



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**Máster en Técnicas Avanzadas en Química.
Análisis y Control de Calidad Químicos.**

**Variación composicional de ácidos orgánicos
durante la vinificación de variedades de uva
minoritarias en Castilla y León.**

Autora: Irene Franco Molás

Tutores: Alberto Martín Baz y María del Sol Vega Alegre

2025

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León, ITACyL, y a la Estación Enológica de Rueda el haberme dado la oportunidad de elaborar este trabajo en sus instalaciones y haberme ayudado y aconsejado a lo largo del mismo. En especial querría agradecer a Pablo Maide y a Alberto Martín su ayuda, su interés y sus valiosas enseñanzas durante toda mi estancia en la Estación y también a posteriori.

También querría agradecer al proyecto MINORSENS el haberme permitido participar en este estudio sobre variedades minoritarias y su valorización. Este proyecto, transfronterizo entre Castilla y León y el norte de Portugal, tiene como objetivo recuperar, poner en valor y caracterizar variedades minoritarias de vid autóctonas de dicha zona. Es un proyecto cofinanciado por la Unión Europea a través del Programa Interreg VI-A España-Portugal (POCTEP).

RESUMEN

El cambio climático está alterando profundamente los equilibrios fisiológicos de la vid, con especial impacto en regiones como Castilla y León, donde las altas temperaturas y la reducción de precipitaciones provocan una maduración temprana de la uva, disminución de la acidez y aumento del grado alcohólico. En este contexto, las variedades minoritarias de vid, muchas en desuso y apenas conocidas, emergen como alternativa por su posible adaptación a condiciones más extremas. Este trabajo analiza tres de estas variedades (Cenicienta, Merenzao y Mandón), evaluando su comportamiento enológico frente al calentamiento global. Previamente, se validó un equipo de análisis enzimático (MIURA 200) para la determinación de ácidos carboxílicos y azúcares, frente a un método de referencia (LISA 3x3), mediante el análisis de muestras reales y materiales de referencia certificados. Se emplean herramientas estadísticas multivariantes para caracterizar la evolución de compuestos clave (glucosa+fructosa, ácido málico y ácido acético) a lo largo del proceso de vinificación. Los resultados mostraron que Mandón presenta una acidez más estable, mientras que Cenicienta también destaca por su equilibrio composicional. Se concluyó que ambas variedades presentan un alto potencial para mitigar los efectos del cambio climático, tanto en vinificaciones monovarietales como en coupages.

ABSTRACT

Climate change is profoundly altering the physiological balance of grapevines, with a particularly strong impact in regions like Castilla y León, where rising temperatures and reduced rainfall are causing earlier grape ripening, decreased acidity, and increased alcohol content. In this context, minority grapevine varieties—many of which had fallen into disuse—are emerging as viable alternatives due to their potential adaptation to more extreme conditions. This study analyzes three of these varieties (Cenicienta, Merenzao, and Mandón), assessing their oenological behavior under global warming scenarios. Prior to this, an enzymatic analysis system (MIURA 200) was validated for carboxylic acids and sugars determination against a reference method (LISA 3x3), using both real samples and certified reference materials. Multivariate statistical tools were used to characterize the evolution of key compounds (glucose+fructose, malic acid, and acetic acid) throughout the winemaking process. The results showed that Mandón maintained more stable acidity, while Cenicienta also stood out for its compositional balance. It was concluded that both varieties have strong potential to mitigate the effects of climate change, both in single-varietal wines and in blends.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1. Acción del cambio climático en la viticultura y vinificación	8
1.2. Ácidos en mostos	13
1.2.1. Ácido tartárico	13
1.2.2. Ácido málico	14
1.3. Fermentación maloláctica	15
1.3.1. Factores que influyen en el proceso de la fermentación maloláctica	16
1.4. Ácidos de origen fermentativo	17
1.4.1. Ácido láctico	17
1.4.2. Ácido acético	17
1.5. Acidez total o titulable	18
1.6. Validación de un método enzimático de análisis	18
2. OBJETIVOS	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Reactivos y materiales de referencia	21
3.2. Preparación de patrones de calibrado	21
3.2.1. Determinación de D-glucosa/D-fructosa por método enzimático UV-vis	23
3.2.2. Determinación de ácido L-málico por método enzimático UV-vis	24
3.2.3. Determinación de ácido acético por método enzimático UV-vis	25
3.3. Muestras para validación	26
3.3.1. Tratamiento de datos para la validación	27
3.3.2. Materiales de referencia para la validación	28
3.3.3. Muestras de variedades minoritarias	29
3.3.4. Determinación de ácido tartárico por método enzimático UV-vis	30
3.3.5. Cuantificación de acidez total	31
3.3.6. Análisis de mostos	31
3.3.7. Análisis en descube	31
3.3.8. Análisis final	32
3.4. Tratamiento de datos	32
3.4.1. Análisis de conglomerados jerárquicos	32
3.4.2. Análisis de componentes principales	33

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1.	Obtención de las rectas de calibrado	35
4.2.	Resultados de la validación	37
4.2.1.	Validación del nuevo método frente al método de referencia	37
4.2.2.	Validación del nuevo método con materiales de referencia	39
4.3.	Análisis de las muestras de vino de variedades minoritarias	41
4.3.1.	Análisis de conglomerados. Mapa de calor conjunto	42
4.3.2.	Análisis de componentes principales	44
5.	CONCLUSIONES	49
6.	BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico del proceso de maduración de una uva en condiciones óptimas, evaluando contenido de azúcares, ácidos, polifenoles y color del fruto.	9
Figura 2. Gráfico del proceso de maduración de una uva en condiciones más cálidas, evaluando contenido de azúcares, ácidos, polifenoles y color del fruto.	10
Figura 3. Recta de calibrado de glucosa+fructosa, ácido málico y ácido acético.	35
Figura 6. Representación de las concentraciones de glucosa+fructosa obtenidas por el método alternativo frente a los del método de referencia.	37
Figura 7. Representación de las concentraciones de ácido málico obtenidas por el método alternativo frente a los del método de referencia.	38
Figura 8. Representación de las concentraciones de ácido acético obtenidas por el método alternativo frente a los del método de referencia.	38
Figura 9. Representación de las concentraciones de glucosa+fructosa obtenidas por el método alternativo frente a los valores diana.	40
Figura 10. Representación de las concentraciones de ácido málico obtenidas por el método alternativo frente a los valores diana.	40
Figura 11. Representación de las concentraciones de ácido acético obtenidas por el método alternativo frente a los valores diana.	40
Figura 12. Mapa de calor y dendrogramas de los resultados analíticos normalizados.	42
Figura 13. Gráfico de cargas del PCA.	45
Figura 14. Gráfico de scores del PCA según etapa del proceso de vinificación	46
Figura 15. Gráfico de scores del PCA según la variedad de uva y procedencia.	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de cada analito en los patrones conjuntos	22
Tabla 2. Parámetros de validación derivados de las rectas de calibrado.	35
Tabla 3. Comparativa de rangos lineales y sensibilidades del método de referencia y del método alternativo.	36
Tabla 4. Comparativa de rangos lineales y sensibilidades del método de referencia y del método alternativo.	36
Tabla 5. Comparación de equipos.	39
Tabla 6. Comparación resultados del MIURA 200 y los materiales de referencia.	41
Tabla 7. Valores propios, varianza explicada y varianza acumulada por los componentes principales obtenidos por PCA	45

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Acción del cambio climático en la viticultura y vinificación

El cambio climático es una realidad que afecta a todos los cultivos y procesos ambientales, y se traduce principalmente en un aumento de las temperaturas y un descenso de las precipitaciones anuales, siendo además éstas de carácter torrencial en ocasiones, lo que hace que el agua se pierda por escorrentía y no se infiltre en el suelo ^[1].

La vid es uno de los cultivos que podría verse más afectado por el cambio climático. Normalmente, las vides se adaptan a un rango de temperaturas, pero tanto los extremos fríos como los cálidos pueden impactarlas negativamente. Por un lado, las condiciones climáticas influyen en su fisiología, productividad y ciclo fenológico ^[2]. Además, el aumento de las temperaturas puede generar mayor estrés hídrico, lo que afectaría a diferentes factores, entre ellos, a la calidad de la uva ^[3].

En las zonas del sur de Europa se están observando ya ciertos efectos negativos con relación al cambio climático. En primer lugar, se produce un adelanto fenológico general de las variedades de uva presentes. Esto se traduce en una maduración en un periodo más cálido y con menores oscilaciones térmicas día-noche, lo que afecta negativamente al proceso de maduración ^[4]. Una maduración en un periodo más cálido produce un mayor pH de los mostos y una acidez total menor, como consecuencia de una menor síntesis de ácido tartárico y una mayor degradación de ácido málico ^[5].

Las temperaturas más altas favorecen un contenido elevado de azúcar en las uvas, obteniendo en consecuencia un vino con un mayor grado alcohólico tras la fermentación ^[6]. Este incremento puede ser percibido por el usuario como un sabor amargo y fuerte, que puede incluso opacar las percepciones organolépticas más sutiles. Con esta casuística, el momento idóneo para realizar la vendimia es un parámetro muy crítico a la hora de obtener un vino de calidad.

Las uvas para vino suelen tardar 3 o 4 meses en madurar. A medida que la uva madura, se incrementa su concentración de azúcares a la vez que disminuye la acidez de manera progresiva. A nivel sensorial, los ácidos ofrecen el contrapunto a los azúcares, aportando un sabor refrescante al vino. La proporción ideal depende de estos dos factores y de otros compuestos minoritarios como los polifenoles, los cuales van incrementando su concentración en la uva hasta un punto óptimo, que suele darse también en ese intervalo de 3 o 4 meses, el cual se ve reflejado en el siguiente gráfico ^[7]:

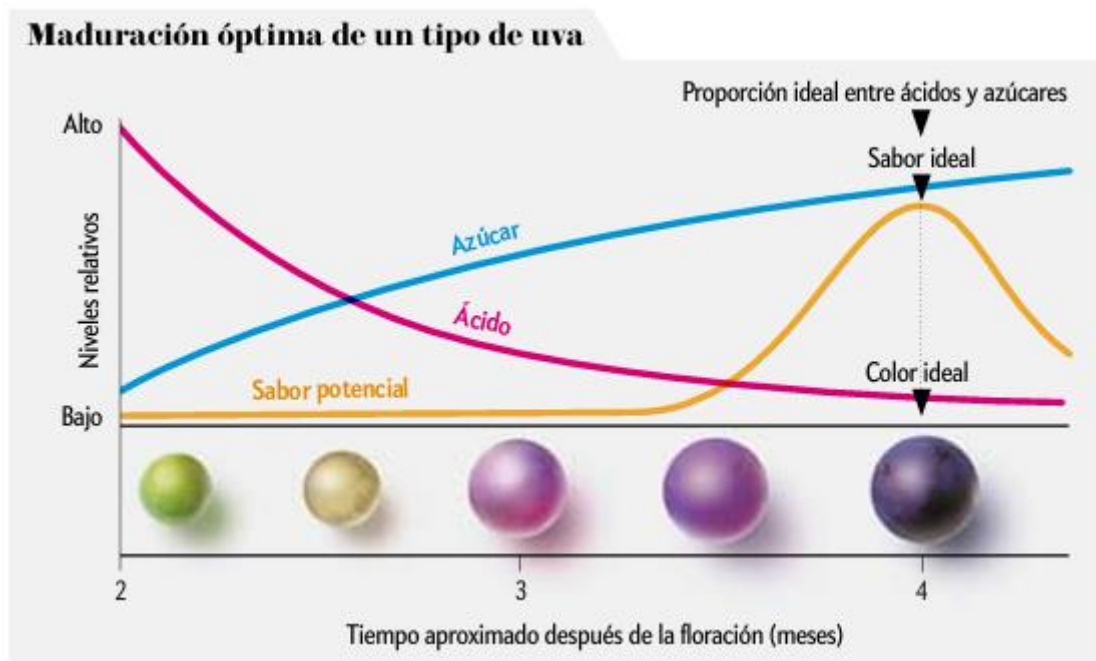


Figura 1. Gráfico del proceso de maduración de una uva en condiciones óptimas, evaluando contenido de azúcares, ácidos, polifenoles y color del fruto [7].

Los compuestos fenólicos contribuyen de una manera importante a la calidad de la uva y posteriormente del vino, ya que determinan el color y la sensación en boca. Unos de los más importantes son los antocianos. Las altas temperaturas podrían retrasar el inicio de la acumulación de antocianos, ya que la activación de algunas enzimas clave se ve inhibida. Por otro lado, para una máxima producción de antocianos es deseable una exposición moderada a la luz solar, mientras que una radiación demasiado intensa puede ocasionar quemaduras en las uvas pudiendo llegar a inhibir el desarrollo del color [6].

La problemática del calentamiento global afecta a esto, ya que la proporción óptima entre ácidos y azúcares se alcanzará en un estadio de la maduración más temprano, sin que se hayan producido todavía el resto de los compuestos interesantes sensorialmente, tal y como se ilustra en la Figura 2 [7]:

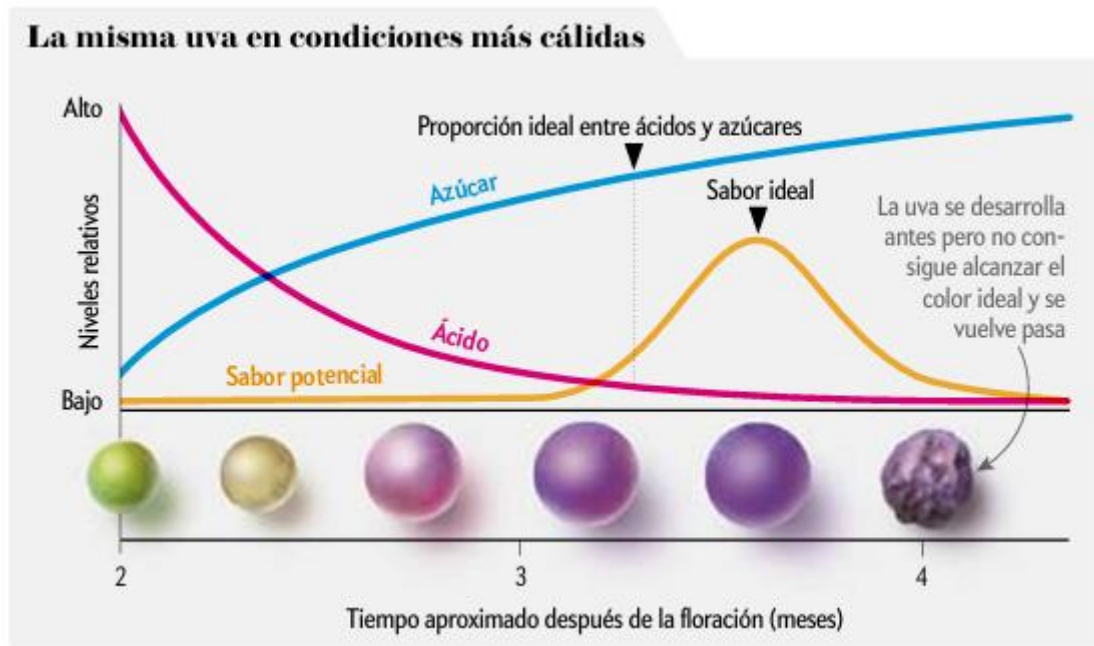


Figura 2. Gráfico del proceso de maduración de una uva en condiciones más cálidas, evaluando contenido de azúcares, ácidos, polifenoles y color del fruto ^[7].

El cambio climático está afectando a todas las zonas vitivinícolas del planeta. Los datos climáticos a escala global desde 1950 hasta 1999 revelan un incremento de la temperatura media de 1,26 °C en las principales regiones vitivinícolas ^[8]. Debido a esto, se está explorando la posibilidad de que se puedan crear un número sustancial de nuevas zonas vitivinícolas en latitudes mucho más elevadas ^[9]. Estos efectos pueden ser positivos para los viñedos situados en zonas frías, pero en zonas más cálidas y secas, como ocurre en ciertas regiones de España, puede verse gravemente afectada tanto la calidad del producto como el volumen de producción vinícola. Debido también a este incremento de temperaturas, se prevé que se produzca un incremento del número de plagas y enfermedades en la vid ^[10]. Esto puede suponer un importante riesgo ya que en España hay un grave problema de diversidad genética en el cultivo de la vid, ya que con tan solo 34 variedades de viñedos diferentes se abarca el 95% de la superficie total cultivada del país, y de estas variedades, 9 cubren el 80% de los cultivos de vid en España. Una de las posibles soluciones para esta problemática es la revalorización de las variedades de cultivo minoritarias. Estas son aquellas variedades de vid que cumplen varias características. Entre ellas, deben tener una superficie de cultivo limitada, no superior a 1000 hectáreas a nivel nacional. Además de este requisito, deberá cumplir que su cultivo a nivel autonómico sea inferior al 1% de la superficie plantada. También, dicha variedad deberá haber sido cultivada antes del ataque filoxérico ^[11].

A finales del siglo XIX, la viticultura sufrió una transformación radical debido a una serie de circunstancias devastadoras. El primero fue la aparición del Oidio, una enfermedad proveniente de América, seguida por la Filoxera, el Mildiu y, casi al mismo tiempo, el Black-rot. Estos patógenos, presentes de forma natural en los bosques americanos donde crecían otras especies de vid resistentes, afectaron gravemente a la *Vitis vinífera*, o vid autóctona, que era altamente vulnerable. La invasión de estos patógenos en los viñedos europeos causó una gran crisis, alterando tanto las prácticas de cultivo como las variedades utilizadas. Muchas cepas tradicionales, especialmente sensibles, desaparecieron o quedaron relegadas a pequeños cultivos aislados. Además, el intercambio masivo de variedades entre regiones vitícolas generó una gran confusión en cuanto a sus nombres y orígenes, ya que frecuentemente se les asignaban denominaciones locales o se las asociaba erróneamente con variedades autóctonas, de aquí el problema existente entre sinonimias y homonimias con los nombres de las variedades. En busca de soluciones, los viticultores experimentaron con cruzamientos entre variedades europeas y especies americanas resistentes, dando lugar a los Híbridos Productores Directos, comúnmente llamados "americanos". Sin embargo, muchos de estos híbridos, aunque era resistentes, no lograban igualar la calidad de las uvas europeas como la Cabernet Sauvignon, Tempranillo o Chardonnay. Además, el secretismo en torno a estos desarrollos, por intereses comerciales, aumentó aún más la desinformación sobre el origen y las características de las nuevas variedades. A pesar de los numerosos intentos, ninguno de estos híbridos consiguió reemplazar a las variedades tradicionales en la producción de vinos de alta calidad, marcando así un antes y después en la historia de la viticultura ^[12].

En las décadas de 1980 y 1990, el establecimiento de varias Denominaciones de Origen en España impulsó un renacimiento vitivinícola sin precedentes. Algunos ejemplos destacados son la D.O. Rías Baixas (creada en 1987), que pasó de 14 bodegas y 237 hectáreas en sus inicios a 180 bodegas y 4.027 hectáreas en 2014, impulsada por la variedad Albariño. También la D.O. Rueda (fundada en 1980), que creció de 6.000 hectáreas en 2003 a más de 13.000 hectáreas en 2017, gracias al éxito de la variedad Verdejo.

Estas denominaciones, centradas en variedades autóctonas de alta calidad, no solo revitalizaron sus regiones, sino que también marcaron el inicio de un movimiento más amplio: la recuperación de variedades tradicionales españolas que habían quedado en el olvido. Tras estos casos de éxito, numerosas zonas vitícolas siguieron el ejemplo, expandiendo la red de D.O. hasta alcanzar las 69 denominaciones actuales ^[12].

En este trabajo se va a abordar el estudio de 3 variedades tintas minoritarias cultivadas en Castilla y León: Cenicienta, Mandón y Merenzao.

El Boletín Oficial de la Provincia de Valladolid (BOP) sufrió en 2024 una modificación en el pliego de condiciones de la D.O. Rueda que incluyó la incorporación de ocho nuevas variedades de uva, entre las cuales destaca la variedad tinta Cenicienta como prioritaria ^[13].

La variedad Cenicienta, autorizada en la DO Rueda, presenta un genotipo único. Es una variedad de ciclo medio largo, con unas características enológicas óptimas y equilibradas en cuanto a contenido alcohólico, ácido, polifenólico y aromático.

La variedad Merenzao está presente en diversas Denominaciones de Origen, está autorizada para su producción en las Denominaciones de Origen de Bierzo, Arribes, León, Ribeira Sacra y Jura, con diferentes sinonimias como son Merenzao, Bastardillo Chico, Negro Saurí y Trousseau. Es una variedad de ciclo corto, presenta un ciclo de maduración final muy rápido por lo que, si no se vendimia pronto, puede dar vinos con grados alcohólicos elevados y acidez descompensada, con una presencia fenólica leve ^[14].

La variedad Mandón, Mandó o Garro, es una variedad presente y autorizada en la Denominación de Origen Arribes. Presenta un ciclo de maduración largo, con una presencia ácida elevada y contenido alcohólico moderado.

Las variedades minoritarias estuvieron durante mucho tiempo en desuso, algunas no lograban completar adecuadamente su ciclo vegetativo, otras no eran suficientemente productivas o no tenían contenido azucarado elevado. Debido al incremento de las temperaturas en verano, con olas de calor cada vez más intensas y frecuentes; y a la reducción de las lluvias, se ha observado que algunas de estas variedades ahora logran madurar completamente, alcanzando índices de maduración equilibrados y de calidad. Estas variedades también destacan por poseer atributos organolépticos particulares, con perfiles aromáticos y gustativos distintivos que las separan de las variedades más comunes. Este carácter diferencial puede aprovecharse para producir vinos singulares y exclusivos, capaces de ofrecer nuevas experiencias sensoriales al consumidor.

Por otro lado, muchas de estas variedades muestran una mayor tolerancia al cambio climático y a ciertas enfermedades, lo que subraya su valor como recurso genético. Preservar estas variedades locales no solo protege el patrimonio vitivinícola, sino que también puede ser clave para mantener la capacidad de adaptación frente a condiciones

ambientales adversas, tanto bióticas como abióticas. En el proyecto MINORSENS, se ha comprobado que algunas de estas variedades presentan una maduración equilibrada, con niveles moderados de alcohol, pH bajos y alta acidez. Los vinos elaborados con ellas tienen una calidad sobresaliente y características organolépticas que los hacen únicos y competitivos en el mercado ^[15].

Para cada una de las variedades, existen unas condiciones de clima y suelo concretas, bajo las cuales son capaces de alcanzar la máxima calidad del fruto y, por tanto, del vino ^[12].

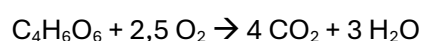
1.2. Ácidos en mostos ^[16]

Los ácidos principales que se encuentran en los mostos son el ácido tartárico, el ácido málico y el ácido cítrico. Se van a desarrollar solamente los dos primeros, ya que el ácido cítrico no es de especial interés para este estudio.

1.2.1. Ácido tartárico

El ácido tartárico es el principal ácido del mosto y responsable en gran medida de la acidez del vino. Se genera en las hojas jóvenes y en los granos verdes, circulando por la planta y depositándose en órganos y tejidos. Su vía metabólica de formación es a partir de la glucosa. El ácido tartárico de la uva es el L (+) tartárico.

Puede degradarse a través del proceso respiratorio de las células vegetales, mediante la siguiente reacción:



Otras vías de degradación del ácido tartárico ya en el vino son: por la acción de las bacterias lácticas del género *Lactobacillus Plantarum*, por la acción de otro tipo de bacterias del género *Lactobacillus Brevis*. Ambas rutas son capaces de degradar el ácido tartárico a ácido acético, el cual supone a elevadas concentraciones un detrimento de la calidad sensorial del vino en su conjunto.

El ácido tartárico confiere al vino resistencia frente a los ataques microbianos, esto es porque tiene un gran poder acidificante en el medio que dificulta la proliferación de microorganismos. También influye altamente en el color del producto final debido a los procesos de extracción durante su producción, y en el sabor, por el potencial acidificante previamente mencionado. Por otra parte, su concentración, que puede oscilar desde 2 a 9

g/L en la uva, dependerá de factores como variedad, región geográfica, climatología y proceso de maduración.

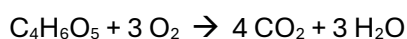
El mayor o menor contenido de ácido tartárico en los mostos viene determinado por su vía de formación y degradación, la cual es la vía respiratoria de las células. Hay diversos factores que repercuten en esto. Uno de ellos es la temperatura. Temperaturas superiores a 30 °C en la época de maduración producen un descenso del ácido tartárico presente en la uva, debido a que se activa la degradación respiratoria de la misma. Otro factor influyente es la escasez de agua, que si se produce en la época de maduración origina un descenso de los niveles de ácido tartárico debido a que su formación se desarrolla a un menor ritmo que al que se produce su degradación o consumo. En contraposición, un mayor aporte de agua en la época de maduración supondrá un aumento de la cantidad de este ácido en la uva. Otro factor que también influye en la concentración de ácido tartárico es el efecto de la dilución, especialmente valorable según el aumento del grano maduro. Debido a estos factores descritos, los cuales corresponden a los efectos que se observan del cambio climático en España, en conjunto se aprecia un descenso de la acidez total del mosto y del vino final, ya que el ácido tartárico es el responsable de más de la mitad de la acidez total de mostos y vinos, siendo de los ácidos más fuertes existentes en la uva.

1.2.2. Ácido málico

Es el segundo ácido en importancia del mosto y con una influencia notable en la acidez total del vino. Se encuentra en todos los vegetales, apareciendo como metabolito en la fotosíntesis y como eslabón del ciclo de Krebs. Se contemplan tres vías diferentes de formación:

La vía paralela a los azúcares como continuación inmediata a la fotosíntesis, principalmente al comienzo del ciclo vegetativo. A partir de la glucosa, que mediante glicólisis se transforma en ácido pirúvico y se integra en el ciclo Krebs, a través de la acetil-coenzima A. Finalmente, en las raíces por acumulación del ácido cítrico en época invernal, que posteriormente en primavera se transforma en ácido málico, a través del ciclo de Krebs.

Como el ácido tartárico, tiene una vía importante de degradación a través del proceso respiratorio de las células vegetales, mediante la siguiente reacción:



Otra vía de degradación del ácido málico en las uvas es mediante su transformación en azúcar en la maduración, donde las altas temperaturas de maduración condicionan el desarrollo de esta vía.

Hay otras vías de degradación una vez se ha producido el vino. La primera es causada por la acción de levaduras del tipo *Schizosaccharomyces*, que transforman el ácido málico en etanol en un proceso llamado fermentación maloalcohólica. Esta puede ser indeseada en el caso de vinos que intrínsecamente sean de elevada graduación, ya que elevaría aún más el contenido alcohólico del producto final. La segunda vía de degradación del ácido málico es la causada por la acción de distintos géneros de bacterias lácticas que transforman el ácido málico en ácido láctico, existiendo tres teorías sobre las vías de desarrollo: la primera, a través de la acción de la enzima málico-deshidrogenasa; la segunda, a través de la acción de la enzima málica y, la última, a través de la acción de la enzima maloláctica.

Como en el caso del ácido tartárico, el contenido de ácido málico en los mostos está regulado por las vías de formación y degradación. Su concentración en mostos puede oscilar desde 1 g/L a 6 g/L, dependiendo de los factores como variedad, región geográfica, climatología y proceso de maduración. Influye también significativamente en las características organolépticas del vino.

Para este ácido, la influencia de la temperatura en la época de maduración es más significativa que para el ácido tartárico, encontrado un mayor contenido de ácido málico en mostos originarios del norte de España, frente a unos bajos contenidos en mostos originarios del sur. Es también responsable en un gran porcentaje de la acidez total del vino, influyendo en el descenso de esta cuando se desarrollan vías de degradación del ácido málico (fermentaciones maloalcohólica y maloláctica).

1.3. Fermentación maloláctica ^[16]

En el transcurso de la fermentación alcohólica lenta o durante la conservación según las condiciones del medio y la técnica empleada en la vinificación, el vino puede sufrir la fermentación maloláctica, que determina una disminución más o menos intensa de la acidez total. También puede denominarse degradación biológica de la acidez. Esto se debe a que el ácido málico es un ácido más fuerte que el ácido láctico, siendo el pK_a del primero de 3.8, mientras que el del ácido láctico está en 3.2. Se trata, pues, de un proceso fermentativo, con movimiento efervescente del vino por el desprendimiento del anhídrido

carbónico, en forma tal que, a veces, puede llegar a ser confundido con la fermentación alcohólica normal de los azúcares residuales. La acción de las bacterias, cuando se realiza sobre el ácido málico con la consiguiente disminución de la acidez en determinadas condiciones, se traduce en una mejora de la calidad del vino. Las bacterias lácticas son las responsables del proceso, pertenecientes a los dos grandes grupos en que se dividen estos microorganismos: los cocos y los bacilos. En ambos campos hay bacterias homo y heterofermentativas.

1.3.1. Factores que influyen en el proceso de la fermentación maloláctica

La fermentación maloláctica, muchas veces beneficiosa, en ciertos casos es peligrosa y puede llegar a ser contraproducente. De ahí la necesidad de estimular, moderar o impedir la actividad de los microorganismos que ocasionan la degradación biológica de la acidez según la necesidad de la realización de dicha fermentación. Consiguientemente, es indispensable el conocimiento de los factores que directa o indirectamente estimulan o inhiben el proceso.

Hay diferentes factores que influyen en la fermentación maloláctica. La variedad empleada en la elaboración del vino tiene una importancia considerable, sobre todo, por la proporción de ácido málico cuando madura. La fermentación maloláctica es más rápida y completa en el caso de la acidez inicial más baja y, a medida que disminuye el porcentaje de ácido tartárico, la fermentación maloláctica es más fácil.

Otro factor sería la temperatura del vino, ya que desempeña un papel fundamental en el desarrollo del proceso. Los límites extremos pueden fijarse, en términos generales, entre 10 y 30 °C. En cuanto a la temperatura óptima, es variable y depende de los microorganismos que efectúan el proceso, pudiendo situarse entre 20° y 26° C. A medida que la temperatura se acerca al óptimo del desarrollo de la actividad de las bacterias malolácticas presentes, más rápido es el inicio y más completo el proceso. Al descender la temperatura, se paraliza la multiplicación de los microorganismos y con ella el proceso fermentativo.

También influye el pH. Los límites de valores de pH van de 2,9 a 4. En términos generales se puede afirmar que, a medida que el pH es más bajo, la fermentación maloláctica es más pura, pero su comienzo es más difícil y su evolución más lenta; y viceversa, a medida que el valor pH es más elevado, el proceso se inicia antes, la fermentación es más rápida, pero también entraña más peligros.

Cuando se encuentra un contenido de alcohol superior a 13° se crea un ambiente poco favorable a la fermentación maloláctica. Solamente después de 15° los fermentos lácticos resultan con cierta inhibición en su actividad vegetativa. A medida que el vino tiene más alcohol, la fermentación maloláctica se desarrolla con mayor dificultad.

Químicamente, la transformación del ácido málico en ácido láctico monobásico produce una caída del 50 % de la acidez titulable correspondiente al ácido málico. En realidad, la disminución de la acidez total es mayor, porque la desaparición del ácido málico provoca una disminución de la acidez debida al ácido tartárico por precipitación del bitartrato de potasio, debido fundamentalmente a dos causas: la primera es que la fermentación maloláctica se extiende también a las sales del ácido málico. Los malatos, al ser descompuestos, dejan en libertad los cationes que entraban en su constitución, los cuales naturalmente se unen a los ácidos libres y, entre ellos, a los más disociados, cuyo primer lugar lo ocupa el ácido tartárico. Y la segunda es que la presencia del ácido málico en el vino aumenta la solubilidad del bitartrato de potasio; al desaparecer provoca la insolubilización de cierta cantidad del mismo.

1.4. Ácidos de origen fermentativo ^[16]

A través del metabolismo de las levaduras se generan fundamentalmente dos ácidos de interés para este trabajo: el ácido acético y el ácido láctico.

1.4.1. Ácido láctico

El ácido acético tiene dos vías fundamentales de formación: por acción reductora sobre el ácido pirúvico a través de la coenzima NAD, llevada a cabo por levaduras, y por descarboxilación del ácido málico en la fermentación maloláctica previamente desarrollada, llevada a cabo por bacterias. En el proceso llevado a cabo por levaduras se obtiene fundamentalmente el isómero óptico D, mientras que en el llevado a cabo por bacterias se obtiene fundamentalmente el isómero L.

1.4.2. Ácido acético

El ácido acético tiene dos vías metabólicas de producción. La primera por la acción de la coenzima A sobre el ácido pirúvico. Por esta vía se pueden formar pequeñas cantidades de ácido acético, siendo la formación de manera continuada hasta consumirse la mitad de los azúcares, disminuyendo a posteriori, y reduciéndose el ácido acético a etanal y etanol.

También puede formarse ácido acético por disminución del etanal a pH alto, aunque en pequeña proporción en el caso de fermentaciones normales.

Por último, puede formarse mediante una vía no deseable que es la oxidación del etanol debido a las bacterias *Acetobacter*, lo que suele conocerse como picado acético.

1.5. Acidez total o titulable

La acidez total se define como los mililitros de álcali normal necesarios para neutralizar las funciones ácidas libres contenidas en un litro de vino.

Es una medida de la concentración de todos los ácidos presentes en el mosto o vino. Se considera una medida de todos los ácidos libres, es decir, los no neutralizados.

1.6. Validación de un método enzimático de análisis

Un analizador enzimático es un equipo instrumental diseñado para cuantificar analíticamente una sustancia en una muestra, usando una reacción enzimática específica. Está fundamentado en principios bioquímicos y espectrofotométricos y es muy empleado en análisis de alimentos, vinos o suelos. En este estudio va a emplearse un analizador enzimático automático de la marca TDI, el MIURA 200. Este equipo está diseñado específicamente para su uso en vinos y mostos, en los cuales permite determinar analitos como: acetaldehído, ácido acético, cítrico, láctico, málico, tartárico, glicerina, glucónico, glucosa-fructosa, o azúcares totales entre otros. Con los rangos de concentración esperables en vinos y adaptables mediante dilución a rangos más altos de concentración como sería el caso de los azúcares en los mostos.

La validación es un procedimiento esencial para garantizar que los resultados que proporciona un equipo son precisos, confiables y adecuados para el propósito analítico al que está destinado. La validación asegura la idoneidad de un equipo para su uso en un tipo de muestra y en el rango de concentraciones de la aplicación deseada. Permite también detectar la presencia de desviaciones sistemáticas del nuevo método empleando métodos de referencia y otros equipos, pudiendo ajustarse y corregirse antes de su uso rutinario.

La validación de un equipo con un nuevo método frente a un método de referencia implica demostrar que el nuevo método es equivalente en términos de precisión, exactitud y linealidad. En primer lugar, es necesario disponer de muestras y de materiales de referencia

certificados, y asegurarse de que las condiciones experimentales son comparables. Para evaluar la exactitud se comparan los resultados obtenidos por el nuevo método con los valores certificados de los materiales de referencia. La precisión se evalúa realizando ensayos de repetibilidad en el mismo día, entre diferentes días y diferentes analistas para evaluar la reproducibilidad. Es también necesario verificar que el nuevo método presenta una buena correlación con el método de referencia, esto se obtiene al realizar una regresión lineal y su correspondiente coeficiente de correlación R^2 , cuyo valor superior a 0,99 es un indicador de una buena regresión lineal. Los límites de cuantificación y de detección del nuevo método deben ser comparables o mejores a los obtenidos en el método de referencia.

2. OBJETIVOS

Este trabajo combina dos objetivos principales:

- Revalidación de los métodos enzimáticos para la determinación de glucosa+fructosa, ácido málico y ácido acético en vino, tras la adquisición por parte del laboratorio de la Estación Enológica de un nuevo equipo de medida MIURA 200. La Estación Enológica de Rueda cuenta con la acreditación de ENAC bajo la norma UNE-EN-ISO 17025: 2017 para estos métodos de ensayo.
- Obtención del perfil de ácidos carboxílicos y acidez en las diferentes etapas del proceso de vinificación de variedades minoritarias de uva existentes en Castilla y León para evaluar su potencial interés en la producción de vinos tintos de calidad, en un contexto de calentamiento global y pérdida de propiedades organolépticas y acidez del producto vinícola final de variedades actualmente más extendidas como Tempranillo.

Los objetivos específicos del trabajo fueron:

- Evaluar los parámetros técnicos de validación necesarios para garantizar la idoneidad del nuevo analizador automático MIURA 200 para llevar a cabo la determinación de glucosa+fructosa, ácido málico y ácido acético en productos derivados de la uva (vinos y mostos).
- Determinar ácidos carboxílicos y azúcares a lo largo del proceso de vinificación de las variedades de vid minoritarias seleccionadas.
- Investigar, mediante el uso de herramientas quimiométricas multivariantes, las similitudes y diferencias entre variedades en las diferentes etapas del proceso.
- Evaluar la idoneidad de nuevas variedades en función de sus características químicas.

Además, el presente trabajo tiene otros objetivos formativos que son los siguientes:

- Búsqueda bibliográfica.
- Diseño de experimentos.
- Entrenamiento en el tratamiento quimiométrico de datos con herramientas de cálculo como Excel y Statgraphics.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se ha llevado a cabo la revalidación de los métodos analíticos enzimáticos para la determinación de glucosa+fructosa, ácido málico y ácido acético en vinos y mostos, para los que el laboratorio de la Estación Enológica de Rueda está acreditado, tras la introducción en el laboratorio de un nuevo analizador automático MIURA 200. Otros analitos que también se han determinado con este nuevo analizador enzimático (ácido tartárico), para los cuales el laboratorio no está acreditado, no se han tenido en cuenta en los experimentos de validación.

3.1. Reactivos y materiales de referencia

Los reactivos utilizados para los analitos de interés (glucosa+fructosa, ácido málico y ácido acético), vienen en sus correspondientes kits y son de la marca TDI (Barcelona, España). Los materiales de referencia empleados proceden de la Subdirección General de Control de Calidad Alimentaria y Laboratorios Agroalimentarios de la Dirección General de Alimentación. Las muestras certificadas empleadas fueron adquiridas a BIPEA (Bureau Interprofessionnel d'Études Analytiques), organización francesa que ofrece servicios de ensayos interlaboratorio y materiales de referencia para laboratorios de análisis. Otro material de referencia empleado ha sido el Certivin, obtenido de la entidad de certificación francesa del mismo nombre especializada en la cadena de suministro de vinos y productos vitivinícolas. Los patrones de glucosa+fructosa, ácido málico y ácido acético son de la marca PanReac (Barcelona, España), al igual que el cloruro sódico, hidróxido sódico y ácido acético usados en los diferentes procedimientos analíticos.

Todas las disoluciones se prepararon con agua desionizada de muy baja conductividad, obtenida con el sistema de purificación Milli-Q (Millipore, Billerica, MA, USA).

3.2. Preparación de patrones de calibrado

Para realizar la cuantificación de los parámetros de interés se empleó un equipo de análisis enzimático automatizado (MIURA 200, TDI), el cual en primera instancia fue validado frente a otro equipo más antiguo (LISA 3x3, TDI) y que quedó en desuso en favor del primero. Ambos equipos son analizadores enzimáticos automáticos con detectores UV-vis. Estos analizadores constan de varias partes: la zona de introducción de muestras, donde se

colocan volúmenes concretos de cada una de las muestras a analizar; la zona de reactivos, donde se colocan los reactivos específicos necesarios para la cuantificación de cada analito; la zona de inyección, que consta de un brazo robótico articulado que inyecta los volúmenes necesarios de muestra y reactivos en la última parte del equipo, consistente es una cubeta de reacción, en la cual se realiza la mezcla antes nombrada y donde posteriormente se mide por espectrofotometría UV-vis la luz absorbida a la longitud de onda característica para cada analito, relacionándola con la concentración de los patrones de acuerdo a la ley de Lambert-Beer.

Para realizar las mediciones fue necesaria la preparación previa de una recta de calibrado, realizada con patrones conjuntos.

En primer lugar, se preparó la disolución madre para los compuestos a analizar, conteniendo 50 g/l de glucosa+fructosa, 8,925 g/L de ácido acético y 29 g/L de ácido L-málico. Para ello se pesaron 2,50 g de fructosa, 2,50 g de glucosa y 2,90 g de ácido L-Málico en un vaso de precipitados con balanza analítica y se añadieron 850 μ L de ácido acético glacial. Se transfirió la mezcla cuantitativamente a un matraz aforado de 100 mL, enrasando con agua desionizada. A partir de la disolución madre se prepararon los patrones de calibración que se muestran en la Tabla 1, mediante diluciones en una disolución de 9 g/L de NaCl. Estos patrones fueron conservados en nevera a una temperatura de entre 2 y 8°C. La estabilidad de estos patrones fue de 3 meses en estas condiciones.

Tabla 1. Concentraciones de cada analito en los patrones conjuntos

	P1	P2	P3	P4	P5	P6
V. madre (mL)	0,10	1,00	2,00	3,00	4,00	6,00
V. Total (mL)	50	50	50	50	50	50
[G+F] g/L	0,10	1,00	2,00	3,00	4,00	6,00
[Acético] g/L	0,02	0,18	0,36	0,54	0,71	1,07
[L-Málico] g/L	0,06	0,58	1,16	1,74	2,32	3,48

Se midieron dichos patrones en el equipo MIURA 200 y con ellos se realizó una recta de calibrado para cada uno de los tres analitos de interés.

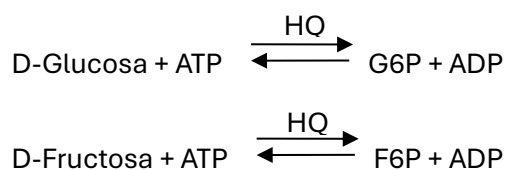
Para efectuar la calibración se realizó una regresión lineal, representándose ΔA frente a la concentración teórica de los patrones, siendo ΔA , la densidad óptica resultante al restar la densidad óptica al finalizar la reacción menos la densidad óptica medida sobre la muestra y el reactivo al principio de la reacción.

Las concentraciones de los analitos en las muestras fueron medidas por interpolación en la respectiva recta de calibrado. Las muestras con turbidez (como los mostos) debieron ser previamente filtradas o centrifugadas. En el caso de muestras con CO_2 , estas debieron ser desgasificadas. Las muestras con una concentración de analito mayor al límite de linealidad fueron diluidas con agua desionizada.

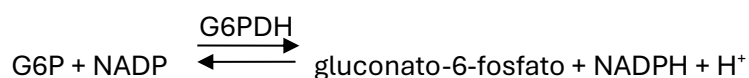
Al tratarse de un método enzimático con detector UV-vis, se desarrollan diversas reacciones enzimáticas para cada uno de los analitos.

3.2.1. Determinación de D-glucosa/D-fructosa por método enzimático UV-vis

Se fosforila la glucosa y la fructosa con adenosín-trifosfato (ATP) mediante una reacción enzimática catalizada por la hexoquinasa (HQ), dando como resultado glucosa-6-fosfato (G6P) y fructosa-6-fosfato (F6P):

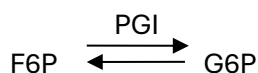


En primera instancia, la glucosa-6-fosfato se oxida a gluconato-6-fosfato mediante la nicotinamida –adenin-dinucleótido-fosfato (NADP) en presencia de la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G6PDH). La cantidad de nicotinamida-adenin-dinucleótido – fosfato reducida (NADPH) que se origina corresponde a la cantidad de glucosa-6-fosfato y, por lo tanto, a la de glucosa.



NADPH se determina por absorción a 340 nm.

Una vez finalizada esta reacción, la fructosa-6-fosfato se transforma en glucosa-6-fosfato por la acción de la fosfoglucosa-isomerasa (PGI).



La glucosa-6-fosfato reacciona nuevamente con NADP para dar gluconato-6-fosfato y NADPH, determinándose esta última a 340 nm.

El incremento de la absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADPH es directamente proporcional a la concentración de la D-glucosa+D-fructosa en la muestra. Esto es porque ambas se encuentran en una estequiometría 1:1, pudiendo obtenerse la concentración de D-glucosa+D-fructosa mediante la ecuación de Lambert-Beer (Ecuación 1), siendo A la absorbancia (adimensional), que es la medida de la cantidad de luz absorbida; ϵ , el coeficiente de extinción molar ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), constante que depende del material absorbente y la longitud de onda; C, que es la concentración de la especie absorbente (mol/L o M); y l, siendo la longitud del camino óptico (cm), distancia que recorre la luz en la muestra, que depende del tamaño de la cubeta.

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l$$

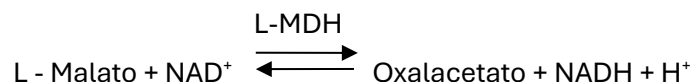
Ecuación 1.

Los reactivos empleados en las reacciones llevadas a cabo fueron un tampón de NADP y ATP y un tampón de hexoquinasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y fosfoglucoisomerasa. Estos debieron ser conservados entre 2-8°C.

La relación entre D-glucosa y D-fructosa en uva madura es de 1, pero este rango puede oscilar entre 0.74 y 1.12 según la variedad de uva, el grado de madurez y las condiciones de fermentación.

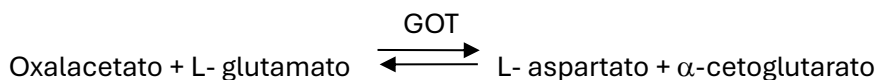
3.2.2. Determinación de ácido L-málico por método enzimático UV-vis

La enzima L-Malato deshidrogenasa (L-MDH) cataliza la oxidación del ácido L-málico a oxalacetato con la reducción concomitante de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD).



El equilibrio de esta reacción tiende hacia el lado del malato. Si se elimina el oxalacetato del medio reactivo, el equilibrio de la reacción se desplaza hacia la derecha.

La anterior reacción de deshidrogenación está acoplada con una reacción de transaminación.



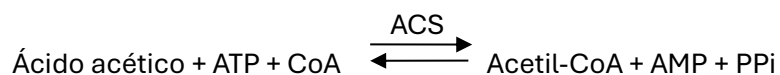
El incremento en la absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADH es directamente proporcional a la concentración del ácido L-málico en la muestra, debido a que la cantidad de NADH formado tiene una estequiometría 1:1 con el L-Malato. Pudiendo obtenerse la concentración final de ácido málico por la Ley de Lambert-Beer mencionada en el apartado 3.2.1.

Los reactivos empleados en las reacciones llevadas a cabo fueron un tampón de L-malato deshidrogenada y GOT (Glutamato Oxalacetato Transaminasa) y un tampón de NAD^+ . Estos debieron ser conservados entre 2-8°C.

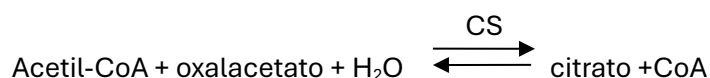
El ácido málico libre y esterificado suele encontrarse en frutas habitualmente. Su abundancia desciende de 8 a 1 g/L en el mosto de la uva conforme avanza el proceso de maduración. Más del 30% del ácido málico puede ser consumido por fermentación. Una fermentación típica en el vino es la conversión del ácido málico a ácido láctico y a CO_2 , llamada fermentación maloláctica. La fermentación maloláctica se puede prevenir por filtración e incrementando la concentración de sulfitos.

3.2.3. Determinación de ácido acético por método enzimático UV-vis

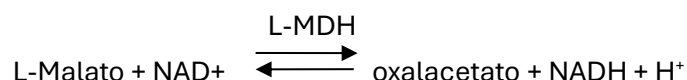
La enzima acetil-CoA sintetasa (ACS) cataliza la reacción del ácido acético con la coenzima A (CoA) en presencia del adenosin-5'-trifosfato (ATP), produciendo actil-CoA.



La citrato sintasa (CS) cataliza la reacción del acetil-CoA y el oxalacetato para formar citrato.



El oxalacetato consumido en esta reacción se forma a partir de ácido málico en presencia de malato deshidrogenasa de la siguiente manera:



El incremento de la concentración de NADH es medido a 340 nm y esto es la base del cálculo de la concentración del ácido acético en la muestra, debido a que la cantidad de NADH formado tiene una estequiometría 1:1 con el ácido acético, pudiendo obtenerse la concentración final de ácido málico por la Ley de Lambert-Beer mencionada en el apartado 3.2.1.

Los reactivos empleados en las reacciones llevadas a cabo fueron un tampón de ácido L-málico, MgCl_2 (R1A), un tampón de citrato sintasa, L-malato deshidrogenasa y acetil-CoA sintetasa (R1B) y un tampón de NAD, ATP y CoA (R2). Estos debieron ser conservados entre 2-8°C. Para la preparación de los reactivos se añadió un vial de R1B en una botella de R1A. Agitar suavemente para evitar la formación de espuma. El reactivo 2 no necesita de tratamiento previo.

El ácido acético es el ácido principal que se forma durante el deterioro del vino; los límites legales varían según la región.

Todas estas reacciones fueron llevadas a cabo en las cubetas de reacción del equipo MIURA 200 para los patrones de calibrado, los materiales de referencia y las muestras investigadas. El inyector automático introdujo los volúmenes de los reactivos necesarios para la determinación de cada analito, esperando el tiempo suficiente como para que transcurra la reacción enzimática en su totalidad antes de realizar la medición con el detector UV-vis.

3.3. Muestras para validación

Para la realización de la validación del equipo se empleó un grupo de muestras numeradas que se analizaron por duplicado, una vez en el equipo ya validado LISA 3x3 y otra en el MIURA 200. El origen de estas muestras permaneció anónimo y fue numerado adecuadamente para este propósito. De forma genérica, estas muestras fueron aportadas por diferentes consejos reguladores, entre ellos el de Rueda, el de Toro y el de Ribera del

Duero. Además, también pueden encontrarse muestras de bodegas particulares y análisis de rutina o de exportación de estas mismas bodegas.

Además de estas muestras, se emplearon varios tipos de materiales de referencia, siendo 01/24 y 01/23 materiales de referencia de vinos blancos y 02/24 y 02/23 materiales de referencia tintos. Por otro lado, se emplearon materiales certificados como CERTIVIN y varios de BIPEA.

El procedimiento fue llevado a cabo por 3 analistas diferentes y se repitió a lo largo de varios días.

Se realizó la calibración tal y como se ha descrito en el punto 3.2. Posteriormente se introdujo cada una de las muestras tanto en el equipo antiguo ya validado (LISA 3x3) como en el nuevo que se pretende validar (MIURA 200). Para la toma de muestra se homogeneizaron previamente los pocillos y posteriormente se llenaron antes de ser introducidos en cada uno de los equipos.

En cada orden de trabajo se realizó un control de repetibilidad. Se midió una de las muestras de cada día por duplicado, una al principio de la jornada y otra al final, siendo identificadas distintivamente con la letra mayúscula A al inicio del código asignado para esa muestra.

3.3.1. Tratamiento de datos para la validación

Los cálculos realizados en la validación de un equipo frente a otro de referencia se basan en el apartado 5.3.3.2.2. de la OIV ^[17].

Una vez obtenidos los resultados de concentración para cada muestra con ambos equipos se calculó la diferencia entre estos. Siendo la diferencia la resta de los valores medidos por el método alternativo, es decir, el MIURA 200 menos los valores medidos por el método de referencia. Las muestras no se introducen replicadas. El equipo inyecta automáticamente en las cubetas para detección con UV-vis y este proceso se repite varias veces. El resultado proporcionado por el instrumento es por tanto la media de dichas medidas replicadas.

Si el valor de esta diferencia es menor o igual al límite de reproducibilidad de cada uno de los analitos, se consideró que los resultados obtenidos por ambos equipos no diferían significativamente. Estos límites fueron calculados según lo indicado en la normativa 2676/90 ^[18].

Se obtuvo la media y desviación típica de las diferencias y, a partir de estos estadísticos, se calculó un Z-score mediante la ecuación 2.

$$Zscore = \frac{|Md|}{Sd}$$

Ecuación 2.

Donde Md es la media de las diferencias y s_d su desviación estándar.

Con los valores obtenidos, tanto con el método de referencia como con el método alternativo, se realizó una representación gráfica en la que se dispusieron los valores obtenidos por el MIURA 200 frente a los obtenidos por el LISA. Este procedimiento se realizó para los tres analitos: glucosa+fuctosa, ácido málico y ácido acético.

Para evaluar la aceptabilidad del nuevo método respecto al método de referencia debe de evaluarse la calidad de la regresión lineal al representarse los valores de concentración de las muestras obtenidas con el nuevo método frente a los valores de concentración de las muestras obtenidas con el método de referencia. Para validar la concordancia entre los resultados de los dos equipos, se emplearon los siguientes criterios y pruebas de significación. En primer lugar, para la pendiente se estableció el siguiente criterio:

$$1 \in b_1 \pm t_{a/2n-2} \cdot s_{b_1}$$

Ecuación 3.

que es equivalente a la siguiente prueba de significación:

$$t_{cal} = \frac{|b_1 - 1|}{s_{b_1}} < t_{crit}(a/2n-2)$$

Ecuación 4.

Por otro lado, para la ordenada se estableció el siguiente criterio:

$$0 \in b_0 \pm t_{a/2n-2} \cdot s_{b_0}$$

Ecuación 5.

Equivalente a la prueba t:

$$t_{cal} = \frac{|b_0 - 0|}{s_{b_0}} < t_{crit}(a/2n-2)$$

Ecuación 6.

3.3.2. Materiales de referencia para la validación

Por otro lado, se analizaron los materiales de referencia blanco y tinto, los BIPEA y el CERTIVIN. El procedimiento fue el mismo que para las muestras descritas anteriormente

en el apartado 3.2. Los materiales de referencia, a diferencia de las muestras comunes, tienen valores reales (diana) que son aportados por la empresa que los comercializa. Además del valor diana también se aporta en la documentación el límite de aceptación, que es el rango dentro del cual tiene que encontrarse la medición realizada por el equipo que se pretende validar. Una vez obtenidos los valores de concentración de los materiales de referencia con el MIURA 200, se representaron estos valores frente a los valores diana certificados. Este procedimiento se realizó para glucosa+fuctosa, ácido málico y ácido acético. Tiene especial interés en la validación de un nuevo método la realización de análisis con materiales de referencia. Esto es porque es un indicador de la veracidad del método, pudiendo compararse los valores obtenidos con los certificados por los materiales de referencia, sabiendo así fácilmente si el método está sesgado.

3.3.3. Muestras de variedades minoritarias

Tras realizar el procedimiento de validación del equipo MIURA 200 se pudo emplear este equipo para el análisis de las muestras de varias fases del proceso de vinificación de variedades minoritarias de uva. Las variedades seleccionadas para este estudio fueron Cenicienta, Mandón y Merenzao. Además, se analizó Tempranillo como referencia.

Este análisis constó de tres partes: la primera en la cual se analizaron los mostos a partir de las uvas de cada una de las variedades de interés, la segunda en la cual se realizó un análisis al final de la fermentación alcohólica de cada una de las variedades, y la tercera en la cual se hizo un análisis final tras el término de la fermentación maloláctica. Las muestras se han etiquetado con un código de letras con tres partes: La primera simboliza la variedad, siendo Cenicienta (C), Merenzao (M), Mandón (Ma) y Tempranillo (T). La segunda, la procedencia, siendo Rueda (R), Bierzo (B), Numanthia (N), Arribes (A) y Zamadueñas (Z). Y la tercera simboliza la etapa del proceso de vinificación, mosto (M), fermentación alcohólica (A) y fermentación maloláctica (ML).

Se realizó un control diario de la linealidad y de la función respuesta del instrumento analítico validado. Para ello, se debían satisfacer ciertas características:

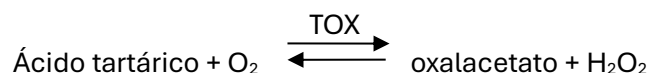
Cumplir la condición $R^2 \geq 0,99$, tener un valor de intercepto comprendido dentro del intervalo de confianza del 95% para cada recta de calibrado y el valor del material de referencia analizado debía estar comprendido dentro del intervalo certificado. Se realizó un control de repetibilidad en cada orden de trabajo; se midió una de las muestras de la orden por duplicado al inicio y final del día, identificándola como “A” seguido del código de la muestra. La diferencia absoluta entre ambas muestras debe ser menor o igual que el límite de

repetibilidad del método. Y se realizaron controles de exactitud en cada orden de trabajo, para ello se cuantificaron materiales de referencia de los listados anteriormente, identificándolos con su respectivo código.

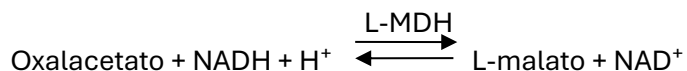
3.3.4. Determinación de ácido tartárico por método enzimático UV-vis

El ácido tartárico no se incluyó en la validación, ya que el laboratorio no estaba acreditado para este analito, y por ello no fue necesario llevar a cabo la revalidación. Para garantizar la exactitud de sus mediciones se midió un material de referencia y se comprobó que el resultado obtenido se encontraba dentro del intervalo de confianza del valor certificado.

La enzima tartárico-oxidasa (TOX) cataliza la conversión del ácido L(+)-tartárico en oxalacetato en presencia de oxígeno.



El oxalacetato generado en esta reacción es reducido a L-malato por acción de la malato deshidrogenasa (MDH) en presencia de NADH:



La disminución en la concentración de NADH es medida a 340 nm y constituye la base del cálculo de la concentración del ácido tartárico en la muestra, ya que la cantidad de NADH consumido presenta una estequiometría 1:1 con el ácido tartárico. Por lo tanto, la concentración final del analito puede calcularse mediante la Ley de Lambert-Beer, como se explica en el apartado 3.2.1.

Los reactivos empleados en las reacciones llevadas a cabo fueron un tampón con enzima tartárico-oxidasa y cofactores (R1A), un vial con malato deshidrogenasa (R1B), y una solución de NADH (R2). Todos ellos fueron suministrados por la marca TDI y debieron conservarse entre 2–8 °C. Para la preparación de los reactivos, se añadió un vial de R1B a una botella de R1A, agitando suavemente para evitar la formación de espuma. El reactivo R2 no requiere tratamiento previo.

El ácido tartárico es uno de los principales ácidos del vino, y su concentración influye en la estabilidad y frescura del producto final.

Todas estas reacciones fueron llevadas a cabo en las cubetas de reacción del equipo MIURA 200 para los patrones de calibrado, los materiales de referencia y las muestras investigadas. El inyector automático introdujo los volúmenes de los reactivos necesarios para la determinación del analito, esperando el tiempo suficiente para que transcurra la reacción enzimática en su totalidad antes de realizar la medición con el detector UV-vis.

3.3.5. Cuantificación de acidez total

Para la cuantificación de la acidez total se empleó un valorador automático de la marca Mettler Toledo. Este equipo consta de un disco de disposición de muestras circular rotatorio, una bureta y un agitador. Se valoró el contenido de ácido con una disolución de NaOH 0,1 M hasta el punto de equivalencia. Para asegurar la precisión de los resultados, antes de empezar las mediciones se comprobó la fiabilidad de los resultados midiendo en primer lugar un patrón de ácido oxálico y posteriormente un material de referencia.

3.3.6. Análisis de mostos

Para el análisis de mostos se tomaron las uvas de cada una de las variedades de estudio, se trituraron y filtraron los hollejos y semillas obteniendo únicamente el mosto. Posteriormente, se centrifugó el mosto en tubos Falcon para eliminar la turbidez. Se retiró el sobrenadante y este jugo final es el que se introdujo en el equipo, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.

Los parámetros que se analizaron fueron ácido málico, ácido tartárico, glucosa+fructosa y acidez total. Todos ellos se analizaron en el analizador enzimático MIURA 200, excepto la acidez total que se analizó con un valorador automático. Para la cuantificación de la acidez total se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.3.5.

3.3.7. Análisis en descube

Una vez obtenidos los mostos de las cuatro variedades de estudio, se fermentaron en depósitos llevando a cabo una fermentación alcohólica. Se llevo a cabo un seguimiento de las muestras con el analizador enzimático MIURA 200, dándose la fermentación alcohólica como finalizada una vez los valores de glucosa+fructosa son muy bajos, rondando los 1-2 g/L.

Los parámetros que se analizaron fueron ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, glucosa+fructosa y acidez total. Todos ellos se analizaron en el analizador enzimático MIURA 200, excepto la acidez total que se analizó con un valorador automático. El procedimiento llevado a cabo para todos los analitos fue el descrito en el apartado 3.2, menos la acidez total que se realizó como fue el descrito en el apartado 3.3.5.

3.3.8. Análisis final

Una vez finalizada la fermentación alcohólica, los vinos obtenidos, al ser todos tintos, se sometieron a una fermentación maloláctica. Durante esta fermentación los niveles de ácido málico fueron reduciéndose, mientras que los niveles de ácido láctico fueron aumentando. Se hizo un seguimiento del progreso hasta que el valor de ácido málico fue inferior al límite de cuantificación del método.

En los tres tipos de productos, los parámetros que se analizaron fueron ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, glucosa+fructosa y acidez total. Todos ellos se analizaron en el analizador enzimático MIURA 200, excepto la acidez total que se analizó con un valorador automático. El procedimiento llevado a cabo para todos los analitos fue el descrito en el apartado 3.2, menos la acidez total que se realizó como fue el descrito en el apartado 3.3.5.

3.4. Tratamiento de datos

3.4.1. Análisis de conglomerados jerárquicos

El análisis de conglomerados jerárquicos es una técnica estadística multivariante no supervisada que permite agrupar muestras u objetos en función de su similitud, sin requerir información previa sobre su clasificación. Su objetivo es construir una jerarquía de agrupamientos que refleje las relaciones estructurales entre los datos, lo cual se representa visualmente mediante un dendrograma. Esta herramienta es especialmente útil para identificar patrones o estructuras latentes en conjuntos de datos multivariantes.

El procedimiento consiste en calcular una matriz de disimilitud entre todas las muestras. En este trabajo se ha empleado la distancia Manhattan, calculada como suma de las diferencias absolutas entre las coordenadas de dos objetos. La distancia Manhattan es menos sensible a valores extremos que otras métricas como la distancia Euclídea.

Una vez establecida la matriz de distancias, se procede a la fusión secuencial de los objetos o grupos más similares, siguiendo un criterio de agrupamiento. Se ha empleado el

método de Ward, que busca minimizar la varianza total dentro de los conglomerados en cada etapa de fusión maximizando la varianza entre grupos. El método de Ward genera grupos compactos y de tamaño relativamente equilibrado, lo que facilita la interpretación de los resultados y mejora la estabilidad del agrupamiento.

El resultado final se representa mediante los dendrogramas de objetos y variables, que muestra las uniones sucesivas entre objetos o variables y conglomerados a diferentes niveles de similitud. Para facilitar la interpretación de los dendrogramas de objetos y variables, es muy útil complementarlos con un mapa de calor, que permite detectar patrones, similitudes o diferencias entre variables y muestras de forma visual. En el mapa de calor se suelen representar los valores estandarizados de las variables, con un código de color que permita identificar fácilmente la abundancia de las variables analizadas en los diferentes agrupamientos de muestras, mostrando simultáneamente qué muestras son similares entre sí y qué variables contribuyen a dicha similitud.

3.4.2. Análisis de componentes principales

El análisis de componentes principales (ACP) constituye una técnica estadística multivariante ampliamente utilizada para identificar patrones de asociación entre variables y muestras en matrices de datos de alta dimensionalidad (n variables $\times$ m objetos). Su fundamento radica en la transformación de un conjunto de variables originales, generalmente correlacionadas y con igual contribución a la varianza total, en un nuevo conjunto de variables ortogonales no correlacionadas, denominadas componentes principales (PC, por sus siglas en inglés). Estas nuevas variables son combinaciones lineales de las variables originales.

El primer componente principal (PC1) captura la mayor proporción de la varianza total presente en la matriz de datos y suele estar asociado con un gran número de variables. El segundo componente (PC2) explica una porción adicional de la varianza, no recogida por PC1, y se relaciona con variables que presentan una correlación débil con el primer componente. Este proceso continúa de forma secuencial hasta obtener tantos componentes como variables originales. No obstante, en la práctica solo se retienen aquellos componentes que explican una varianza superior a la de una variable individual (cuyo valor propio es mayor a 1), lo que permite reducir la dimensionalidad del sistema sin pérdida significativa de información.

Desde el punto de vista matemático, el ACP implica la diagonalización de la matriz de covarianza (o de la matriz de correlación, en caso de que las variables hayan sido previamente normalizadas). La relación entre los componentes principales y las variables originales se expresa mediante las denominadas cargas factoriales (loadings), mientras que las proyecciones de las muestras sobre los nuevos ejes se conocen como puntuaciones (scores). Los valores propios (eigenvalues) asociados a cada componente principal cuantifican la varianza explicada por dicho componente, es decir, la proporción de información contenida en la matriz original que logra ser representada.

En este contexto, variables o muestras que presentan valores similares en la matriz original tienden a mostrar cargas o puntuaciones semejantes en los componentes principales. Por tanto, la representación conjunta de los componentes más relevantes (aquellos que explican la mayor parte de la varianza) permite revelar estructuras latentes, asociaciones o correlaciones entre variables y/o muestras, que podrían pasar desapercibidas mediante una inspección directa de los datos originales.

El análisis multivariante de datos se llevó a cabo con el software estadístico Statgraphics 19. El mapa de calor se obtuvo con Matlab R2024b.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de las rectas de calibrado

Se muestran a continuación las rectas de calibrado obtenidas con el método enzimático empleado para glucosa+fructosa, ácido málico y ácido acético.

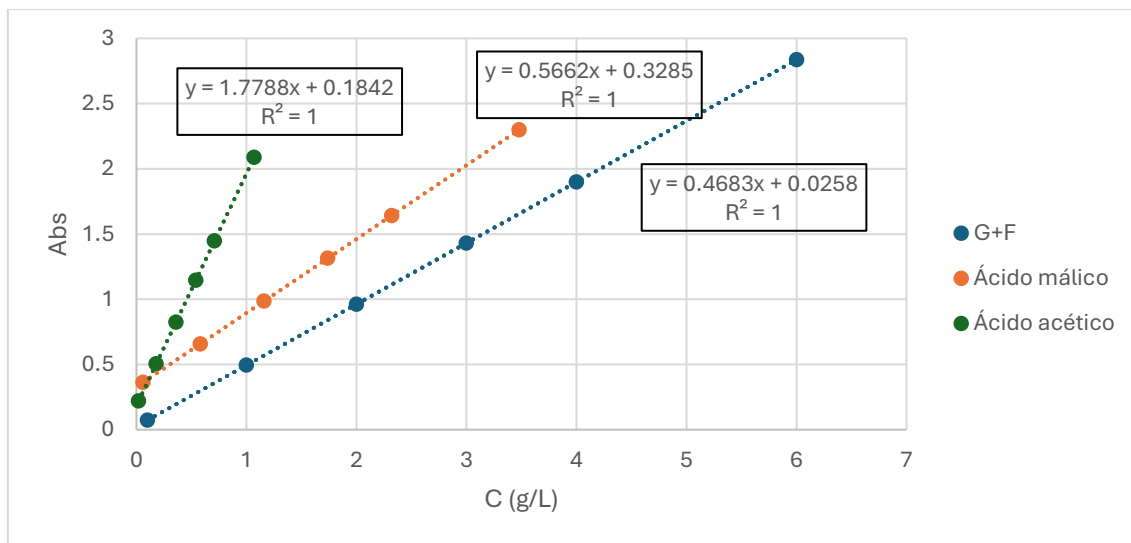


Figura 3. Recta de calibrado de glucosa+fructosa, ácido málico y ácido acético.

Tabla 2. Parámetros de validación derivados de las rectas de calibrado.

Analito	Uds.	G+F	Ácido málico	Ácido acético
R^2		0,9999	0,9999	0,9999
Rango lineal	g/L	0,1 - 6	0,06 - 3,48	0,02 - 1,07
Sensibilidad	UA·L/g	0,4683	0,5662	1,7788
b_0 (con IC)	UA	$0.026 \pm 0,041$	$0,333 \pm 0,061$	$0,184 \pm 0,057$
b_1 (con IC)	UA·L/g	$0,468 \pm 0,032$	$0,566 \pm 0,049$	$1,779 \pm 0,042$
LOD	g/L	0,03	0,018	0,006
LOQ	g/L	0,1	0,06	0,02

El límite de cuantificación, LOQ, es suficiente para los contenidos a determinar en vinos, ya que cuantifica para contenidos inferiores a 4 g/L de glucosa+fructosa, los cuales se dan

en vinos secos, y el valor de LOQ de ácido acético permite detectar desviaciones fermentativas con suficiente antelación. Con el LOQ del ácido málico es posible cuantificar una vez terminada la fermentación maloláctica. La linealidad de las rectas de calibrado es muy buena, explicando la regresión el 99,99 % de la varianza de los datos.

En el caso de las rectas de calibrado para ácido málico y ácido acético, el intervalo de confianza de la ordenada no incluye a 0, pero el valor de la ordenada está dentro de los intervalos previstos por el laboratorio en su protocolo de validación, por lo que fueron considerados aceptables. Los intervalos de aceptación para la ordenada se muestran en la Tabla 3. Dichos intervalos recibieron el visto bueno de ENAC tras la auditoría más reciente.

Tabla 3. Intervalos de aceptación para la ordenada del método enzimático acreditado

Analito	Uds	Valor mínimo de la ordenada	Valor máximo de la ordenada
G+F	g/L	-0,05994	0,05137
Ácido málico	g/L	0,27904	0,40741
Ácido acético	g/L	0,13653	0,26998

Para evaluar el nuevo analizador enzimático MIURA 200 en comparación con el antiguo LISA 3x3, se compararon los rangos lineales y la sensibilidad frente a los tres analitos (Tabla 4).

Tabla 4. Comparativa de rangos lineales y sensibilidades del método de referencia y del método alternativo.

Parámetro	Uds	Analizador	G+F	Ácido málico	Ácido acético
Rango lineal	g/L	MIURA 200	0,1 - 6	0,06 - 3,48	0,02 - 1,07
		LISA 3x3	0,1 - 4	0,09 - 3,5	0,085 - 1,05
Sensibilidad	UA·L/g	MIURA 200	0,4683	0,5662	1,7788
		LISA 3x3	0,4319	0,5177	1,3608

Se comprueba que con el nuevo equipo MIURA 200 se ha obtenido tanto una mejora de los rangos lineales como de la sensibilidad. Es interesante el aumento del rango lineal de la recta de glucosa+fructosa para poder analizar muestras con mayor contenido en azúcares sin tener que recurrir a dilución. Por otro lado, es interesante la disminución del límite de cuantificación de ácido acético ya que habitualmente se obtienen valores muy bajos de

este componente en los vinos. La disminución observada en el límite de cuantificación del ácido málico también es adecuada para los proyectos de investigación ya que permite afinar más el punto de finalización de la fermentación maloláctica. La sensibilidad ha mejorado para todos los analitos con el nuevo equipo, de manera más notable en el ácido acético.

4.2. Resultados de la validación

Para poder garantizar que entre el método nuevo y el método de referencia no hay diferencias significativas en la exactitud, se debe obtener un valor de Z-score inferior a 2 (valor crítico para un nivel de confianza del 95%). El estudio se realizó según los parámetros descritos en el apartado 3.3.1.

4.2.1. Validación del nuevo método frente al método de referencia

Las Figuras 6, 7 y 8 muestran la correlación entre los resultados del nuevo equipo MIURA 200 y el equipo de referencia LISA 3x3 para los tres compuestos analizados (G+F, ácido málico y ácido acético) en diferentes muestras.

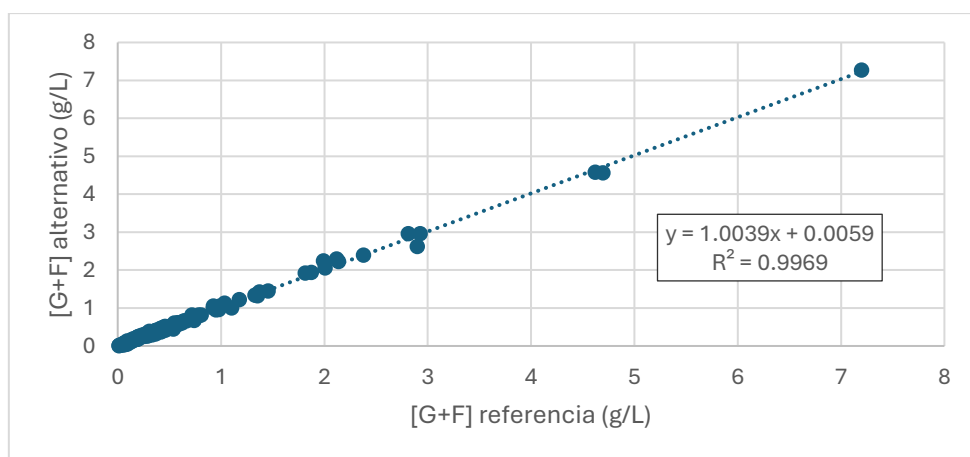


Figura 6. Representación de las concentraciones de glucosa+fructosa obtenidas por el método alternativo frente a los del método de referencia.

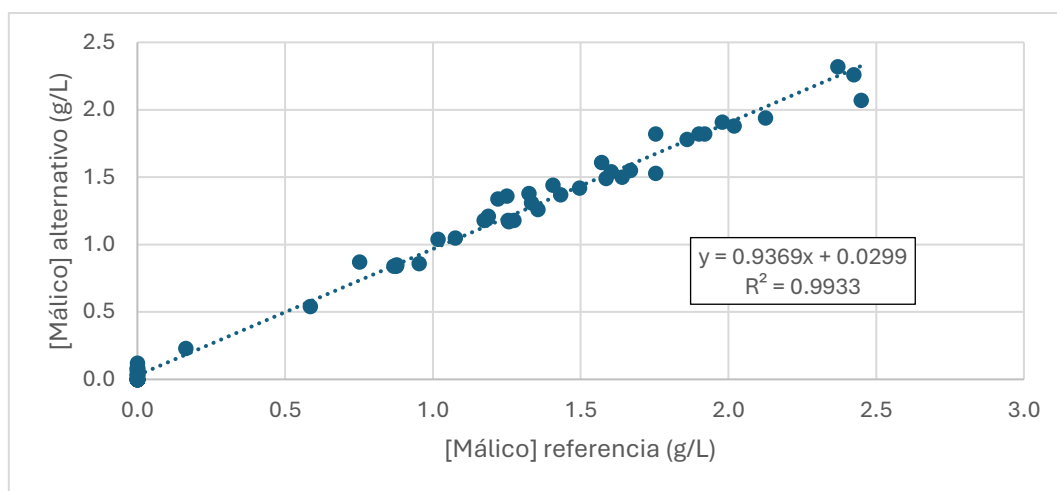


Figura 7. Representación de las concentraciones de ácido málico obtenidas por el método alternativo frente a los del método de referencia.

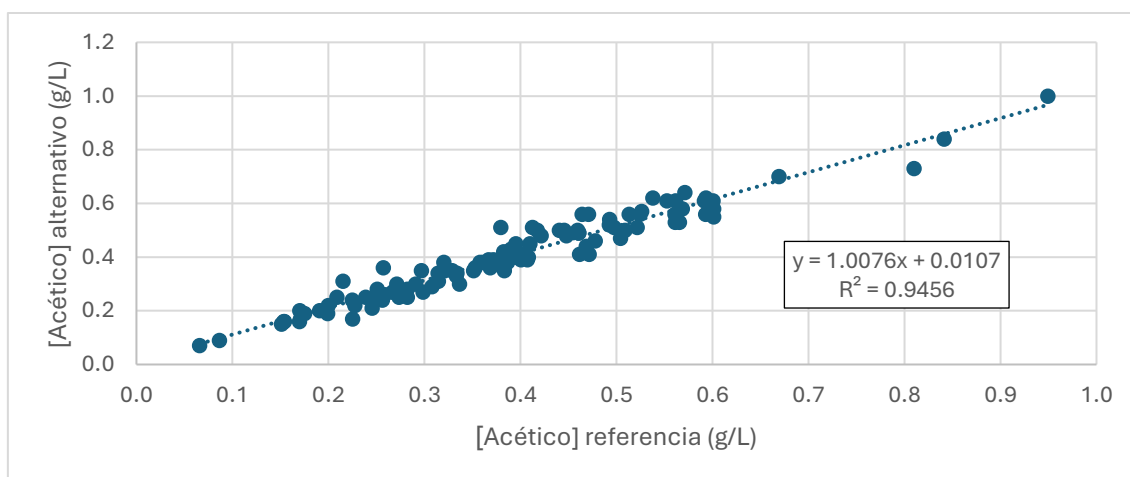


Figura 8. Representación de las concentraciones de ácido acético obtenidas por el método alternativo frente a los del método de referencia.

Los métodos son comparables, es decir, proporcionan resultados que no difieren significativamente, si podemos mantener la hipótesis nula de que la ordenada y la pendiente de las rectas de regresión anteriores no difieren significativamente de 0 y 1, respectivamente, esto es, que el intervalo de confianza de ordenada y pendiente contienen el 0 y el 1, respectivamente, como se indicó en las ecuaciones 3, 4, 5 y 6. La Tabla 5 recoge los intervalos de confianza de las ordenadas y pendientes para los tres analitos y una indicación de si se mantiene o rechaza la hipótesis nula. También muestra los valores Z-score obtenidos en cada caso empleando la ecuación 2.

Tabla 5. Comparación de equipos.

Comparación equipos	G+F	Ácido málico	Ácido acético
$b_0 \pm ts_{b_0}$	$0,0059 \pm 0,0125$	$0,0299 \pm 0,0175$	$0,0107 \pm 0,0455$
$b_1 \pm ts_{b_1}$	$1,0039 \pm 0,0102$	$0,9369 \pm 0,0169$	$1,0076 \pm 0,0189$
Hipótesis nula, H0	Mantener	Rechazar	Mantener
R ²	0,9969	0,9933	0,9456
Z-score	0,15	0,15	0,37

En el caso de las variables G+F y ácido acético, los intervalos de confianza de ordenada y pendiente incluyen al valor esperado de 0 y 1, respectivamente, por lo que se puede concluir que no hay diferencias significativas entre los resultados de ambos analizadores para estos compuestos. Para el ácido málico, por el contrario, ambos parámetros difieren significativamente de los valores esperados si fuesen comparables los dos instrumentos, siendo la pendiente significativamente menor que 1, lo que indica que el analizador MIURA 200 dio resultados más bajos de ácido málico. No obstante, el valor Z-score inferior a 2 indica que no hay diferencias significativas entre los resultados proporcionados por ambos equipos para ninguno de los tres analitos, por lo que los resultados aportados por el MIURA 200 fueron considerados exactos y fiables también para ácido málico. Así lo valoró también ENAC en la última auditoría externa.

La regresión entre los resultados de ambos equipos fue buena (>0.99) para G+F y ácido málico, pero se observó peor correlación en el caso del ácido acético. Este peor ajuste lineal puede deberse a que el ácido acético se evapora de las muestras con relativa facilidad, por lo que una ligera variación de los tiempos de análisis entre un equipo y otro puede ser la causa de estas diferencias que, por otro lado, tampoco son suficientes como para que sean significativas a la hora de validar el nuevo método.

4.2.2. Validación del nuevo método con materiales de referencia

Las Figuras 9, 10 y 11 muestran la relación entre las concentraciones de G+F, ácido málico y ácido acético medidas con el nuevo analizador enzimático en las muestras certificadas, frente a dichos valores certificados o diana. Los parámetros de la regresión y sus intervalos de confianza se resumen en la Tabla 6, así como el Z-score, calculado como ya se ha explicado.

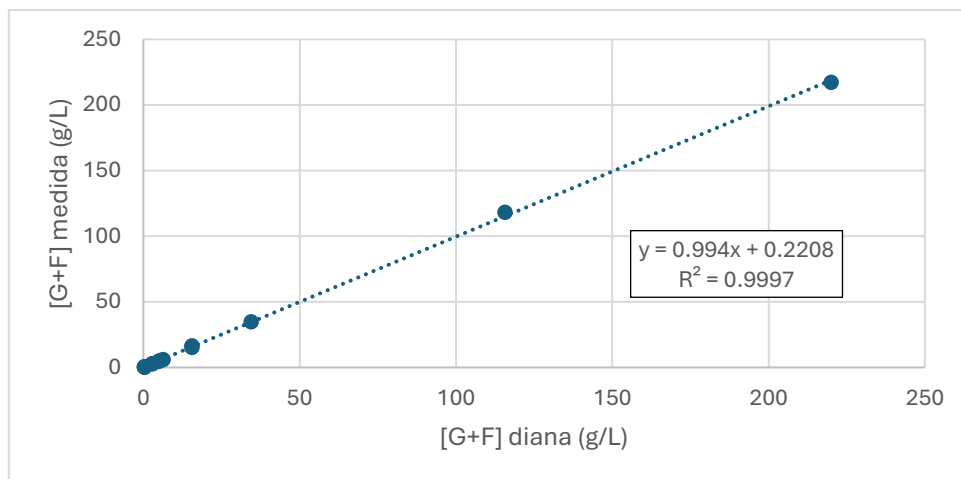


Figura 9. Representación de las concentraciones de glucosa+fructosa obtenidas por el método alternativo frente a los valores diana.

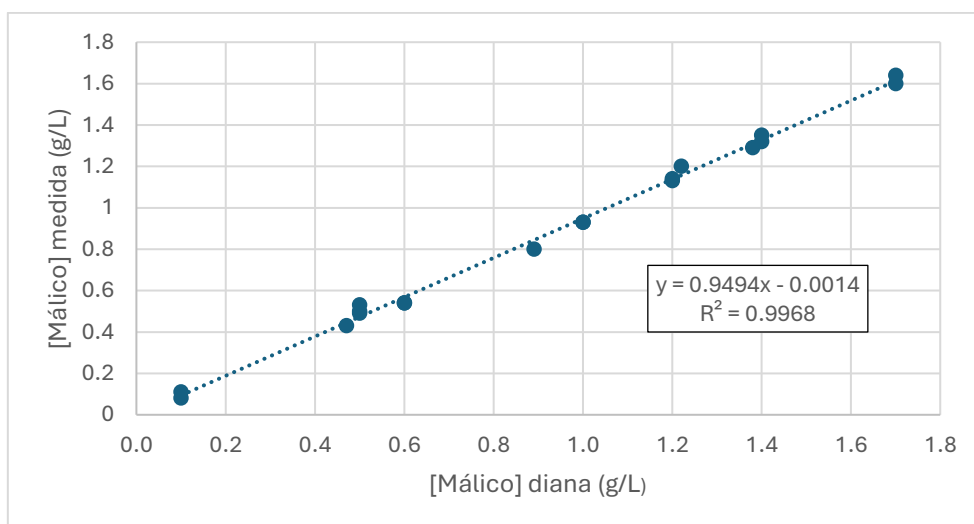


Figura 10. Representación de las concentraciones de ácido málico obtenidas por el método alternativo frente a los valores diana.

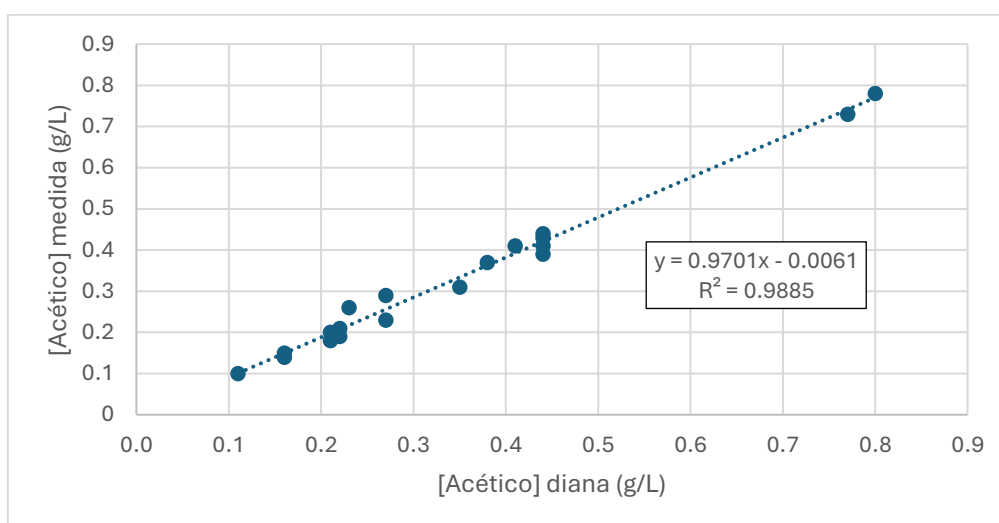


Figura 11. Representación de las concentraciones de ácido acético obtenidas por el método alternativo frente a los valores diana.

Tabla 6. Comparación resultados del MIURA 200 y los materiales de referencia.

Comparación MR	G+F	Ácido málico	Ácido acético
$b_0 \pm ts_{b_0}$	0,2208 $\pm$ 0,5787	-0,0014 $\pm$ 0,0285	-0,0061 $\pm$ 0,0209
$b_1 \pm ts_{b_1}$	0,9940 $\pm$ 0,0092	0,9494 $\pm$ 0,0175	0,9701 $\pm$ 0,0536
Hipótesis nula	Mantener	Rechazar	Mantener
R ²	0,9997	0,9968	0,9885
Z-score	0,06	1,31	0,79

Como ocurrió en la comparación del analizador nuevo con el antiguo, se acepta la hipótesis nula de que las concentraciones medidas no difieren de las esperadas para G+F y ácido acético, al estar los valores 0 y 1 de ordenada y pendiente dentro de los respectivos intervalos de confianza. En el caso del ácido málico, se observa que la ordenada no difiere de 0, pero la pendiente es de nuevo significativamente inferior a 1, indicando un sesgo negativo para este compuesto. El valor Z-score, por el contrario, fue inferior a 2 en todos los casos, por lo que se decidió que el analizador enzimático MIURA 200 incorporado al laboratorio no introduce sesgos significativos en los resultados para ninguno de los analitos de interés.

La regresión entre los resultados medidos y esperados fue buena (>0.99) para G+F y ácido málico, y ligeramente inferior en el caso del ácido acético. La justificación de esta menor regresión puede ser la misma que la descrita en el apartado 4.2.1.

A pesar de los resultados decepcionantes en la revalidación del método enzimático para ácido málico, con lo desarrollado en el apartado 4.2.1, y ya que la recta de calibrado cumple los parámetros de calibración establecidos por el laboratorio y ha pasado la acreditación, no se puede concluir que los resultados de ácido málico obtenidos con el equipo MIURA 200 no sean fiables.

4.3. Análisis de las muestras de vino de variedades minoritarias

Los resultados obtenidos para las muestras analizadas de las variedades de uva investigadas no se muestran en este trabajo abiertamente por cuestiones de confidencialidad. Se muestran únicamente los resultados del análisis quimiométrico multivariante y las conclusiones extraídas.

4.3.1. Análisis de conglomerados jerárquicos

Se realizó un gráfico de conglomerados para las variables y para las observaciones. Se utilizó en ambos casos el método de conglomeración de Ward y con métrica de distancia Manhattan. Los dendrogramas obtenidos se complementaron con un mapa de calor para facilitar la interpretación de los resultados. El gráfico resultante se muestra en la Figura 12.

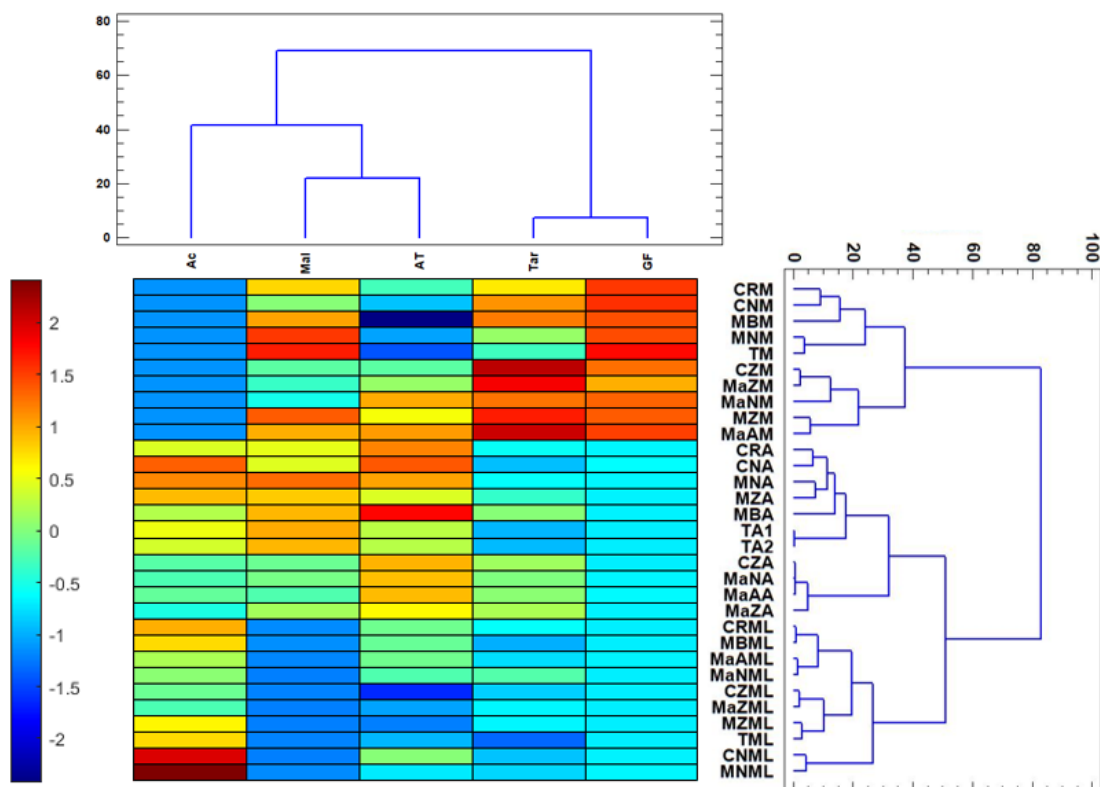


Figura 12. Mapa de calor y dendrogramas de los resultados analíticos normalizados.

El dendrograma superior agrupa las variables químicas, las cuales son ácido acético (Ac), ácido málico (Mal), acidez total (AT), ácido tartárico (Tar) y glucosa+fructosa (G+F). El dendrograma lateral agrupa las muestras, etiquetadas atendiendo a variedad, origen y fase del proceso de vinificación, como se indicó en la sección 3.3.3. Dentro de estos dendrogramas se pueden observar las relaciones entre las diferentes variables y muestras.

En el dendrograma superior, una mayor proximidad entre las variables denota mayor correlación. En primer lugar, el ácido tartárico (Tar) y la glucosa+fructosa (GF) están muy estrechamente relacionados, esto indica que ambos compuestos tienen un comportamiento muy parecido en las muestras, ya que están presentes en los mostos y disminuyen después. La acidez total (AT) se relaciona con el ácido málico (Mal), ya que conforme avanzan las etapas fermentativas, ambos van disminuyendo. Para finalizar, el

ácido acético (Ac) tiene el comportamiento más alejado ya que al avanzar en el proceso de vinificación el ácido acético aumenta, aunque sus valores nunca sean elevados.

En resumen, según este dendrograma puede observarse cómo las variables químicas se agrupan en función de su papel en las distintas etapas de la fermentación. Siendo las variables AT, GF y Tar propias del mosto; Mal un marcador intermedio y Ac un marcador tardío.

En el dendrograma lateral se agrupan las muestras en función de la similitud química global. Se observan claramente tres grupos diferenciados, dos de los cuales están más estrechamente relacionados, que corresponden a la fermentación alcohólica y a la fermentación maloláctica, frente al primer grupo aislado que corresponde a los mostos.

Estos dos dendrogramas se relacionan entre sí a través del mapa de calor de la Figura 12. Los valores representados en el mapa de calor son las concentraciones normalizadas de las variables analizadas. Según se indica en la escala de color lateral, los valores rojos corresponden a concentraciones superiores a la media, siendo la concentración tanto mayor cuanto más intenso es el tono. De forma análoga, los valores que se encuentren por debajo de la media están representados con color azul, cuya intensidad aumenta al disminuir el contenido de analito.

Según esto, puede observarse la evolución del proceso fermentativo. El grupo de los mostos (letra M final en el código de muestra) posee un alto contenido en glucosa+fructosa y ácido tartárico y, según la variedad, mayor contenido en ácido málico, con nada de ácido acético y relativamente poca acidez total respecto a los valores tan elevados de glucosa+fructosa. El siguiente grupo engloba mayoritariamente a las muestras obtenidas tras la fermentación alcohólica (sigla A final). Se caracteriza por una gran disminución de G+F, con un consiguiente aumento de la acidez total del vino, pudiendo observarse concentraciones más moderadas del ácido málico y bajas de ácido tartárico. El grupo inferior corresponde a las muestras de la fermentación maloláctica, en la cual se observa la pérdida de ácido málico casi en su totalidad, por transformación de este en ácido láctico, y la disminución consecuente de acidez total, pudiendo encontrarse en algunas muestras aisladas valores algo más altos de ácido acético, por causas diversas.

Es de especial interés la conservación de la acidez que presenta la variedad Mandón. Se observan unos elevados valores de ácido tartárico en un inicio, mucho mayores en relación a los de ácido málico. Esto adquiere una gran importancia en la problemática del cambio climático, ya que es necesario encontrar variedades que conserven adecuadamente la

acidez y que esta acidez no se deba principalmente al ácido málico ya que, una vez se realice la fermentación maloláctica, esta se puede perder casi por completo ^[19]. En el caso de Mandón, estos niveles adecuados de acidez, muy superiores a los obtenidos por la variedad Tempranillo, son debidos a que es una variedad de ciclo largo. Esto hace que el cambio climático acorte sus ciclos de maduración, pasando de ser demasiado largos a poder terminar a realizar la vendimia con unos parámetros óptimos. Tal y como se ha observado, es una variedad muy robusta, cuyas características químicas no se ven apenas afectadas por las características edafoclimáticas. La variedad Cenicienta presenta unas condiciones más próximas a las del Tempranillo, acidez moderada pero más elevada que este y una relación tartárico/málico menor que Mandón, pero significativamente mejor que la del Tempranillo. Esto la convierte también en una buena candidata para ser empleada en el futuro para hacer frente a las consecuencias del cambio climático en los vinos. Estas características intermedias, pero mejoradas, se deben a que se trata de una variedad de ciclo de duración media-larga. Para terminar, la variedad Merenzao presenta una relación tartárico/málico muy similar a la obtenida en Tempranillo. Esto no supone apenas mejora en cuanto a la calidad de las propiedades organolépticas del vino final de cara a la problemática descrita. Se trata además de una variedad cuya maduración es muy rápida, su ciclo es muy corto y requiere de una vendimia muy apresurada para no comprometer la calidad de la uva. En este caso, la variedad Merenzao no es adecuada para implementarse en esta problemática, ya que se enfrenta a los mismos peligros que la variedad Tempranillo, teniendo además otros problemas como sería el ya mencionado carácter explosivo de su maduración. Teniendo todo esto en cuenta, también pueden considerarse de interés las variedades Mandón y Cenicienta no solo para su comercialización aislada sino también para la realización de un coupage o una co-vinificación ya que, según se ha encontrado en ciertos estudios, realizando una mezcla de diferentes variedades de uvas a la hora de realizar el proceso de vinificación se obtienen perfiles químicos más complejos que en el caso de los vinos monovarietales o que son sometidos a la técnica de coupage, en la que se mezclan dos vinos diferentes ya terminados ^[20].

4.3.2. Análisis de componentes principales

Se hizo el test de Bartlett y se obtuvo un p-valor inferior a 0,05, que demuestra que hay correlaciones entre las variables y es por tanto posible la factorización y reducción de dimensiones para poder visualizar de forma sencilla, en gráficos bidimensionales, las

similitudes y diferencias entre las muestras y su relación con las variables analizadas. La factorización se llevó a cabo empleando el método de componentes principales (PCA). La tabla 7 muestra el valor propio y porcentaje de varianza explicada por los nuevos factores o componentes principales.

Tabla 7. Valores propios, varianza explicada y varianza acumulada por los componentes principales obtenidos por PCA

PC	Eigenvalor	Porcentaje de Varianza	Porcentaje Acumulado
1	2.826	56.52	56.52
2	1.200	23.99	80.51
3	0.656	13.13	93.63
4	0.225	4.51	98.14
5	0.093	1.86	100

Los dos primeros PCs explican más varianza que una variable original (valor propio mayor que 1), y explican conjuntamente el 80.5% de la varianza total de los datos. Por ello, se realizaron los posteriores estudios gráficos teniendo en cuenta solamente estos dos factores. Se obtuvieron el gráfico de cargas o loadings (Figura 13), que contiene los coeficientes que relacionan las variables originales con los nuevos PCs, y el gráfico de puntuaciones o scores (Figura 14), que muestra los valores que toman las muestras en los nuevos factores.

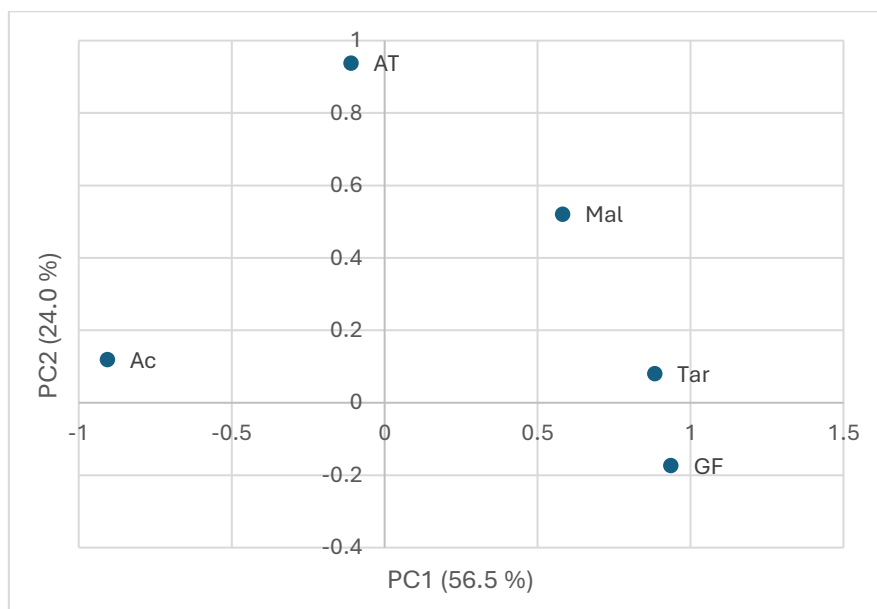


Figura 13. Gráfico de cargas del PCA.

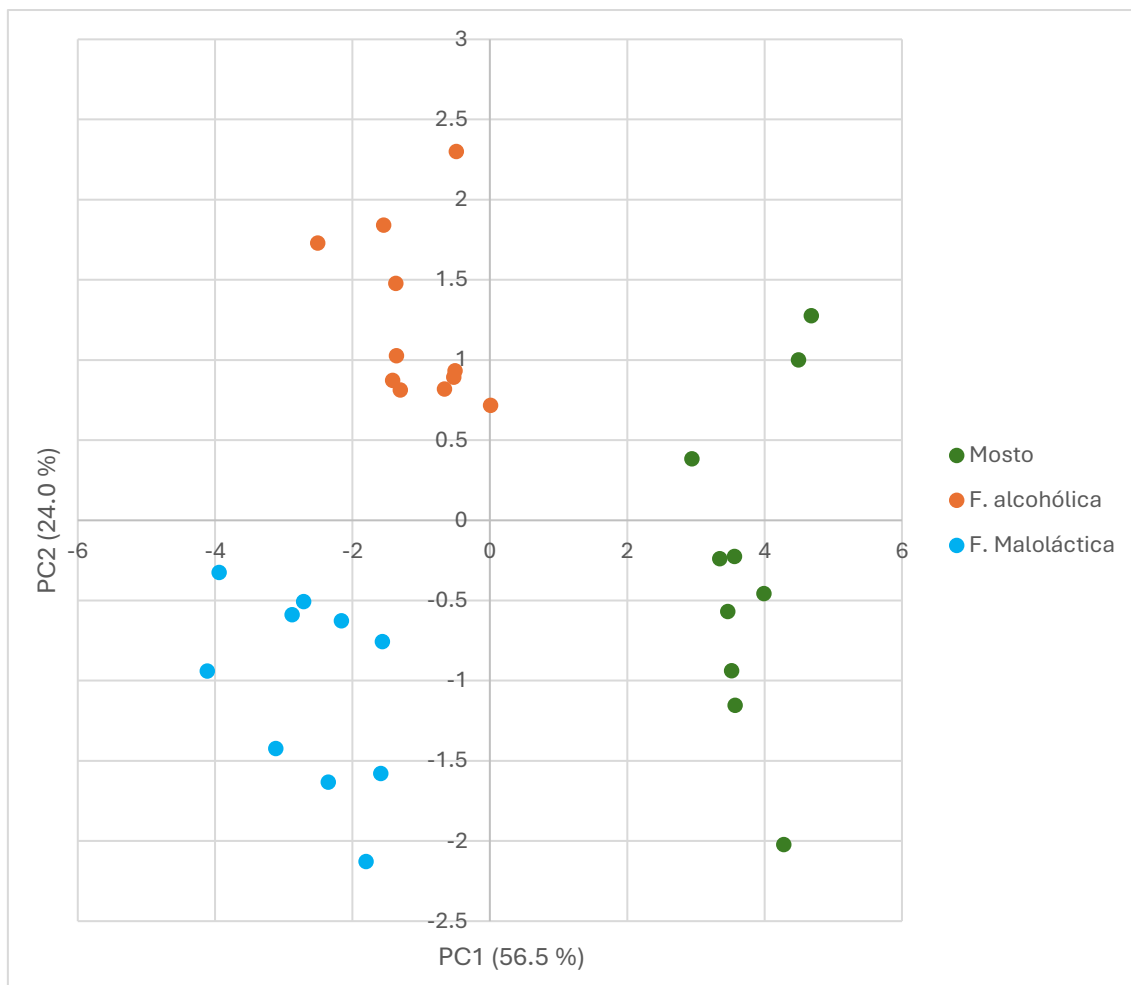


Figura 14. Gráfico de scores del PCA según etapa del proceso de vinificación

El gráfico de scores representa cómo se agrupan las muestras en función de los dos primeros componentes principales, PC1 y PC2, que explican el 56.5% y 24.0% de la variabilidad, respectivamente. Se observa cómo se forman 3 grupos claramente diferenciados según el estado del proceso de vinificación. El grupo de los mostos se ubica en la zona del gráfico con valores positivos de PC1 (cuadrantes derechos superior e inferior). Esto indica que el mosto tiene características químicas distintas a las etapas fermentativas. Analizándolo conjuntamente con el gráfico de cargas, se puede ver la relación más estrecha con altos valores de glucosa+fructosa y ácido tartárico, ya que el mosto es rico en azúcares y ciertos ácidos antes de realizar las fermentaciones. El grupo de la fermentación alcohólica se ubica en la parte superior izquierda con valores negativos del PC1 y positivos del PC2. Se observa una representación de una etapa intermedia, en la que ya se ha producido una gran conversión de azúcares, pero aún hay presencia de ácidos como el ácido acético y el ácido málico. Finalmente, el grupo de la fermentación

maloláctica se encuentra en el cuadrante inferior izquierdo, negativo para ambos componentes. En este caso destaca la gran pérdida de ácidos que se encontraban más presentes en las etapas previas del proceso. Se encuentra en la región donde se sitúa el ácido acético en el gráfico de cargas, pero no significa necesariamente que la concentración de acético sea muy elevada, aunque sí puede ser superior al resto de etapas o bien que la concentración de otros parámetros sea mucho menor que en las fases previas y esto suponga una diferenciación clara. Esto es así ya que en esta etapa el ácido málico se transforma en láctico, perdiendo también acidez total al ser este último un ácido menos fuerte que el málico. Según todo esto, se puede concluir que el PC1 está asociado principalmente a la disminución del contenido de glucosa+fructosa y de ácido tartárico, mientras que el PC2 refleja la evolución de los demás ácidos.

Para ahondar más en la caracterización de las variedades investigadas, el gráfico de scores se ha etiquetado según la variedad y procedencia de la uva, como se muestra en la Figura 15, a fin de estudiar la posible predominancia del varietal o de las condiciones edafoclimáticas para la obtención de características químicas similares.

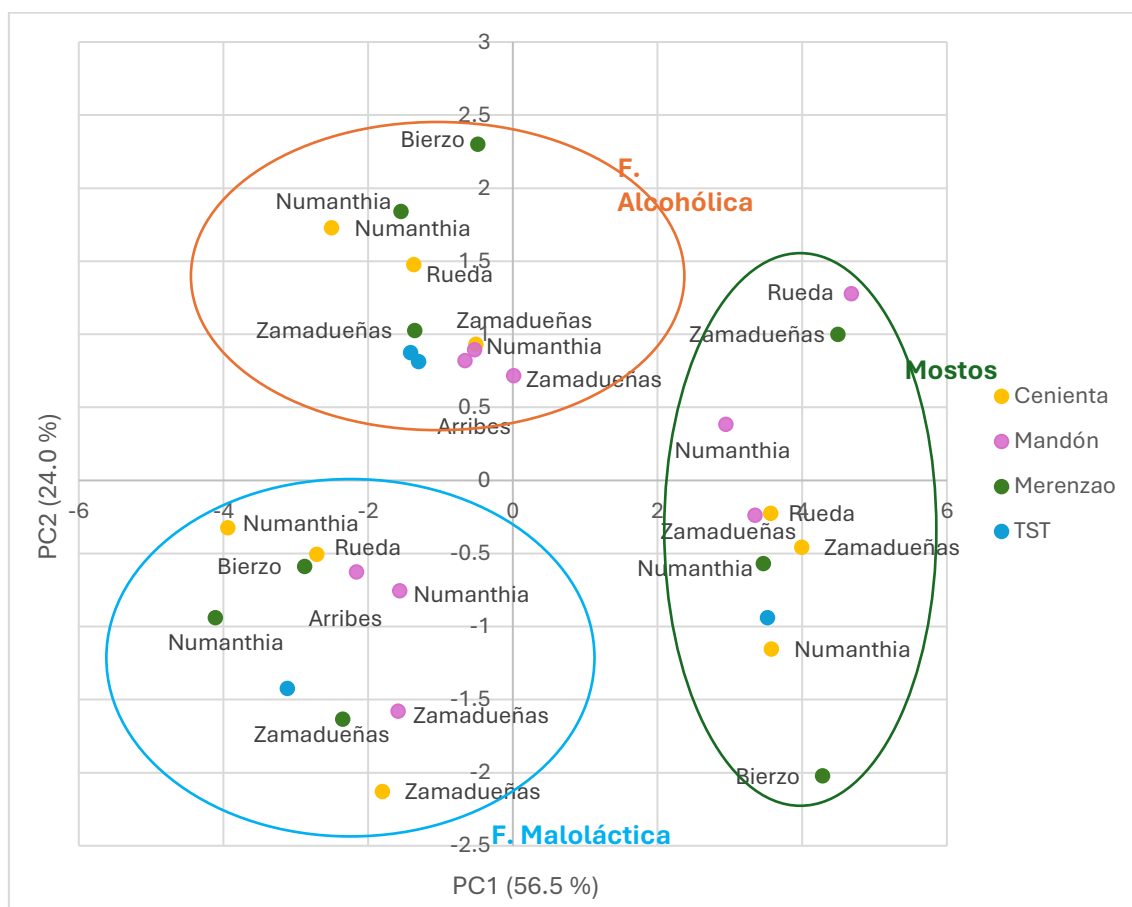


Figura 15. Gráfico de scores del PCA según la variedad de uva y procedencia.

En general, los vinos de la variedad Mandón presentan mayor homogeneidad de características químicas, independientemente del terreno en el que sea plantada la vid. Esta fuerte semejanza entre los perfiles de Mandón de diferentes procedencias no es tan acusada en Cenicienta o Merenzao. Por otro lado, se observa cómo las variedades plantadas en Zamadueñas presentaban características diferenciadas respecto a las del mismo varietal, pero cultivado en otros terrenos. Es decir, el clima y suelo de Zamadueñas tiene una gran influencia en el vino por la diferenciación de las condiciones edafoclimáticas. Se observa también cierta correlación al final de la fermentación maloláctica entre los vinos cuyas uvas fueron cultivadas en Rueda, Arribes, el Bierzo y Numanthia. Esto una vez más puede deberse a que, a diferencia de Zamadueñas, cuyo suelo presenta un pH más básico, Bierzo y Numanthia presentan un pH más bajo. Otro factor determinante es el clima, ya que a pesar de que el terreno de Rueda presenta un pH ligeramente más alto que los dos anteriores, las condiciones climáticas en Rueda y Arribes son muy semejantes y esto puede repercutir en las características químicas del producto.

5. CONCLUSIONES

Se ha validado el nuevo analizador MIURA 200 para la determinación de glucosa+fructosa, ácido málico y ácido acético en vinos, frente al analizador de referencia LISA 3x3. Ambos, combinan un método enzimático con detección por espectrofotometría UV-vis. Se han estimado diversos parámetros estadísticos para asegurar la precisión, exactitud, reproducibilidad y linealidad del nuevo instrumento.

Tras el análisis de las variedades minoritarias de interés, que fueron Merenzao, Cenicienta y Mandón, siendo la variedad de referencia Tempranillo, se ha podido estudiar su idoneidad en un contexto de calentamiento global y detrimento de la acidez y distintas propiedades organolépticas del vino. Según lo obtenido en este estudio, se ha determinado que Cenicienta y Mandón son variedades con parámetros químicos con mucho interés en lo relativo a esta problemática y que podrían introducirse en el mercado como variedades de calidad alternativas al Tempranillo, más vulnerable. Por otro lado, Merenzao no es significativamente mejor que la uva Tempranillo debido a su ciclo de maduración corto. Además, se ha puesto de manifiesto la importancia de las condiciones edafoclimáticas en el producto vitivinícola final ya que, según la variedad, estas condiciones pueden modificar sustancialmente las propiedades químicas del vino y por tanto su calidad como producto final.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ramos, M. C. (2017). Projection of phenology response to climate change in rainfed vineyards in north-east Spain. *Agricultural and Forest Meteorology*, 247, 104–115. <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2017.07.022>
- [2] Deis, L., De Rosas, M. I., Malovini, E., Cavagnaro, M., & Cavagnaro, J. B. (2015). Impacto del cambio climático en Mendoza: Variación climática en los últimos 50 años. Mirada desde la fisiología de la vid. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, 47, 67–92.
- [3] Fraga, H., Santos, J. A., Moutinho-Pereira, J., Carlos, C., Silvestre, J., Eiras-Dias, J., Mota, T., & Malheiro, A. C. (2016). Statistical modelling of grapevine phenology in Portuguese wine regions: Observed trends and climate change projections. *The Journal of Agricultural Science*, 154(5), 795–816. <https://doi.org/10.1017/S0021859615000933>
- [4] Fraga, H., García de Cortázar Atauri, I., Malheiro, A. C., & Santos, J. A. (2016). *Global Change Biology*, 22, 3774.
- [5] van Leeuwen, C., Destrac-Irvine, A., Dubernet, M., Duchêne, E., Gowdy, M., Marguerit, E., Pieri, P., Parker, A., de Rességuier, L., & Ollat, N. (2019). *Agronomy*, 9(9), 514.
- [6] Martínez de Toda, F. (2019). Técnicas vitícolas frente al cambio climático. Ediciones Mundi-Prensa.
- [7] Nicholas, K. A. (2015). ¿Cómo afecta el cambio climático a los vinos? *Investigación y Ciencia*.
- [8] Jones, G. V., White, M. A., Cooper, O. R., & Storchmann, K. (2005). Climate change and global wine quality. *Climatic Change*, 73, 319–343.
- [9] Hannah, L., Roehrdanz, P. R., Ikegami, M., Shepard, A. V., Shaw, M. R., Tabor, G. & Hijmans, R. J. (2013). Climate change, wine and conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 6907–6912. <https://doi.org/10.1073/pnas.1210127110>
- [10] Fraga, H., Malheiro, A. C., Moutinho-Pereira, J., & Santos, J. A. (2013). An overview of climate change impacts on European viticulture. *Food and Energy Security*, 1, 94–110. <https://doi.org/10.1002/fes.3.14>
- [11] Ruíz García, L., Romero, P., Tornel, M., Menéndez, C. M., Cabello, F., & Martínez Cutillas, A. (2018). La viticultura frente al cambio climático: Adaptación y estrategias de mejora.
- [12] Martínez, M. C. (s.f.). Germoplasma de la vid. Recuperación de variedades tradicionales y minoritarias de uva y su potencial vitivinícola en determinadas zonas. *Próximos retos de la viticultura*, 21.
- [13] Junta de Castilla y León. (2024, 28 de octubre). Pliego de condiciones D.O.P. Rueda 2024. *Boletín Oficial de Castilla y León (BOCYL)*.
- [14] Chomé, P. M., et al. (2006). Variedades de vid. Registro de variedades comerciales. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

- [15] Minorsens. (2024, octubre). Valorizando variedades de uva en peligro de extinción. <https://minorsens.eu/> (Consultado el 5 de junio de 2025)
- [16] Moreno-Arribas, M. V., & Polo, M. C. (2009). *Wine Chemistry and Biochemistry*. Springer.
- [17] Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). (s.f.). Practical guide for the validation of oenological methods of analysis. En *Compendium of International Methods of Wine and Must Analysis: Annex E – Laboratory Quality Assurance*. <https://www.oiv.int/es/standards/compendium-of-international-methods-of-wine-and-must-analysis/annex-e/annex-e-laboratory-quality-assurance/practical-guide-for-the-validation> (Consultado el 20 de marzo de 2025)
- [18] Comisión Europea. (1990). Reglamento (CEE) nº 2676/90 de la Comisión de 17 de septiembre de 1990 por el que se determinan los métodos de análisis comunitarios aplicables en el sector del vino.
- [19] De Toda Fernández, F. M., Martín, J. G., & Manzanos, P. J. B. (2017). Adaptación al calentamiento climático de veinte variedades de vid, minoritarias de la DOCa Rioja, por su potencial de acidez. *Zubía*, 29, 83–94.
- [20] Gómez García Carpintero, E. V. A. (2012). Estudio del potencial enológico y de la calidad de los vinos tintos de variedades de uva minoritarias cultivadas en Castilla-La Mancha [Tesis Doctoral, Universidad de Castilla-La Mancha].