*Ecuación 18*):

$$IFC = A_{750} \cdot 100$$

Ecuación 18-Ecuación del índice Folin-Ciocalteu.



3.4.2.2. Determinación del Índice IPT 280

Se ha medido el índice IPT280 según el método Panreac Química S.A.

Para la obtención del índice total de polifenoles siguiendo el método IPT280, se requirió primero de la preparación de las muestras de vino que serían analizadas.

Las diferentes muestras de vino se diluyeron con agua destilada 1:100. Para ello, 0,1 mL de la muestra de vino se llevó a enrase con agua destilada en un matraz de 10 mL (*Figura 27*). Una vez hecho el enrase, se agitó y se realizó la lectura directa de la absorbancia a 280 nm, utilizando como blanco agua destilada. Al igual que para el índice Folin, se utilizaron cubetas rectangulares de cuarzo de 10 mm para las mediciones.



Figura 27-Muestras de los diferentes vinos preparadas para el método IPT 280.

Los valores de absorbancia obtenidos se multiplicaron por 100 para el IPT280 de cada muestra (*Ecuación 19*):

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

Ecuación 19-Ecuación del índice IPT280.



3.4.2.3. Determinación de los parámetros CIELab

En este método no se necesitó hacer ninguna dilución previa de las muestras de vino y se utilizaron cubetas de cuarzo de 1 mm.

Los parámetros de CIELab se determinaron a partir del espectro de transmitancia tomado desde 380 nm a 770 nm. De este modo, se obtuvieron las coordenadas CIELab (L^* , a^* , b^* , X, Y, Z). Estas coordenadas se utilizaron para medir el croma (C^*) y la tonalidad (H^*), siguiendo las recomendaciones de la Comisión Internacional de L'Eclairage para las condiciones estándar de iluminante CIE D65 y 10° .

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$H^* = \operatorname{tg}^{-1} \left(\frac{b^*}{a^*} \right)$$

3.4.2.4. Determinación de los parámetros Glories

Para el cálculo de los parámetros Glories tampoco se requirió de una dilución de las muestras de vino y también se emplearon cubetas de cuarzo de 1 mm.

Para cada muestra de vino se aplicó el espectro de absorbancia de 200 nm a 1000 nm y se tomaron los valores de absorbancia a 420, 520 y 620 nm. A partir de estos valores se calcularon los parámetros Glories de forma directa siguiendo las ecuaciones (Ecuación 3-9) mencionadas en el Capítulo 1:

$$(CD) \text{ Densidad de color} = (A420 + A520)$$

$$(CI) \text{ Intensidad de color} = (A420 + A520 + A620)$$

$$(T) \text{ Tinte} = \left(\frac{A420}{A520} \right)$$

(dA%) Proporción de color rojo producido por cationes de flavilo

$$= \left(\frac{A520 - \frac{A420 - A620}{2}}{A520} \cdot 100 \right)$$

$$(Y\%) \text{ Proporción de color amarillo} = \left(\frac{A420}{CI} \cdot 100 \right)$$



$$(R\%) \text{ Proporción de color rojo} = \left(\frac{A_{520}}{CI} \cdot 100 \right)$$

$$(B\%) \text{ Proporción de color azul} = \left(\frac{A_{620}}{CI} \cdot 100 \right)$$

3.4.3. Medidas de Espectroscopía Infrarroja de Transformada de Fourier

Los espectros infrarrojos de Transformada de Fourier de los vinos se tomaron utilizando un módulo ATR depositando directamente una gota de vino sobre él. Se realizaron 300 escaneos a una resolución de 8 cm^{-1} , adquiridas entre 4000 y 400 cm^{-1} , con una velocidad del escáner de $7,5 \text{ kHz}$ y un background de 100 escaneos (registrados al aire y cada 4 muestras de vino).

3.4.4. Tratamiento estadístico multivariante de datos

Para la representación de los datos obtenidos mediante la lengua electrónica, la espectrofotometría UV-vis y la espectroscopía FTIR se ha utilizado el programa Origin Pro 8. Para el tratamiento de datos se utilizó el software **OriginPro v8**.

Los análisis estadísticos de PCA, PLS-1 y SVM se llevaron a cabo utilizando el software **The Unscrambler v10.4** (CAMO Software, Oslo, Norway). Además, los voltamogramas y los espectros de FTIR se normalizaron y se pre-procesaron para reducir el número de variables mediante una técnica de reducción de datos basada en la función *Kernel* utilizando el software **Matlab v2014b** (The Mathworks Inc., Natick, MA, USA). Mediante esta reducción de variables se obtuvieron 10 variables para cada sensor (70 variables en total) y 30 variables para cada espectro FTIR. Las variables de CIELab que se utilizaron en los análisis fueron 5 (a^* , b^* , L^* , C^* y H^*) y, en el caso de los parámetros Glories, se utilizaron 7 variables (CD, CI, T, dA, %R, %Y, %B). En el caso de estas dos últimas metodologías, no fue necesario realizar una reducción de las variables como en el caso de la lengua electrónica y los espectros FTIR.

El análisis PCA se utilizó para discriminar entre las muestras de vino a partir de los datos voltamétricos, los espectros FTIR, los datos de CIELab y los parámetros de Glories. Mientras que el análisis PLS-1 sirvió para establecer correlaciones entre los métodos de análisis anteriores y los parámetros químicos obtenidos de la medición de los polifenoles (índice Folin e IPT280). Por último, el análisis SVM se utilizó para predecir valores de índices de Folin e IPT de muestras de vino a



CAPÍTULO 3: MATERIALES Y METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

partir de la creación de modelos de predicción obtenidos con los datos de la lengua electrónica.

Capítulo 4: Resultados experimentales



4.1. Determinación del contenido polifenólico en los vinos: Índice IPT 280 y Folin Ciocalteu

Según lo estudiado en el *Capítulo 1* dentro de los compuestos fenólicos hay una gran variedad de componentes químicos como: Ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, antocianinos, lignanos, etc. Éstos que proceden inicialmente de las uvas, participan en diferentes reacciones a lo largo del envejecimiento del vino, y aunque son lentas originan consecuencias importantes en él.

Se producen reacciones de condensación y poli-condensación entre los compuestos fenólicos (leucoantocianidinas, antocianinos, taninos y otras sustancias del grupo flavonas) haciendo que a lo largo del proceso de envejecimiento del vino, la concentración de antocianos libres disminuya hasta incluso desaparecer, sin que el color del vino desaparezca en la misma proporción.

Estas reacciones son las responsables del cambio en la tonalidad del vino y por consiguiente del contenido total de polifenoles, el cual, al igual que la tonalidad, disminuye con su envejecimiento.

Para determinar el índice total de polifenoles en las muestras de vino y cómo varía en función de su edad, se han obtenido los índices IPT280 y Folin-Ciocalteu siguiendo el procedimiento experimental desarrollado en el *Capítulo 2* y quedando recogidos sus resultados en las *Figuras (28-30)* y en la *Tabla 4*.

Tabla 4-Resultados de los Índices Folin-Ciocalteu e IPT280.

Vinos	Absorbancia 750 nm	Índice Folin	Absorbancia 280 nm	Índice IPT
Jv Toro	0,811	81,1	0,818	81,8
Jv Ribera	0,734	73,4	0,666	66,6
Rb Toro	0,652	65,2	0,581	58,1
Cr Toro	0,700	70,0	0,639	63,9
Cr Ribera	0,694	69,4	0,642	64,2
Rv Rioja	0,641	64,1	9,591	59,1
Rv Ribera	0,570	57,0	0,572	57,2
GRv Ribera	0,611	61,1	0,558	55,8



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

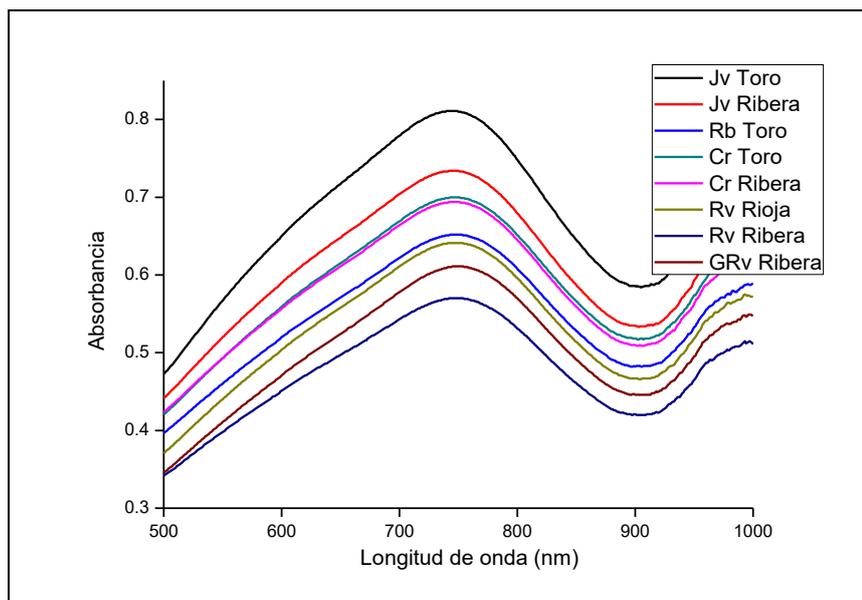


Figura 28- Espectro de absorbancia del índice Folin-Ciocalteu.

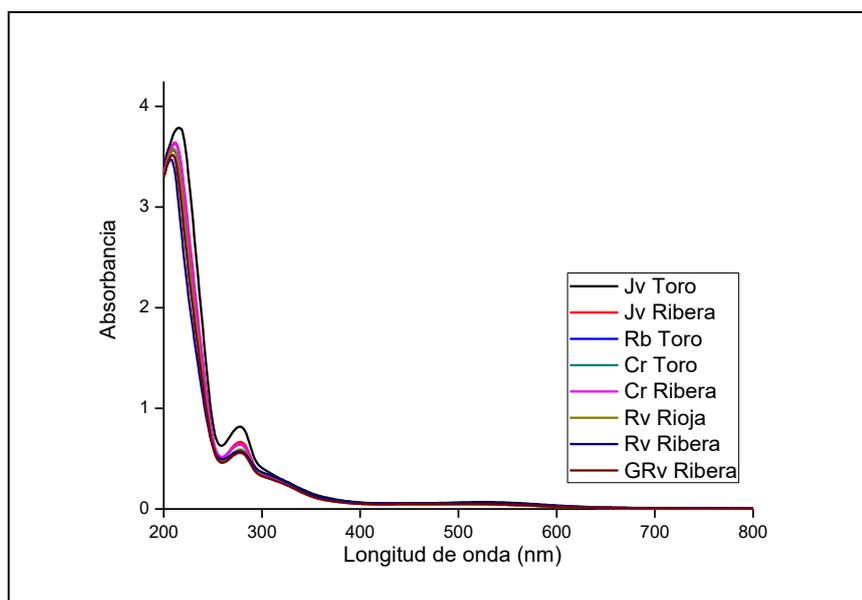


Figura 29- Espectro de absorbancia del índice IPT.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

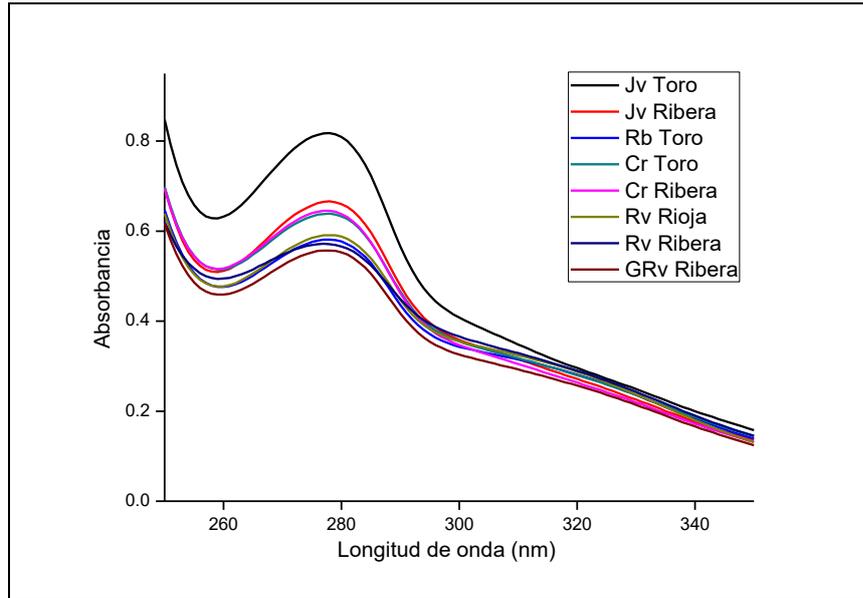


Figura 30-Espectro de absorción comprendido en un rango desde 250-350 nm con el que se obtiene el índice IPT.

Como era de esperar el contenido polifenólico medido por ambos métodos es mayor para aquellos vinos más jóvenes, disminuyendo a medida que evoluciona su crianza.

El contenido polifenólico siguiendo el método Folin-Ciocalteu decrece progresivamente con el envejecimiento. Se puede observar que el Reserva (Ribera) da un valor de 57,0 frente al Gran Reserva con un valor de 61,1, el primero interrumpe la exactitud del decrecimiento, pero teniendo en cuenta que son vinos diferentes, es decir, el periodo de envejecimiento no pertenece al mismo vino, puede ser ésta la causa de que este valor se interponga.

Lo mismo sucede con los valores de 65,2 y 58,1 medidos por el método Folin-Ciocalteu e IPT280, respectivamente, y pertenecientes al vino Roble (Toro), pero este no es de mayor importancia, ya que la categoría Roble clasifica al vino en un semi-Crianza o Crianza, y según las condiciones de cada bodega en la crianza de un vino hace que este pueda estar más o menos evolucionado en su envejecimiento.

A excepción de este valor, 58,1 para la muestra de Roble (Toro), el método IPT280 cumple de forma exacta la progresión decreciente del índice de polifenoles totales a medida que el vino envejece.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

4.2. Determinación de los parámetros del color en los vinos: Glories y CIELab

Como se veía con anterioridad en el *Capítulo 1*; en los vinos a lo largo de su envejecimiento se producen reacciones de polimerización y co-pigmentación de antocianinas con taninos, entre otros compuestos fenólicos, llegando a producir otros pigmentos más estables que hacen que el color del vino pase de rojo “intenso” a rojo “ladrillo”.

Por lo tanto, determinar el color es importante para analizar el estado de crianza de un vino y para ello se han empleado los parámetros del color: Glories y CIELab.

En la *Tabla 5* se puede ver las absorbancias 420,520 y 620 nm a las cuales se calcularon los parámetros Glories (*Tabla 6*) calculados según las ecuaciones matemáticas expuestas en el *Capítulo 2*.

Mediante la aplicación de este método, se determina principalmente el porcentaje con el que cada categoría de pigmento (amarillo, rojo y azul) contribuye al color total del vino.

Tabla 5-Valores de las absorbancias obtenidas.

Vinos	Absorbancia 420 (nm)	Absorbancia 520 (nm)	Absorbancia 620 (nm)
Jv Toro	0,577	1,061	0,230
Jv Ribera	0,490	0,770	0,206
Rb Toro	0,465	0,524	0,138
Cr Toro	0,442	0,583	0,143
Cr Ribera	0,480	0,612	0,175
Rv Rioja	0,436	0,503	0,129
Rv Ribera	0,557	0,736	0,198
GRv Ribera	0,422	0,521	0,132

Tabla 6-Parámetros Glories.

Vinos	CD	CI	T	Da(%)	R(%)	Y(%)	B(%)
Jv Toro	1,638	1,868	0,544	83,65	56,80	30,89	12,31
Jv Ribera	1,260	1,466	0,636	81,56	52,52	33,42	14,06
Rb Toro	0,989	1,127	0,887	68,80	46,50	41,26	12,24
Cr Toro	1,025	1,168	0,758	74,36	49,91	37,84	12,24
Cr Ribera	1,092	1,267	0,784	75,08	48,30	37,88	13,81
Rv Rioja	0,989	1,068	0,867	69,48	47,10	40,82	12,08
Rv Ribera	1,293	1,481	0,757	75,61	49,36	37,36	13,28
GRv Ribera	0,943	1,075	0,810	72,17	48,47	39,26	12,28



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se puede observar que el porcentaje de pigmento rojo (%R) es mayor para aquellos vinos con menor tiempo de crianza y va disminuyendo a medida que el vino envejece, de forma opuesta al porcentaje de pigmento amarillo (%Y), el cual, aumenta a medida que la edad del vino crece.

Sin embargo, la clase de pigmentos azules participa en el color total del vino en la medida de 12-14%, un rango muy pequeño, por lo que no se puede apreciar mucha variación del pigmento azul de un vino a otro, pero si se puede observar que alguno de los valores más elevados pertenecen a los vinos más jóvenes, intensificando de esta manera junto con el pigmento azul el color de los vinos de menor crianza.

Como regla general, para los vinos tintos envejecidos, la absorbancia a 520 nm disminuye mientras que la absorbancia a 420 nm aumenta, debido al cambio de antocianinas monoméricas a poliméricas [58]. En este caso, los valores de absorbancia a 420 nm son del mismo orden, por lo que su variación no es significativa. Pero aun así, la absorbancia a 420 nm interviene en el cálculo matemático del pigmento amarillo, el cual, como se ha visto, sí se aprecia que aumenta a medida que el vino envejece. Por otro lado, los valores de absorbancia a 520 nm sí que varían significativamente, siendo éstos mayores para aquellos vinos de menor crianza.

En definitiva, y de forma general, se ha podido apreciar que a medida que el vino envejece su contenido en pigmentos amarillos aumenta y disminuye su contenido en pigmentos rojos, además de que la absorbancia a 520 disminuya.

Se ha de aplicar aquí el término “de forma general”, puesto que hay algún vino que rompe el esquema esperado. Estos valores, que hacen que no se cumpla exactamente la disminución o el aumento de los parámetros nombrados o absorbancias, se debe a que no se ha seguido la evolución de envejecimiento de un mismo vino, sino que se han tomado muestras de diferentes vinos; cada uno proviene de una clase de uva, de un tratamiento de envejecimiento diferente, pertenecen a diferentes bodegas, etc.

Otro método recomendado por la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV) para caracterizar el vino a partir de su color son los parámetros CIELab; a* (rojo/verde), b* (amarillo/azul), L* (luminosidad), C* (intensidad de color) y H* (tonalidad).

Éstos parámetros obtenidos según el procedimiento seguido en el *Capítulo 2*, se muestran en la *Tabla 7* y son los se van a analizar a continuación para ver como evoluciona el vino según este método.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 7-Parámetros de color obtenidos por el método CIELab.

Vinos	a*	B*	L*	C*	H*
Jv Toro	51,07	0,85	56,63	51,08	0,95
Jv Ribera	39,74	1,13	61,48	39,76	1,63
Rb Toro	25,91	12,79	71,89	28,89	26,27
Cr Toro	31,27	6,47	68,50	32,91	11,34
Cr Ribera	31,18	7,42	67,16	32,05	13,39
Rv Rioja	26,68	10,96	72,51	28,84	22,33
Rv Ribera	36,35	8,16	63,01	37,25	12,65
GRv Ribera	28,17	9,00	71,95	29,57	17,72

Al igual que en el caso de los parámetros Glories, se parte de la evidencia de que el color rojo del vino va adquiriendo tonalidades más anaranjadas o “rojo ladrillo” a medida que éste envejece y, por tanto, se analizan los parámetros CIELab.

Por lo tanto, se observa que el parámetro a*, responsable de la pigmentación roja disminuye, al igual que sucedía con el parámetro Glories %R, a medida que el vino envejece. Se aprecia que los valores más elevados pertenecen a los vinos jóvenes, mientras que el valor más pequeño al Gran Reserva, a excepción del valor del parámetro a* del Roble.

El parámetro b* consecuente de la pigmentación amarilla, sigue el mismo patrón que el parámetros %Y en el método Glories, aumentando el valor de b* a medida que progresa el envejecimiento del vino. En este caso, se puede ver la gran diferencia de orden del parámetro entre los vinos Jóvenes y el Gran Reserva, tomando los valores de 0,85 y 1,13 frente a los valores mucho más elevados de los Reserva y Gran Reserva.

También se cumple que el parámetro de intensidad de color (C*) disminuye a medida que el vino toma mayor edad ya que, como se ha dicho, su coloración se atenúa.

Al igual que sucedía en los parámetros Glories, tanto la disminución de a* y C* como el aumento del parámetro b* a medida que el vino envejece, no se cumple en su totalidad, sino que hay algún valor que rompe esta regla. Los motivos siguen siendo los mismos; el no haber hecho un seguimiento pleno del mismo vino y haber tomado diferentes vinos para el estudio de su caracterización según la edad.

En conclusión, y como era de esperar según lo expuesto en el *Capítulo 1*, los cambios producidos en el vino han sido un incremento de la tonalidad amarilla y una disminución de la tonalidad roja y azul.

La disminución del color se atribuye a una disminución en el efecto de co-pigmentación, debido a un descenso de flavonoles, el cual influye en la tonalidad



azul mientras que la disminución de los antocianos es la que afecta a la tonalidad roja.

4.3. Análisis de los vinos mediante espectroscopía FTIR

Los vinos, como se sabe, tienen una composición muy compleja de polifenoles, ácidos, proteínas, polisacáridos, azúcares y compuestos no volátiles (alcoholes, ésteres, éteres, cetonas, terpenos y fenoles). Además, en especial los vinos tintos, son ricos en antocianinos siendo la más abundante la maldivina-3-O-glucosídica. Pero también hay otros compuestos fenólicos que destacan como son el ácido gálico y la (+)-catequina pertenecientes al grupo de los taninos.

La espectroscopía infrarroja se basa principalmente en la absorción de esta radiación ($4000-400\text{ cm}^{-1}$) por las moléculas. En una molécula, todos los átomos vibran alrededor de la distancia interatómica media, habiendo dos modos principales de vibración: alargamiento y flexión. De tal forma, que la absorción de la energía de la luz infrarroja excita a las moléculas hasta un estado excitado, produciéndose la vibración de un modo determinado.

La espectroscopía de infrarrojo es, principalmente, un análisis de tipo cualitativo y su función principal es la identificación de los grupos funcionales de una molécula para los que se observan bandas características en determinadas regiones del espectro.

Por lo tanto, como el vino es una mezcla muy compleja lo que se pretende con este método es identificar los grupos más representativos del vino.

La *Figura 31* muestra el espectro de FTIR obtenido para un barrido entre 4000 y 400 cm^{-1} .



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

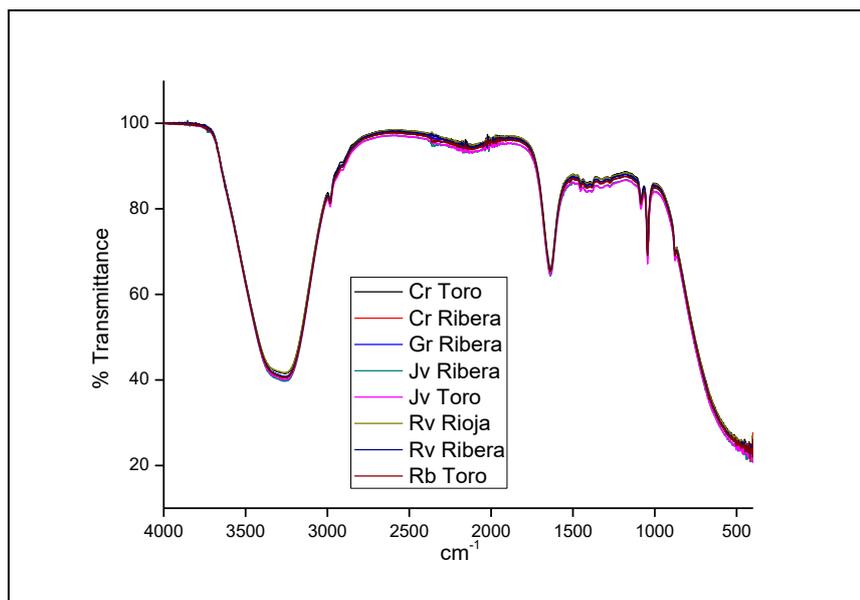


Figura 31-Espectro FTIR entre 4000-400 cm^{-1} .

En la *Figura 31* se puede apreciar una banda ancha correspondiente a la absorción del agua y del etanol en el rango comprendido entre 3500-3000 cm^{-1} debido a la presencia de los grupos con enlace-hidrógeno, concretamente, es este caso, el O-H que se encuentra a 3200 cm^{-1} . El pico correspondiente al número de onda entre 2000-1500 cm^{-1} también corresponde a la absorción del agua. Además, también aparece una banda moderada, entre 2500-2000 cm^{-1} que pertenece a aquellos compuestos que contengan un grupo C=C.

En la zona con longitudes de onda comprendidas entre 2000-400 cm^{-1} , la asignación de bandas de absorción a determinadas vibraciones moleculares es muy difícil de realizar. Esta zona del espectro es la denominada huella dactilar, característica de cada compuesto, en la que pequeñas diferencias en la estructura de la molécula dan lugar a variaciones muy importantes en los máximos de absorción. La *Figura 32* muestra la zona de la “huella dactilar” que en nuestro caso comprende la zona del espectro desde 1500-1000 cm^{-1} .



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

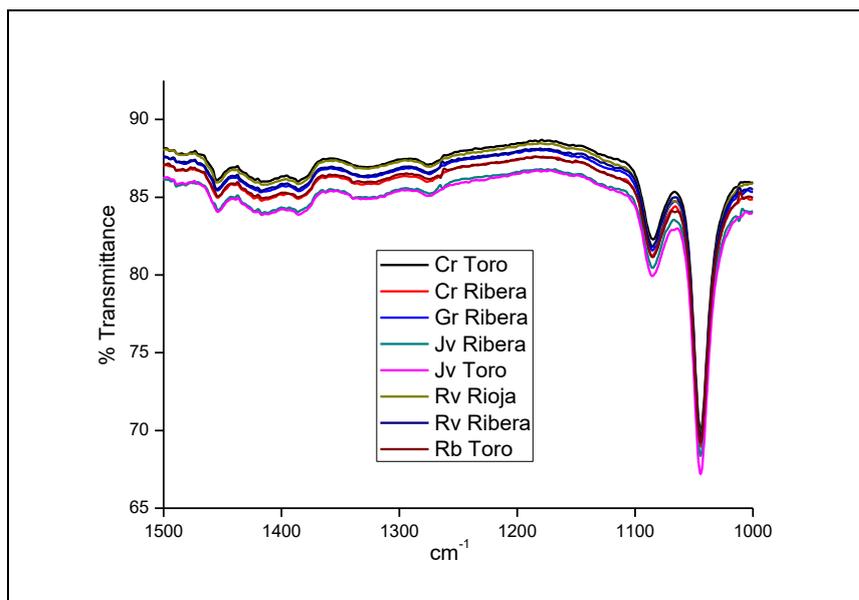


Figura 32-Espectro FTIR entre 1500-1000 cm^{-1} "huella dactilar".

En esta parte del espectro, aparecen varios picos. Entre 1100-1000 cm^{-1} las bandas pertenecen a grupos aromáticos. Por otra parte, ese rango también corresponde a un grupo C-O (alcoholes, fenoles) por lo que estas bandas corresponden a la estructura fenólica presente en la gran mayoría de los compuestos del vino.

El pico suave, de baja intensidad situado a un número de onda de 1300 cm^{-1} corresponde a los compuestos ácido (grupo C-O). En la zona del espectro comprendida entre 1500-1100 cm^{-1} se pueden apreciar numerosos picos poco intensos; la aparición de numerosas bandas se debe a la complejidad química de los vinos.

Además, se puede apreciar que la intensidad del espectro es mayor para aquellos vinos más jóvenes.

Aunque no se han podido asignar de forma exacta los picos de absorción a los compuestos del vino de forma precisa y, además, los espectros obtenidos son muy similares entre sí, con pequeñas diferencias en las intensidades, lo que se ha obtenido con la espectroscopía FTIR es una "huella dactilar" de todos los vinos, que se utilizará para posteriores estudios estadísticos, que amplificarán estas diferencias.



4.4. Análisis electroquímico de los vinos con la lengua electrónica

En este apartado se analizarán las medidas de voltametría cíclica realizadas con la red de sensores elegida, viendo cómo responde ante las diferentes muestras de vino al igual que en el electrolito KCl (blanco) y en catecol, siendo este último empleado como antioxidante patrón para determinar los límites de detección de cada uno de los sensores.

4.4.1. Resupuesta voltamétrica de los sensores en KCl

La red de sensores está formada por siete electrodos Dropsens diferentes. Los electrodos Dropsens se pueden clasificar en varias clases, “*Electrodos serigrafados no modificado*”: DRP-110 y DRP-550 y “*Electrodos de carbón serigrafados modificados*”: DRP-110 CNT, DRP-110 SWCNT, DRP-110 PANI, DRP-110 Ni y DRP-Glu 10.

Se caracterizan porque en todos el electrodo de referencia es de plata y el contra-electrodo es de carbón, excepto para DRP-550 cuyo contra-electrodo es de platino.

Como ya se ha comentado en el *Capítulo 2*, los sensores que se han utilizado tienen diferentes electrodos de trabajo y, por tanto, la interacción de los mismos con las muestras a analizar dará lugar a una respuesta voltamétrica distinta, característica no sólo del electrodo de trabajo, sino también del analito en cuestión.

Es de esperar que los electrodos de trabajo modificados aportaran una sensibilidad mayor, haciendo que la respuesta voltamétrica sea más intensa.

Antes de todo, es importante analizar los electrodos en una disolución base o blanco (en este caso una disolución de KCl 0,1 M), para conocer su respuesta en ausencia de analito y estudiar si el electrodo de trabajo presenta picos de oxidación-reducción, y así tenerlo presente cuando se midan analitos disueltos en el blanco, como pueden ser el catecol y/o las muestras de vino. En la *Figura 33* se muestra la respuesta voltamétrica de cada electrodo al ser sumergido en una disolución electrolítica estándar de KCl 0,1 M en el rango desde -1 V a +1 V. Se ha representado el último ciclo de 10.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

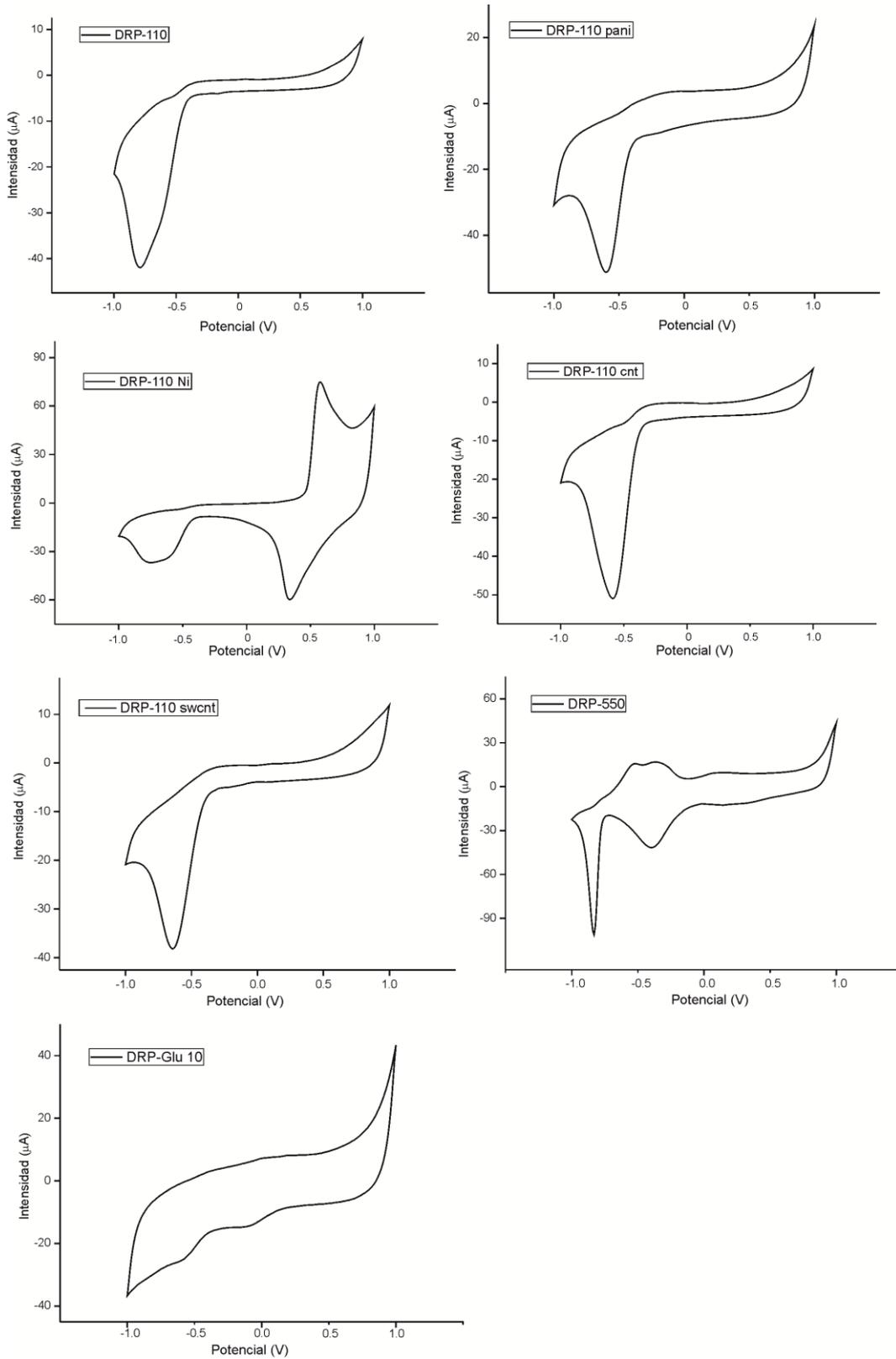


Figura 33-Señal de salida de cada uno de los electrodos en KCl 0,1 M.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

La primera observación que se hace es que en todas las respuestas de los electrodos en KCl se produce la reducción del agua. En los electrodos no modificados DRP-110 y DRP-550 la reducción del agua se da al potencial $-0,8$ V, mientras que los electrodos modificados presentan el pico de reducción del agua en torno a $-0,6$ V.

La segunda observación es ver si se produce una reacción redox debida al propio material del electrodo de trabajo.

Para el caso de los electrodos con el electrodo de trabajo de base carbono (DRP-110, DRP-110 PANI, DRP-110 CNT y DRP-110 SWCNT) en la respuesta voltamétrica no se observan picos de oxidación/reducción debido al material del electrodo de trabajo. El sensor DRP-110 Ni presentó un pico de oxidación-reducción a $0,6$ V y $0,3$ V, respectivamente, debido a la oxidación-reducción del Ni ($\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$). El sensor de platino (DRP-550) tiene capacidad para catalizar reacciones de reducción de protones y se observó que presenta un pico redox en torno a $-0,4$ V correspondiente a la reacción de reducción de hidrógeno. En el caso del sensor de glucosa (DRP-Glu10) que tiene un electrodo de trabajo con base ferrocianuro/carbón, se observó un pico de reducción a $-0,1$ V y un pico de oxidación muy suave a $0,2$ V debido a la oxidación/reducción del $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$. Además, se observa un pico de reducción a $-0,6$ V que se corresponde con el consumo de O_2 para producir H_2O_2 .

4.4.2. Respuesta voltamétrica de los sensores en catecol

Las uvas y, por lo tanto los vinos, son ricos en polifenoles y su contenido fenólico varía a lo largo de su crianza. Por este motivo, es necesario conocer si los sensores elegidos responden a los polifenoles. Entre la gran variedad de compuestos fenólicos que los vinos contienen se ha elegido como patrón el catecol, ya que es un fenol que se encuentra presente en la gran mayoría de las uvas y que tiene un papel importante en las características organolépticas y en el proceso de maduración de los vinos.

La *Figura 34* muestra la respuesta voltamétrica de los sensores en una disolución de catecol 10^{-3} M en KCl $0,1$ M.

Previamente, los sensores se ciclaron en KCl $0,1$ M hasta obtener una respuesta estable.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

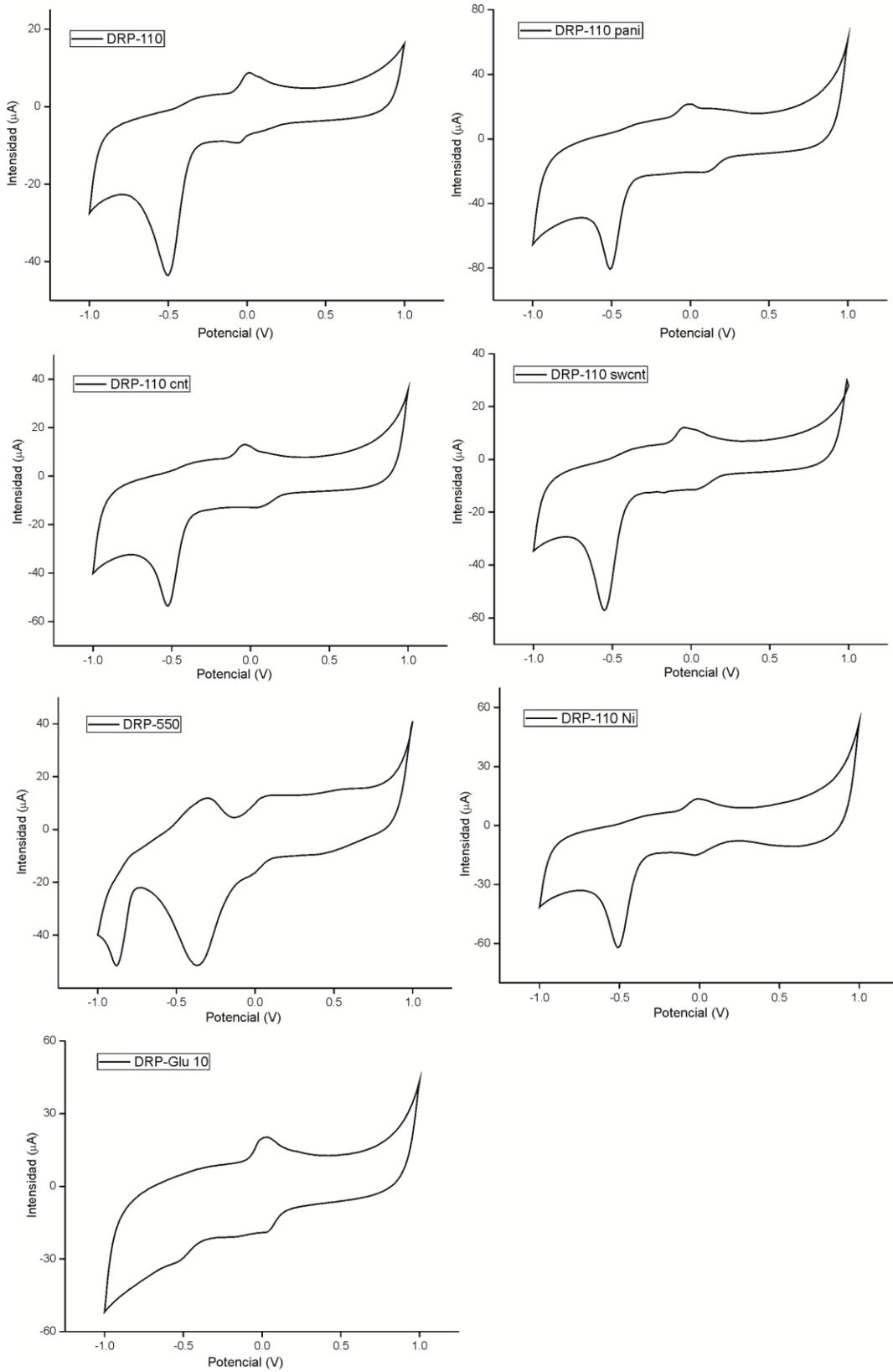


Figura 34-Respuesta de los electrodos en catecol 10^{-3} M.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

Como se puede apreciar en la *Figura 34* los voltamogramas de los sensores presentan picos de oxidación/reducción del catecol. En todos ellos, se puede observar la oxidación del catecol a su forma quinoide (benzoquinona) y tras aplicar un voltaje en sentido contrario, se aprecia la reducción de la benzoquinona de nuevo a catecol (*Figura 35*).

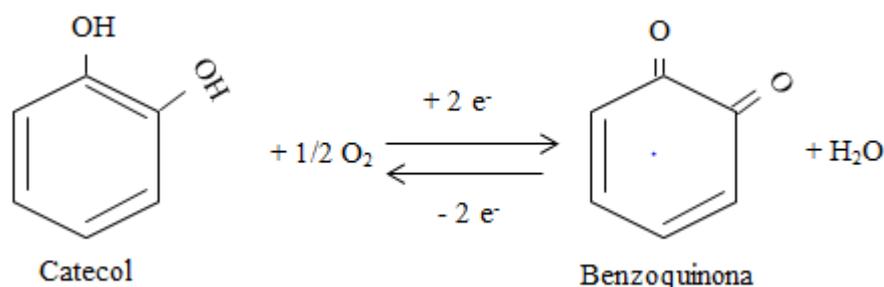


Figura 35-Proceso redox del catecol.

Los potenciales a los que se produce la oxidación/reducción del catecol se recogen en la *Tabla 8*:

Tabla 8-Potenciales de oxidación/reducción de los electrodos en catecol.

	Potencial de oxidación (V)	Potencial de reducción (V)
DRP-110	0,0	-0,1
DRP-550	+0,1	0,0
DRP-110 PANI	0,0	+0,2
DRP-110 CNT	-0,1	+0,1
DRP-110 SWCNT	-0,1	+0,2
DRP-110 Ni	0,0	0,0
DRP-Glu10	0,0	+0,1

En todos los casos se continúa observando el pico correspondiente a la reducción del agua. Así como, en el electrodo platino (DRP-550) se sigue observando la reacción de reducción de hidrógeno. Sin embargo, se deja de observar los picos redox de $\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}^{3+}$ del sensor DRP-110 Ni y los picos del $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ en el sensor DRP-Glu10.

Por otro lado, los picos fueron más intensos en los sensores modificados y con base de platino que con respecto al sensor de base carbono sin modificar (DRP-110), con intensidades en torno a 10/20 μA en la oxidación y -20 μA en la



reducción, mientras que el sensor DRP-110 presentó una intensidad inferior a $10 \mu\text{A}$ en la oxidación y de $10 \mu\text{A}$ en la reducción.

4.4.3. Estudio de la sensibilidad de los sensores. Límites de detección

Una vez conocida la respuesta de los electrodos en catecol, se determinaron los límites de detección de la red de sensores. Conocer los límites de detección es de gran importancia ya que permite saber la concentración mínima que es capaz de reconocer cada uno de los electrodos que forman la red de sensores.

Para ello, se midió la respuesta de cada electrodo a diferentes concentraciones de catecol (*Figura 36-42*), aumentando la concentración mediante adiciones consecutivas, tal y cómo se explicó en el *Capítulo 2*.

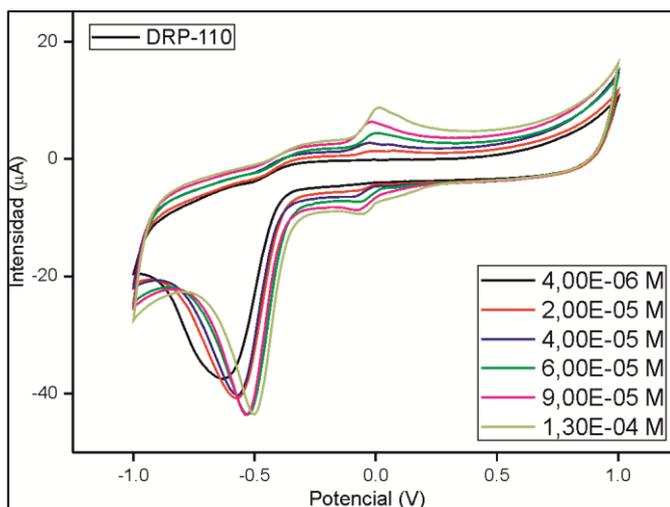


Figura 36-LD: Voltamogramas de DRP-110 en catecol.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

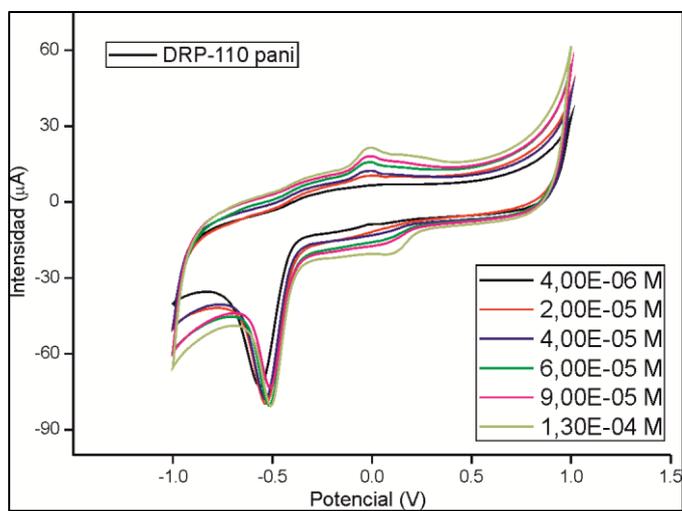


Figura 37-LD: Voltamogramas de DRP-110 PANI en catecol.

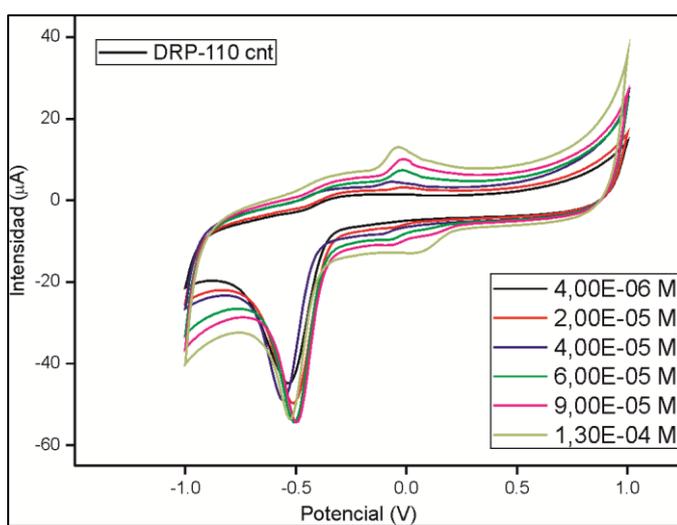


Figura 38-LD: Voltamogramas de DRP-110 CNT en catecol.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

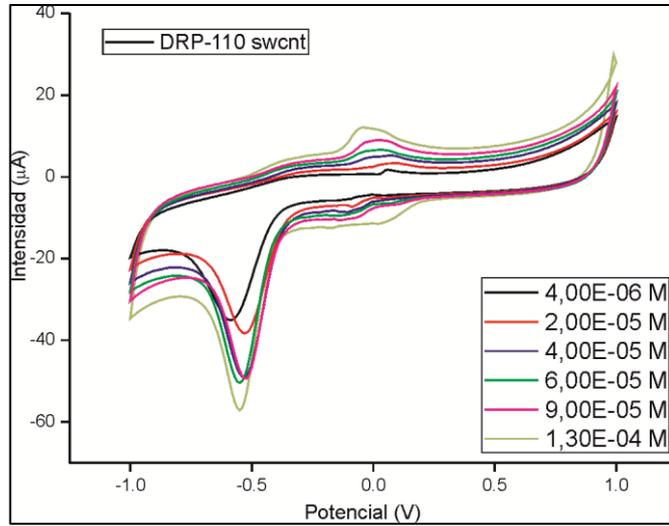


Figura 39-LD: Voltamogramas de DRP-110 SWCNT en catecol.

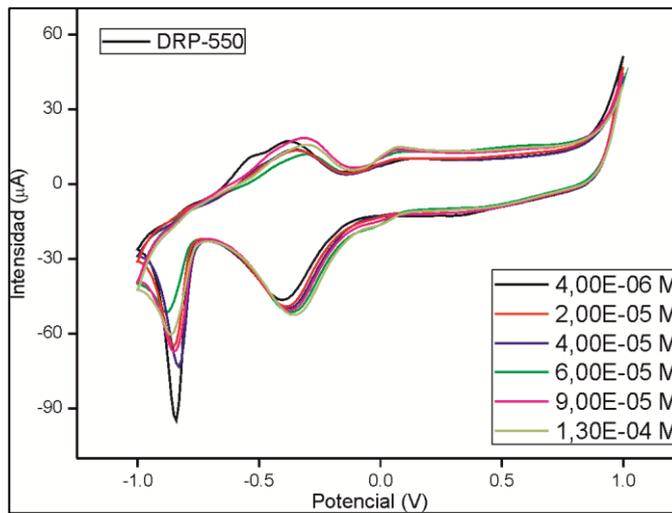


Figura 40-LD: Voltamogramas de DRP-550 en catecol.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

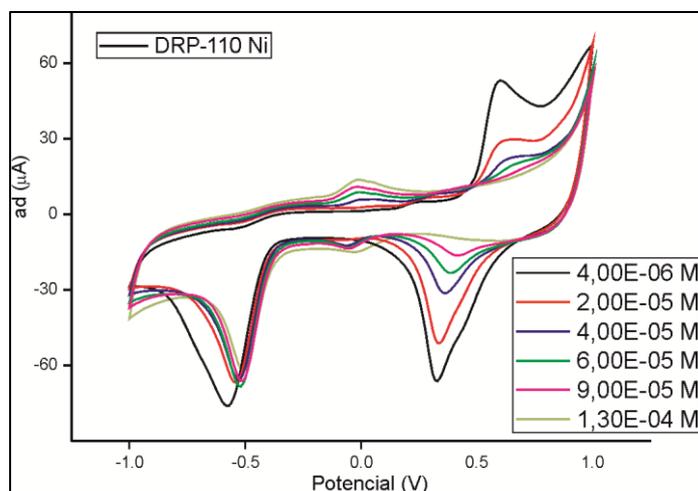


Figura 41-LD: Voltamogramas de DRP- 110 Ni en catecol.

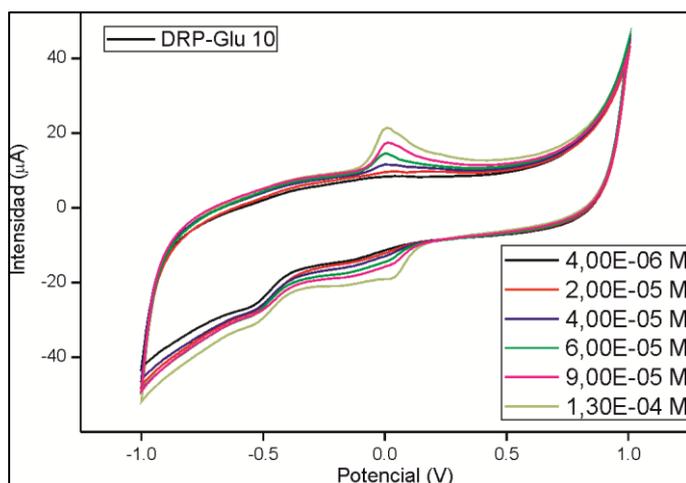


Figura 42-LD: Voltamogramas de DRP-Glu 10 en catecol.

En los voltamogramas se puede apreciar que al aumentar la concentración de catecol aumenta la intensidad de los picos de oxidación/reducción. Siguiendo el procedimiento descrito en el *Capítulo 2* se determinó el límite de detección de cada sensor mediante el método de $(3 \cdot SD/m)$. Los resultados obtenidos ser recogen en la *Tabla 9*.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 9- Límites de detección (mol/L) de los sensores Dropsens que forman la lengua electrónica

	Oxidación	R ²	Reducción	R ²
DRP-110	4,67 E-06	0,994	6,38 E-06	0,970
DRP-550	4,20 E-05	0,926	9,66 E-06	0,930
DRP-110 PANI	2,21 E-06	0,973	2,33 E-06	0,992
DRP- 110 CNT	5,82E-06	0,992	6,21 E-06	0,982
DRP-110 SWCNT	3,39 E-06	0,995	7,20 E-06	0,937
DRP-110 Ni	1,20 E-06	0,987	1,29 E-06	0,904
DRP-Glu10	7,52 E-06	0,994	6,69 E-06	0,981

Los límites de detección obtenidos evidencian la sensibilidad de los sensores, capaces de detectar concentraciones muy bajas de analito.

Se observa que los electrodos serigrafiados modificados presentan límites más sensibles que los no modificados. Ésta es una de las ventajas que presenta la modificación de los sensores. El sensor DRP-110 Ni presentó los mejores LDs, tanto en la oxidación como en la reducción. Este sensor está diseñado como electrocatalizador para la oxidación electroquímica de moléculas orgánicas pequeñas, tales como, carbohidratos, aminoácidos y alcoholes, de aquí que presente una excelente sensibilidad en catecol.

Sin embargo, el electrodo DRP-Glu10, a pesar de ser un electrodo modificado, presenta límites de detección menores que el resto de electrodos. Esto se debe a que es un electrodo modificado con la enzima glucosa oxidasa (GOx) que es una oxido-reductasa que cataliza la oxidación de la glucosa, reduciendo el oxígeno a peróxido de hidrógeno y es altamente específica para la D-glucosa. En la uva el rango de concentración que se estima de glucosa es de 0,19-8,71 g (por cada 100 g de uva) [59]. A medida que la uva madura los azúcares fermentan (fermentación alcohólica) y aumenta el contenido polifenólico; es por ello que, en los vinos, el contenido de azúcares es muy bajo en comparación con las uvas dando este sensor una respuesta voltamétrica mucho menos intensa.

4.4.4. Respuesta voltamétrica de los sensores en los vinos

Este apartado es uno de los más importantes del trabajo realizado, ya que se evalúa la señal de la lengua electrónica frente a los vinos, cada cual con diferente tiempo de envejecimiento, composición química, así como contenido polifenólico.

Cabe destacar que los sensores que conforman la lengua electrónica no son específicos, es por ello que se utiliza una red de sensores para obtener una



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

selectividad cruzada que aporte una “huella dactilar” de cada vino. De este modo, las respuestas voltamétricas de los sensores tendrán diferente forma, con diferentes picos a diferentes potenciales e intensidades distintas. Estos picos no responden a un único compuesto químico de los vinos, que son mezclas muy complejas en cuanto a su contenido químico.

Antes de analizar los vinos, los sensores se ciclaron en KCl 0,1 M hasta obtener una señal estable en el blanco. Después se analizaron las muestras de vino, que fueron diluidas al 50% en KCl, bajo las condiciones de análisis ya descritas en el *Capítulo 2*.

Cada vino se cicló 10 veces con cada sensor siendo el número de voltamogramas obtenido de 560 (8 vinos x 7 sensores x 10 ciclos).

La *Figura 43* recoge, a modo de ejemplo, el último ciclo registrado para cada sensor en el vino Crianza (Toro).

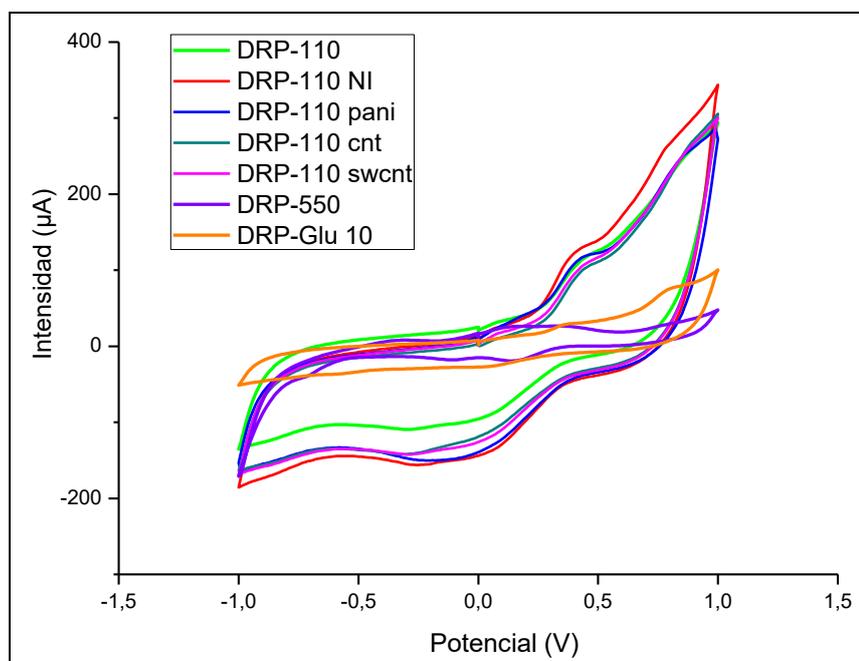


Figura 43-Voltamograma de la red de sensores en el vino Crianza (Toro)

Los resultados obtenidos muestran una respuesta voltamétrica donde se observan picos de oxidación en torno a 0,5 V y 0,8 V y picos de reducción muy anchos en torno a 0,0 V. Estos picos redox son debidos a los polifenoles presentes en el vino. Por otro lado, el sensor de platino (DRP-550) dio una respuesta muy pobre en comparación con los sensores con base de carbono, al igual que el sensor de glucosa oxidasa (DRP-Glu10), como era de esperar, como ya se mencionó anteriormente, por el bajo contenido en glucosa de los vinos. Se observa que los



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

sensores modificados han dado respuestas voltamétricas más intensas en comparación con el sensor DRP-110 no modificado, sobre todo en el pico de reducción esta mejora es más evidente, aunque la forma del voltamograma es similar, ya que todos tienen base de carbono. Las intensidades de los picos redox son muy altas, entorno a los 100-150 μA (valor absoluto).

Otro ejemplo, que se representa en la *Figura 44*, es la respuesta voltamétrica de los sensores en el vino Gran Reserva (Ribera).

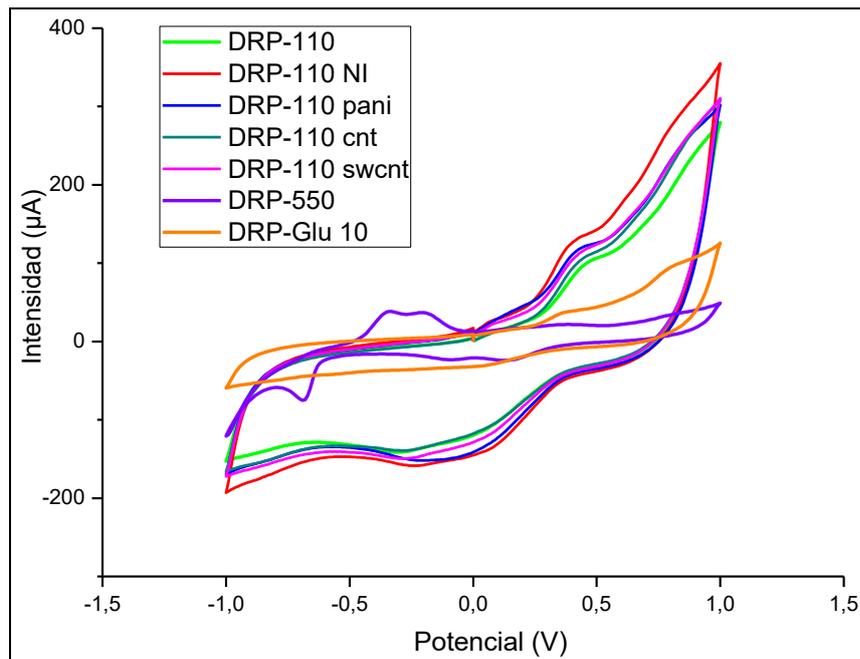


Figura 44-Voltamograma de la red de sensores en el vino Gran Reserva (Ribera).

Como se puede apreciar, al igual que sucedía con el ejemplo anterior y según lo esperado, aparecen picos de oxidación/reducción debido a los polifenoles a los mismos potenciales de 0,5 V, 0,8 V (oxidación) y 0,0 V (reducción), y con intensidades similares de 100-150 μA . El sensor DRP-110 no modificado presenta una señal de menor intensidad que se aprecia muy bien tanto en la parte de oxidación como en la de reducción. La señal del electrodo de platino (DRP-550) dio picos muy poco intensos debido a los polifenoles pero se observa muy bien el pico de reducción debido a la hidrólisis del agua y los picos redox de la reacción de reducción de hidrógeno. Igualmente, el sensor DRP-Glu10 tuvo un comportamiento similar al descrito para el vino Crianza (Toro).

En general, la respuesta voltamétrica de los sensores en los demás vinos fue similar a la obtenida en los dos casos descritos anteriormente. Los picos redox debidos a los polifenoles aparecieron a los potenciales descritos y a diferentes intensidades pero dentro del rango de 100-150 μA . La forma de los



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

voltamogramas con base carbono fue similar, aunque dando diferentes intensidades en los picos redox. Los sensores modificados presentaron señales más intensas y los sensores de platino (DRP-550) y glucosa oxidasa (DRP-Glu10) dieron señales muy pobres.

Con el objetivo de comparar los vinos entre sí, se ha representado la respuesta voltamétrica de cada sensor en todos los vinos. En la *Figura 45*, se muestra la señal del sensor DRP-PANI frente a todos los vinos.

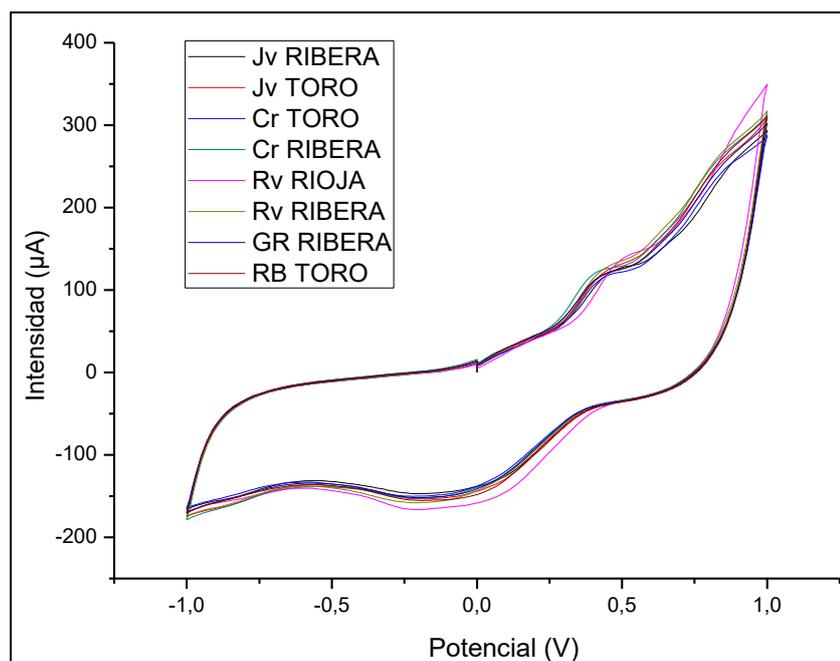


Figura 45-Voltamograma de las señales de todos los vinos de estudio para el electrodo modificado DRP-110 PANI.

Como se puede observar, la señal del sensor es muy similar para todos los vinos, con picos de oxidación en torno a 0,5 V y 0,8 V y un pico muy ancho de reducción a 0,0 V, e intensidades altas en el rango de 100-150 μA . Este resultado hace pensar que los vinos, aunque tengan una composición y envejecimiento diferente, son muy parecidos entre sí, y que un único sensor no sería capaz de diferenciar entre las muestras bajo estudio, confirmando la necesidad de utilizar una red de sensores para conformar la lengua electrónica.

Además, el resultado que cabría esperar sería que la intensidad de la señal del sensor fuese disminuyendo a medida que el vino envejece (más intensa para los jóvenes y de menor intensidad para los vinos reserva y gran reserva) ya que el contenido polifenólico decrece a medida que el vino madura. Pero esto no se puede observar con claridad porque no se hizo un estudio de un vino concreto tomando muestras a lo largo de su maduración, sino que, como ya se ha dicho, se



han tomado diferentes vinos (procedentes de diferentes clases de uva, procedentes de diferentes bodegas y que han llevado un proceso diferente de maduración).

4.5. Tratamiento de datos

En el proyecto se utilizaron los métodos oficiales de la OIV y Panreac Química S.A. para determinar el contenido polifenólico de los vinos (Índice IPT 280 y Folin-Ciocalteu).

Además, los vinos se analizaron con diferentes métodos: lengua electrónica, FTIR y UV-Vis, siendo los dos últimos métodos tradicionales de análisis.

Por lo tanto, uno de los objetivos del trabajo es comparar el análisis de los vinos con lengua electrónica respecto a los métodos tradicionales.

El tratamiento estadístico de datos que se ha realizado abarca varios aspectos. Por un lado, se ha utilizado el PCA para discriminar entre las muestras de vino y, por otro lado, se han utilizado técnicas para correlacionar y predecir el contenido polifenólico de los vinos como son la PLS-1 y SVM-R.

4.5.1. Regresión parcial de mínimo cuadrados (PLS-1)

La lengua electrónica y los espectros de FTIR proporcionan información global sobre una muestra y los parámetros CIELab y Glories proporcionan información de componentes particulares sobre el color que está, relacionado con el índice fenólico.

Sin embargo, las señales proporcionadas por todos estos métodos, que aportan información sobre las propiedades de los vinos, se pueden correlacionar con sus parámetros químicos de interés (contenido polifenólico medido a través del índice Folin-Ciocalteu e IPT280) por medio de PLS-1 [42].

La *Tabla 10* recoge los resultados obtenidos para los modelos de regresión PLS-1 que correlacionan los datos obtenidos con los distintos análisis -lengua electrónica, espectroscopía FTIR, coordenadas CIELab y parámetros Glories- con los parámetros químicos del contenido polifenólico medidos en los vinos a través del Índice Folin-Ciocalteu e IPT280.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 10- Resultado del análisis PLS-1.

Lengua electronica					
Parámetro	R^2_C (a)	RMSE _C (b)	R^2_P (c)	RMSE _P (d)	Número de componentes
IPT280	0.9343	2.0109	0.8956	2.6001	2
Índice Folin	0.9276	1.8972	0.8944	2.3496	3
CIELab					
Parámetro	R^2_C (a)	RMSE _C (b)	R^2_P (c)	RMSE _P (d)	Número de componentes
IPT280	0.8663	2.8691	0.8100	3.5689	4
Índice Folin	0.8269	2.9329	0.7416	3.7388	5
Glories					
Parámetro	R^2_C (a)	RMSE _C (b)	R^2_P (c)	RMSE _P (d)	Número de componentes
IPT280	0.8666	2.8652	0.8219	3.4554	3
Índice Folin	0.9619	1.3752	0.9416	1.7776	5
FTIR					
Parámetro	R^2_C (a)	RMSE _C (b)	R^2_P (c)	RMSE _P (d)	Número de componentes
IPT280	0.9195	2.2255	0.8908	2.7049	3
Índice Folin	0.9029	2.1966	0.8538	2.8123	4

La tabla muestra los coeficientes de correlación y los errores cuadráticos medios en la calibración (R^2_C , RMSE_C) y en la predicción (R^2_P , RMSE_P).

Se encontraron buenas correlaciones (tanto en calibración como en predicción) entre los diferentes métodos y los Índices IPT280 y Folin-Ciocalteu, con valores altos en los coeficientes de correlación y pequeños en los errores cuadráticos medios. El número de componentes indica el número de variables latentes que se necesitarían para explicar la covarianza que existe entre la matriz X (datos obtenidos mediante la lengua electrónica, CIELab, Glories o FTIR) y la matriz Y (índice IPT280 o Folin). A menor número de variables latentes significa que la correlación entre ambas matrices es mayor. Por lo tanto, se observó que la correlación es mejor entre los datos obtenidos mediante los diferentes métodos y el IPT280 que con el Índice Folin, ya que el número de variables latentes es menor y los coeficientes de correlación son más elevados y los errores son más pequeños, siendo la lengua electrónica la que presenta mejores correlaciones tanto con el IPT280 como con el Índice Folin.



4.5.2. Análisis de Componentes Principales (PCA)

Como ya se ha mencionado en el *Capítulo 1*, el Análisis de Componentes Principales (PCA, del inglés) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión (número de variables). Es decir, ante un conjunto de datos con muchas variables, el objetivo será reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. Los nuevos componentes principales o factores serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí.

Este análisis va a permitir discriminar las muestras de vino medidas por los diferentes métodos ya mencionados (lengua electrónica, FTIR, Glories y CIELab).

A continuación, se muestran los gráficos de scores obtenidos del análisis PCA para los distintos métodos de análisis utilizados. La nomenclatura que se ha utilizado para los vinos es la siguiente:

- 1 → Joven (Ribera)
- 2 → Joven (Toro)
- 3 → Roble (Toro)
- 4 → Crianza (Toro)
- 5 → Crianza (Ribera)
- 6 → Reserva (Ribera)
- 7 → Reserva (Rioja)
- 8 → Gran Reserva (Ribera)



4.5.2.1. PCA aplicada a la lengua electrónica

La *Figura 46* muestra el gráfico de scores en 3D de los resultados obtenidos de la PCA aplicada a la lengua electrónica (PCA1 frente PCA2 frente PCA3).

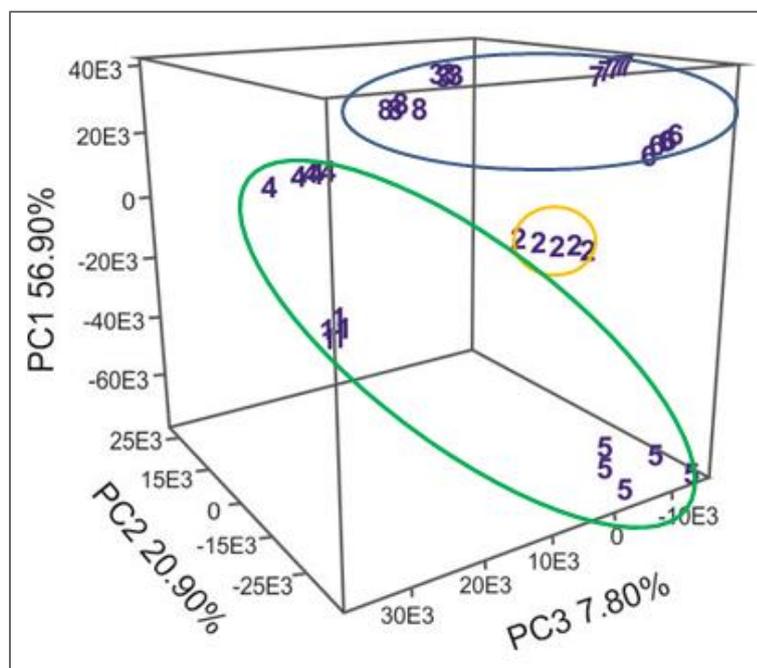


Figura 46- PCA en 3D de la lengua electrónica.

Se observa que la primera componente (PCA1) recoge el 57%, de la variabilidad original, (PCA2) recoge el 21% de la variabilidad original no recogida por la PCA1, y la tercera (PCA3) el 8% de la variabilidad original no recogida por la PCA1 y PCA2. De esta forma entre las tres componentes recogen el 86% de la información original del conjunto de datos de las muestras de vinos.

Además, se puede considerar que los resultados de las medidas realizadas con la lengua electrónica muestran poca dispersión, destacando las muestras 1, 3, 8, 7 y 6, ya que los números están solapados.

También, se puede apreciar la proximidad entre los vinos 3, 8, 7, y 6 los cuales tienen un índice IPT del mismo orden (58,1, 55,8, 59,1 y 57,2, respectivamente). Los vinos correspondientes a los números 4, 1 y 5 también tienen un índice IPT similar (63,9, 66,6 y 64,2, respectivamente). Por último, el vino 2 queda aislado por tener el mayor índice IPT, 81,8.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

Este resultado está en concordancia con el resultado obtenido en el análisis PLS-1, en el que se observó que había una correlación alta entre los datos obtenidos con la lengua electrónica y el IPT280.

Los resultados de la PCA también se pueden observar en dos dimensiones (2D). La *Figura 47* muestra el gráfico de SCORES 2D representando PC1 frente a PC2 (por ser las componentes que contienen mayor información). De nuevo se observa que las muestras de vino se agrupan de acuerdo a su IPT280.

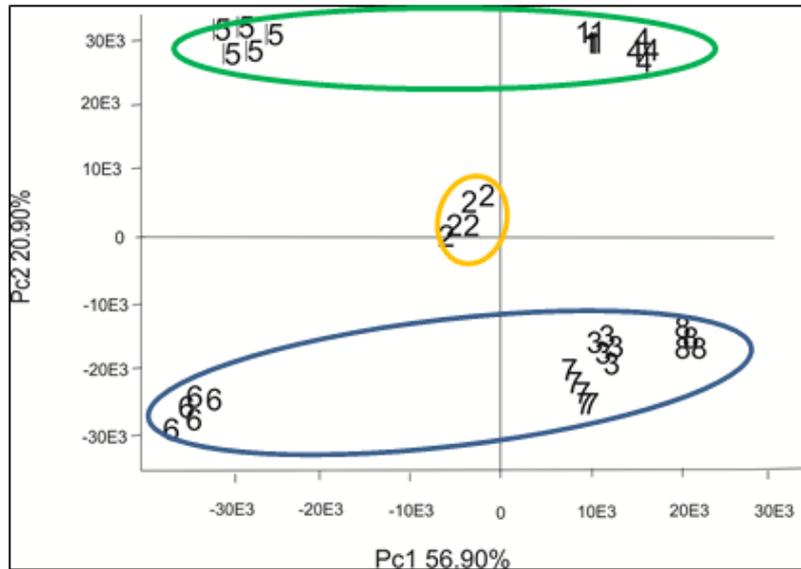


Figura 47-PCA en 2D de la lengua electrónica.

4.5.2.2. PCA aplicada a FTIR

La *Figura 48* muestra el gráfico de scores en 3D de los resultados obtenidos de la PCA aplicado al FTIR.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

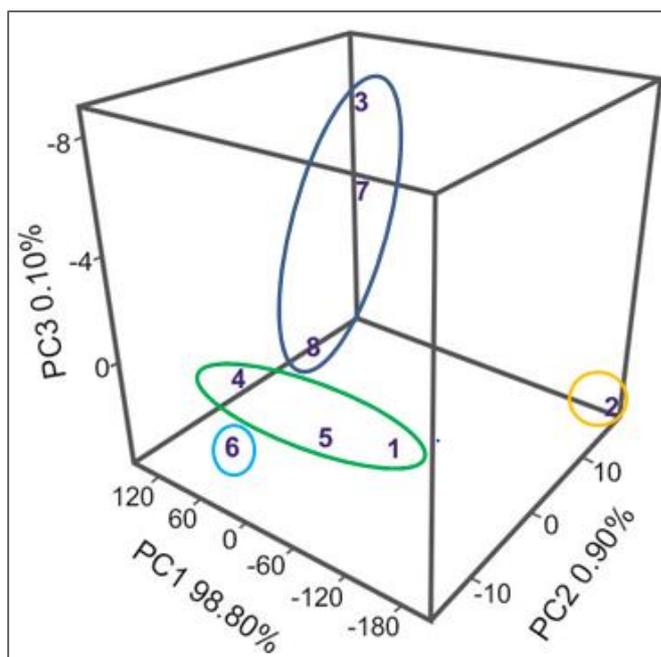


Figura 48-PCA en 3D de FTIR.

Las componentes principales contienen la siguiente información: (PCA1) un 98,80%, (PCA2) un 0,9% y (PCA3) un 0,10%. Por lo tanto, la varianza total explicada suma un 99,8%. Este resultado es muy elevado y es común cuando se trata de técnicas espectroscópicas cuyas medidas son muy precisas y presentan poca variabilidad.

En cuanto a la agrupación de las muestras, cabe destacar que el vino 2, Joven (Toro), que presenta el mayor IPT280 de 81,8 está claramente separado del resto de muestras. También se observan otras agrupaciones que se observaban en el resultado PCA de la lengua electrónica así, por ejemplo, los vinos 3, 7 y 8, que presentan IPT280 muy próximos se encuentran más próximos entre sí, al igual que los vinos 4, 5 y 1, que también tienen IPT280 similares.

La *Figura 49* representa el gráfico de scores en 2D. Como se puede ver la discriminación en 2D es igual que para 3D.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

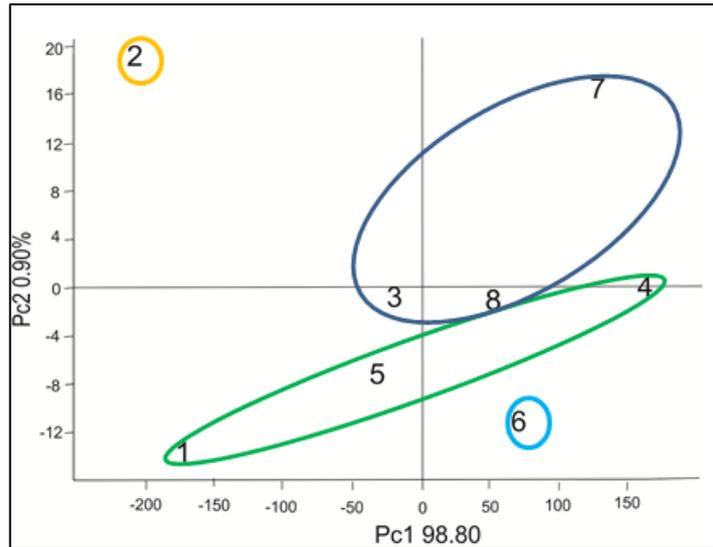


Figura 49-PCA en 2D de FTIR.

4.5.2.3.PCA aplicada a los parámetros de color CIELab

La Figura 50 muestra el gráfico de scores en 3D de los resultados obtenidos de la PCA aplicado a los parámetros CIELab. En ella se puede ver que también la primera componente PCA1 y la segunda componente PCA2 son las que mayor información aportan con el 93,9% y 4,9%, y solamente la tercera componente PCA3 aporta el 0,1%, sumando las tres componentes un 98,9%.

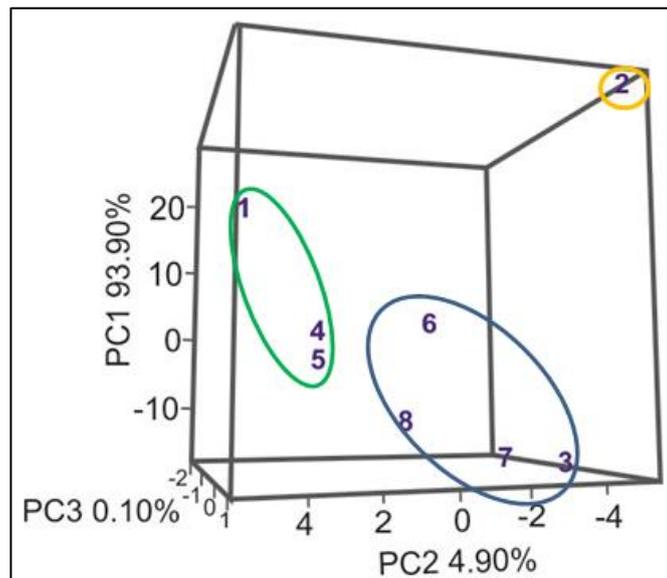


Figura 50-PCA en 3D de CIELab.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

Al igual que en los casos anteriores, en la figura se puede apreciar perfectamente que las muestras tienden a agruparse según su IPT280. El grupo *azul* recoge los vinos 3, 7, 8 y 6 con los índices de 58,1, 59,1, 55,5 y 57,2 respectivamente. Por otro lado, al grupo *verde* pertenecen 5, 4 y 1 con 64,2, 63,9 y 66,6, mientras que el vino enumerado como 2 queda aislado en el grupo *naranja* que tiene un IPT280 más elevado al resto, 81,8.

En la *Figura 51* que representa los resultados de la PCA para los parámetros CIELab en 2D, se obtiene los mismos resultados ya comentados para la representación 3D.

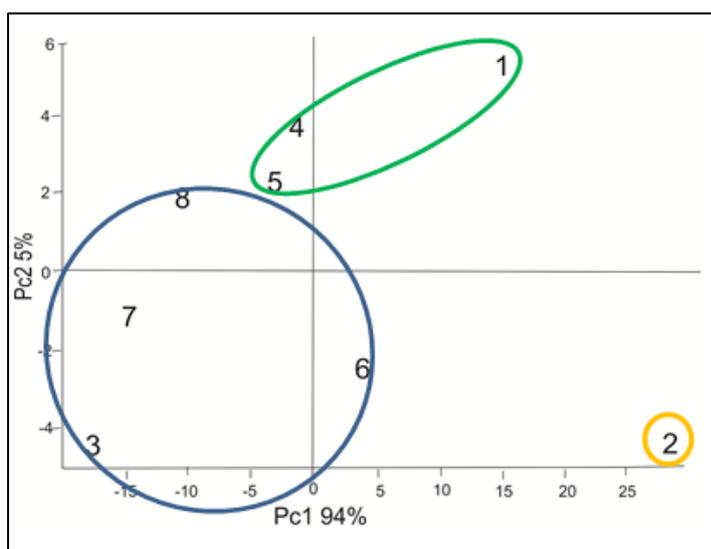


Figura 51-PCA en 2D de CIELab.

4.5.2.4. PCA aplicada a los parámetros del color Glories

La *Figura 52* muestra el gráfico de los scores en 3D de los resultados obtenidos de la PCA aplicado a los parámetros Glories, donde la primera componente (PCA1) aporta 96,8% de la varianza, la PCA2 aporta el 2,8% de la varianza y tan sólo la tercera componente aporta el 0,1% de la información, sumando las tres componentes un 99,7%.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

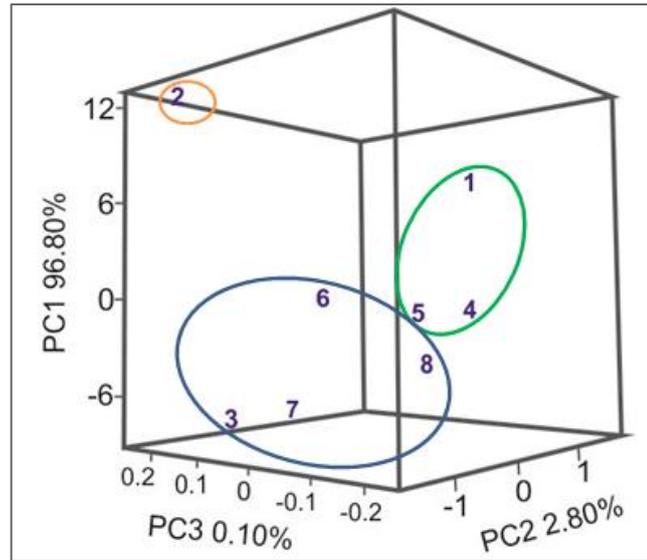


Figura 52-PCA en 3D del Glories.

Al igual que sucedía en la PCA de los parámetros CIELab, las diferentes muestras de vinos se dividen en tres grupos según el IPT, siendo estos los mismos grupos que se nombraban anteriormente; grupo *azul* con 3, 7, 8 y 6 con los índices IPT de 58,1, 59,1, 55,5 y 57,2, el grupo *verde* con 5, 4 y con 64,2, 63,9 y 66,6 y finalmente el vino enumerado como 2 aislado en el grupo *naranja* por tener el índice más elevado, 81,8.

La Figura 53 muestra su respectiva representación en 2D que permite una buena diferenciación entre los clusters.

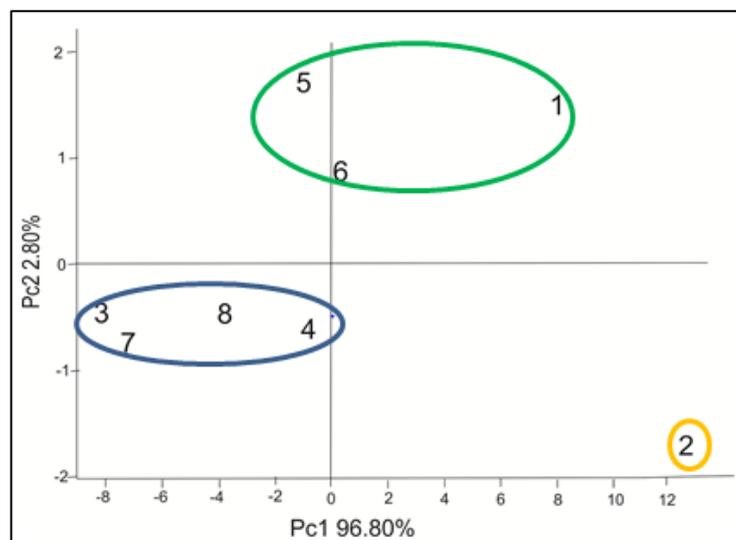


Figura 53-PCA en 3D del Glories.



4.5.3. Máquina de vector soporte – Regresión (SVMR)

El análisis de regresión con SVM permite obtener modelos de predicción a partir de los datos obtenidos con los diferentes métodos. En SVMR se tienen dos matrices de datos, una con los predictores (X), que, en este trabajo, está formada por los datos que se obtienen con la lengua electrónica, y otra con la variable respuesta (Y), que será el IPT280 o el Índice Folin.

Este análisis estadístico se realizó solamente para la lengua electrónica, ya que, como se vio en el análisis PLS-1, la correlación con la lengua electrónica y los parámetros IPT280 e Índice Folin es mayor, presentando un menor número de variables latentes (2 para IPT280 y 3 para Folin-Ciocalteu) y los valores de los coeficientes de correlación y de los errores fueron mejores que en el resto de métodos, tanto en la calibración como en la predicción.

Por lo tanto, con el objetivo de poder predecir el contenido polifenólico (IPT280 e Índice Folin-Ciocalteu) de las muestras de vinos a partir de las respuestas de la lengua electrónica, se ha construido una matriz “X” (predictores) que corresponde a la respuesta de la red de sensores de la lengua electrónica, y una matriz “Y” (respuesta), que contiene los parámetros químicos (IPT o Folin-Ciocalteu, en cada caso) de las muestras de vino obtenidas por los métodos tradicionales.

Los valores de IPT280 y Folin-Ciocalteu de las muestras de vino se recogen en la *Tabla 11*.

Tabla 11-Tabla resumen con los índices IPT y Folin.

Vino	IPT280	Índice Folin-Ciocalteu
Joven (Toro)	81.8	81.1
Joven (Ribera)	66.6	73.4
Roble (Toro)	58.1	65.2
Crianza (Toro)	63.9	70.0
Crianza (Ribera)	64.2	69.4
Reserva (Rioja)	59.1	64.1
Reserva (Ribera)	57.2	57.0
Gran Reserva (Ribera)	55.8	61.1

En primer lugar, se construyen modelos de regresión con el fin de predecir parámetros químicos de muestras de vino que no se incluyen en la construcción del mismo, como ya se explicó con anterioridad en el *Capítulo 2*. La *Tabla 12* muestra los coeficientes de correlación y los errores de los modelos para el IPT280 e Índice Folin.



CAPÍTULO 4: RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 12-Resultados para los modelos SVM-R.

Parámetro	R_C^2 (a)	RMSE _C (b)	R_P^2 (c)	RMSE _P (d)
IPT280	0.9866	0.9835	0.9748	1.3282
Índice Folin	0.9866	0.8665	0.9755	1.1704

(a) Coeficiente de correlación cuadrada en la calibración, (b) Error cuadrático medio de la calibración; (c) Coeficiente de correlación cuadrada en la predicción; (d) Error cuadrático medio de la predicción.

Se puede observar que los coeficientes de correlación, tanto para la calibración como para la predicción son muy elevados, por lo que cabe esperar que se obtengan buenas predicciones de los parámetros IPT280 e Índice Folin.

Una vez creados los modelos de predicción, éstos se utilizaron para predecir valores de IPT280 y del Índice Folin de muestras de vino que no se incluyeron en la elaboración de los modelos. Los resultados se muestran en la *Tabla 13* frente a los resultados experimentales obtenidos por métodos químicos tradicionales.

Tabla 13- Predicción del IPT280 e Índice Folin-Ciocalteu en muestras de vino después de aplicar los modelos de regresión realizados con SVM-R.

Vino	Predicción del IPT280 mediante SVMR	IPT280 obtenido por métodos tradicionales	Error Relativo (%)	Predicción del Índice Folin mediante SVMR	Índice Folin obtenido por métodos tradicionales	Error relativo (%)
Joven (Ribera)	68.5	66.6	2.9	75.1	73.4	2.3
Crianza (Ribera)	62.7	64.2	2.3	68.0	69.4	2.0
Reserva (Ribera)	58.9	57.2	3.0	58.4	57.0	2.5
Gran Reserva (Ribera)	56.8	55.8	1.8	62.3	61.1	2.0
Joven (Toro)	80.7	81.8	1.3	80.1	81.1	1.2
Crianza (Toro)	63.3	63.9	0.9	69.1	70.0	1.3
Roble (Toro)	58.4	58.1	0.5	66.4	65.2	1.8
Reserva (Rioja)	57.3	59.1	3.0	62.5	64.1	2.5

Como se puede ver en la tabla, los valores predichos (para ambos casos, IPT280 y Folin) se asemejan a los obtenidos por los métodos tradicionales con errores relativos bajos (<3%).

Capítulo 5: Conclusiones y líneas futuras de investigación



5.1. Conclusiones y líneas futuras de investigación

Las principales conclusiones del trabajo se muestran a continuación:

- Se ha desarrollado una lengua electrónica voltamétrica formada por 7 electrodos serigrafados comerciales Dropsens capaz de discriminar vinos de diferente estado de envejecimiento según su contenido polifenólico. Además de la lengua electrónica, se utilizaron herramientas tradicionales, como el FTIR y UV-Vis, para comparar los resultados obtenidos mediante la novedosa lengua electrónica y las anteriores técnicas espectroscópicas.
- La red de sensores utilizada mostró ser capaz de analizar fenoles con límites de detección del orden de 10^{-6} M confirmando su posible uso para el análisis del contenido polifenólico en vinos.
- La técnica de FTIR, en principio, no parece ser una técnica que discrimine entre los diferentes vinos, ya que todos presentaron picos en los mismos números de onda; si bien, los vinos más jóvenes presentaron picos claramente más intensos.
- Los resultados obtenidos mediante el análisis UV-Vis (parámetros Glories y coordenadas CIELab) confirmaron la relación entre el cambio en el color del vino a medida que envejece y su contenido polifenólico.
- El análisis de regresión parcial de mínimos cuadrados (PLS-1) demostró la existencia de muy buenas correlaciones entre los métodos utilizados para medir los vinos (lengua electrónica, FTIR, CIELab y Glories) y el contenido polifenólico (IPT280 e Índice Folin), siendo mejor esta correlación con el IPT280 y, especialmente, en el caso de la lengua electrónica.
- El análisis de componentes principales (PCA) permitió discriminar entre las diferentes muestras de vino cualquiera que fuese la técnica utilizada de



CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS DE INVESTIGACIÓN

análisis y, además, los vinos se podían discriminar de acuerdo a su contenido polifenólico.

- Con el análisis de máquina de vector soporte (SVMR) se han creado modelos de regresión capaces de predecir el IPT280 y el Índice Folin-Ciocalteu de muestras de vino a partir de los resultados voltamétricos obtenidos con la lengua electrónica DropSens.
- Como última conclusión, que responde al segundo objetivo del proyecto: “Comparación de los métodos tradicionales frente a la lengua electrónica como herramienta novedosa”, se ha de decir que, tanto los métodos tradicionales, como la lengua electrónica, son capaces de discriminar los diferentes vinos según su contenido polifenólico (según ha demostrado el análisis PCA). No obstante, teniendo en cuenta las ventajas que ésta última ofrece (ser una herramienta de reducido tamaño, que puede ser portátil y empleada para mediciones in-situ, además de no necesitar una preparación de las muestras), se concluye que la lengua electrónica presenta claras ventajas frente al resto de técnicas empleadas en el trabajo, además de haber presentado mejores correlaciones con el contenido polifenólico que el resto.
- En cuanto a una posible línea de investigación futura, sería interesante realizar los análisis que se han realizado en este trabajo de investigación de diferentes vinos en diferentes edades (el mismo vino cuando es joven hasta que llega a ser un Gran Reserva), ya que aquí no ha sido posible por el tiempo que conllevaría esperar a su envejecimiento hasta obtener un vino Gran Reserva.

BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- [1] Fundación KPMG, “Alimentación y bebidas: tendencias 2016”, 2016.
- [2] A. Legin, A. Rudnitskaya, L. Lvova, Y. Vlasov, C. Di Natale, and A. D’Amico, “Evaluation of Italian wine by the electronic tongue: Recognition, quantitative analysis and correlation with human sensory perception” *Anal. Chim. Acta*, vol. 484, pp. 33–44, 2003.
- [3] P. Giménez-Gómez, R. E. Pujol, F. Capdevila, A. P. Pujol, C. Jiménez-Jorquera, and M. G. Capitán, “Portable electronic tongue based on microsensors for the analysis of cava wines” *Sensors*, vol. 16, pp. 1–12, 2016.
- [4] R. R. Villamor, “The Impact of Wine Components on the Chemical and Sensory Properties of Wines”, 2012.
- [5] Organización Internacional de la viña y el vino. (2016), “Balance de la OIV sobre la situación vitivinícola mundial”, 2016.
- [6] R. Jackson, "Wine Science: Principles and Applications", Elsevier, pp. 620-630, 2008.
- [7] J. Garrido and F. Borges, “Wine and grape polyphenols - A chemical perspective” *Food Res. Int.*, vol. 54, pp. 1844–1858, 2013.
- [8] A. Soto, J. A. Rodríguez, A. Castañeda-Ovando “*Determinación de la capacidad antioxidante de vinos mediante análisis de inyección de flujo con detección amperométrica*”, pp. 539–544, 2008.
- [9] S. Rebolo López, “Estudio de la composición polifenólica de vinos tintos gallegos con D.O.: Ribeiro, Valdeorras y Ribeira Sacra ” pp. 201, 2007.
- [10] J. A. Baur and D. A. Sinclair, “Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 5, pp. 493–506, 2006.
- [11] J. Bruneton, “Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales” vol. 1, Editorial Acribia S.A, pp. 1073, 2001.
- [12] V. Atanasova, H. Fulcrand, V. Cheynier, and M. Moutounet, “Effect of oxygenation on polyphenol changes occurring in the course of wine-making” *Anal. Chim. Acta*, vol. 458, pp. 15–27, 2002.
- [13] V. Cheynier *et al.*, “Structure and properties of wine pigments and tannins” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 57, pp. 298–305, 2006.
- [14] I. R. Cascales, “Extracción de compuestos fenólicos de la uva al vino. Papel de los enzimas de maceración” *Dep. Tecnol. Aliment. Nutr. y Bromatol.*, Ph.D., pp. 253, 2008.
- [15] A. Vicens, “Características del vino joven, crianza, reserva y gran reserva | Gros Mercat.”, <https://www.grosmercat.es/blog/caracteristicas-del-vino-joven-crianza-reserva-y-gran-reserva/> (accessed Julio 08, 2015)



BIBLIOGRAFÍA

- [16] H. Fulcrand, M. Dueñas, E. Salas, and V. Cheynier, “Phenolic reactions during winemaking and aging” *Am. J. Enol. Vitic.*, vol. 57, pp. 289–297, 2006.
- [17] C. Alcalde-Eon, M. T. Escribano-Bailón, C. Santos-Buelga, and J. C. Rivas-Gonzalo, “Changes in the detailed pigment composition of red wine during maturity and ageing: A comprehensive study” *Anal. Chim. Acta*, vol. 563, pp. 238–254, 2006.
- [18] M. J. Martelo-Vidal, F. Domínguez-Agis, and M. Vázquez, “Ultraviolet/visible/near-infrared spectral analysis and chemometric tools for the discrimination of wines between subzones inside a controlled designation of origin: A case study of Rías Baixas,” *Aust. J. Grape Wine Res.*, vol. 19, pp. 62–67, 2013.
- [19] C. A. T. dos Santos, R. N. M. J. Páscoa, and J. A. Lopes, “A review on the application of vibrational spectroscopy in the wine industry: From soil to bottle” *Trends Anal. Chem.*, vol. 88, pp. 100–118, 2017.
- [20] J. Nogales-Bueno, B. Baca-Bocanegra, M. J. Jara-Palacios, J. M. Hernández-Hierro, and F. J. Heredia, “Evaluation of the influence of white grape seed extracts as copigment sources on the anthocyanin extraction from grape skins previously classified by near infrared hyperspectral tools,” *Food Chem.*, vol. 221, pp. 1685–1690, 2017.
- [21] M. J. Martelo-Vidal and M. Vázquez, “Classification of red wines from controlled designation of origin by ultraviolet-visible and near-infrared spectral analysis,” *Ciência e Técnica Vitivinícola*, vol. 29, pp. 35–43, 2014.
- [22] R. Khani, R. Rahmanian, and N. V. Motlagh, “UV–Visible Spectrometry and Multivariate Calibration as a Rapid and Reliable Tool for Simultaneous Quantification of Ternary Mixture of Phenolic Acids in Fruit Juice Samples,” *Food Anal. Methods*, vol. 9, pp. 1112–1119, 2016.
- [23] N. Molla, I. Bakardzhiyski, Y. Manolova, V. Bambalov, D. Cozzolino, and L. Antonov, “The Effect of Path Length on the Measurement Accuracies of Wine Chemical Parameters by UV, Visible, and Near-Infrared Spectroscopy,” *Food Anal. Methods*, pp. 1156–1163, 2016.
- [24] E. García, I. Fernández, and A. Fuentes, “Determinación de polifenoles totales por el método de Folin- Ciocalteu,” pp. 2–8, 2015.
- [25] J. García, M. Xirau Vayreda “Manual Panreac”, Panreac Química, S.A.U.
- [26] I. Sen and F. Tokatli, “Differentiation of wines with the use of combined data of UV-visible spectra and color characteristics,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 45, pp. 101–107, 2016.
- [27] E. Cristea, “Determination of the optimal Phenolic Extration in red wines using the Glories method,” pp. 60, 2014.
- [28] S. Pérez-Magariño and L. González-San José, “Relationships among colorimetric parameters of rosé wines evaluated by different methods,” *J. Wine Res.*, vol. 17, pp. 35–43, 2006.



BIBLIOGRAFÍA

- [29] A. Debebe *et al.*, “Alcohol Determination in Distilled Alcoholic Beverages by Liquid Phase Fourier Transform Mid-Infrared and Near-Infrared Spectrophotometries,” *Food Anal. Methods*, vol. 10, pp. 172–179, 2017.
- [30] Y. Tahara and K. Toko, “Electronic tongues-a review,” *IEEE Sens. J.*, vol. 13, pp. 3001–3011, 2013.
- [31] L. Capelli, S. Sironi, and R. Del Rosso, “Electronic Noses for Environmental Monitoring Applications,” *Sensors*, vol. 14, pp. 19979–20007, 2014.
- [32] P. Ciosek, Z. Brzózka, and W. Wróblewski, “Classification of beverages using a reduced sensor array,” *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 103, pp. 76–83, 2004.
- [33] A. Ruiz, “Desarrollo de electrodos modificados quimica y bioquimicamente para la determinacion de compuestos organicos de interes toxicologico,” pp. 291, 1995.
- [34] A. Arrieta, M. L. Rodríguez-Méndez, and J. A. de Saja, “Langmuir-Blodgett film and carbon paste electrodes based on phthalocyanines as sensing units for taste,” *Sensors Actuators B Chem.*, vol. 95, pp. 357–365, 2003.
- [35] V. Parra, T. Hernando, M. L. Rodríguez-Méndez, and J. A. de Saja, “Electrochemical sensor array made from bisphthalocyanine modified carbon paste electrodes for discrimination of red wines,” *Electrochim. Acta*, vol. 49, pp. 5177–5185, 2004.
- [36] M. Gay *et al.*, “Application of an electronic tongue to study the effect of the use of pieces of wood and micro-oxygenation in the aging of red wine,” *Electrochim. Acta*, vol. 55, pp. 6782–6788, 2010.
- [37] A. Fallis, “Nanostructures and Nanomaterials,” *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 53, pp. 1689–1699, 2013.
- [38] M. del Valle, “Sensor Arrays and Electronic Tongue Systems,” *Int. J. Electrochem.*, vol. 2012, pp. 1–12, 2012.
- [39] M. Gutiérrez-Capitán *et al.*, “Hybrid Electronic Tongues Applied to the Quality Control of Wines,” *J. Sensors*, vol. 2014, 2014.
- [40] H. Gh, “Fisiología y funcionamiento El olfato y el gusto electrónico”, *Principios Electroquim. Anal.*, pp. 1-27, 2006
- [41] S. Raithore, J. Bai, A. Plotto, J. Manthey, M. Irely, and E. Baldwin, “Electronic tongue response to chemicals in orange juice that change concentration in relation to harvest maturity and citrus greening or huanglongbing (HLB) disease,” *Sensors*, vol. 15, pp. 30062–30075, 2015.
- [42] M. Sliwinska *et al.*, “Discrimination of apple liqueurs (Nalewka) using a voltammetric electronic tongue, UV-Vis and Raman spectroscopy,” *Sensors*, vol. 16, 2016.
- [43] A. G. Reyes, Alejandro Baeza, “Principios de electroquímica analítica,” *Principios Electroquim. Anal.*, pp. 1–77, 2011.
- [44] F.-G. Bănică, “Chemical Sensors and Biosensors,” *Chem. Sensors Biosens.*, pp. 28–49, 2012.



BIBLIOGRAFÍA

- [45] C. Galan-Vidal, "Chemical sensors, biosensors and thick-film technology," *Trends Anal. Chem.*, vol. 14, pp. 225–231, 1995.
- [46] P. S. Singh, "From Sensors to Systems: CMOS-Integrated Electrochemical Biosensors," *IEEE Access*, vol. 3, pp. 249–259, 2015.
- [47] S. Alegret, M. del. Valle and A. Merkoçi, "Sensores electroquímicos : introducción a los quimiosensores y biosensores" Universitat Autònoma de Barcelona, Ph.D., 2004.
- [48] CSIC-Dpto. de Publicaciones, "Introducción a los sensores". Ed. El Museo Universal, 1987.
- [49] C. Carbonell, "Sensores electroquímicos aplicados al estudio de la corrosión en estructuras de hormigón armado" Universitat politècnica de Valencia, Ph.D. vol. 21, pp. 25–50, 2016.
- [50] E. Parameters, "A Review of Techniques for Electrochemical Analysis," *Princet. Appl. Res.*, pp. 1–15.
- [51] A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, "Principios de análisis instrumental". 5ª Ed., Ed. McGrawHill, pp. 73–89, 2001.
- [52] "Electrodos serigrafiados como plataforma analítica". [Online]. Available: <https://quimicosonador.wordpress.com/2012/03/23/electrodos-serigrafiados-como-plataforma-analitica/>. [Accessed: 22-Jun-2017].
- [53] M. L. Rodríguez-Méndez, "*Electronic noses and tongues in food science*". Academic Press, pp. 247–253, 2016.
- [54] T. Aguilera, J. Lozano, J. A. Paredes, F. J. Alvarez, and J. I. Suárez, "Electronic nose based on independent component analysis combined with partial least squares and artificial neural networks for wine prediction.," *Sensors.*, vol. 12, pp. 8055–72, 2012.
- [55] R. G. Brereton and G. R. Lloyd, "Support Vector Machines for classification and regression," *Analyst*, vol. 135, pp. 230–267, 2010.
- [56] DropSens Products, <http://www.dropsens.com/> (accessed June 26, 2017)
- [57] T. Theophanides, "Infrared spectroscopy - materials science, engineering and technology". *InTech*, pp. 524, 2012.
- [58] I. Gergen and F. P. Technology, "The establishing the quality of red wines on the basic of chromatic characteristics," vol. 13, pp. 199–208, 2007.
- [59] P. Muñoz-Robredo, P. Robledo, D. Manríquez, and R. Molina, "Characterization of Sugars and Organic Acids in Comercial Varieties of Table Grape," *Chil. Jar*, vol. 71, pp. 2–8, 2011.

