



**ESTUDIO DEL ESTADO DE MADUREZ Y LA APTITUD  
ENOLÓGICA EN UVA MEDIANTE ANÁLISIS DE  
IMAGEN HIPERESPECTRAL**

**Julio Nogales Bueno**



La tesis titulada *“Estudio del estado de madurez y la aptitud enológica en uva mediante análisis de imagen hiperespectral”*, presentada por el Ingeniero Químico **D. Julio Nogales Bueno** para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Área de Nutrición y Bromatología del Departamento de Nutrición y Bromatología, Toxicología y Medicina Legal (Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla), bajo la dirección de los Doctores **D. Francisco José Heredia Mira**, Catedrático de la Universidad de Sevilla y **D. José Miguel Hernández Hierro**, Profesor Ayudante Doctor de la Universidad de Sevilla. Considerando que se han alcanzado los objetivos inicialmente previstos, y que el trabajo reúne los requisitos necesarios, autorizan su presentación.

En Sevilla, a 20 de diciembre de 2016.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Heredia Mira'.

Fdo. Francisco José Heredia Mira

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Julio Nogales'.

Fdo. Julio Nogales Bueno

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Hernández Hierro'.

Fdo. José Miguel Hernández Hierro

Directores de la Tesis



**Nutrición y Bromatología**



## *Agradecimientos*

Podría agradecer todas las ayudas, apoyos, ánimos, gestos de amistad, cariño, amor y un largo etcétera que me han permitido llegar a este momento de una pieza, pero no considero adecuado que los agradecimientos superen en extensión al resto de este documento. Por tanto, no tengo más remedio que resumir, aún a sabiendas de que no os podré nombrar a todos ni hacer justicia a los que nombre.

Es de recibo comenzar agradeciendo a los directores. Esta costumbre me impide resaltar lo mucho que os agradezco vuestra inapreciable guía durante estos cuatro años al no poder situaros en un lugar más privilegiado de lo que es habitual. Muchas gracias Paco por acogerme en el seno de tu familia investigadora, que otros llaman grupo, y por tu generosidad y facilidad a la hora de transmitir conocimientos y habilidades. Muchas gracias José Miguel por enseñarme a investigar y por ser amigo antes que director. Deberías aparecer en más partes de estos agradecimientos, pero sé que no te gusta acaparar.

Muchas gracias a todos los que habéis sido parte indispensable de este trabajo. Muchas gracias Paco Rodríguez por ser un modelo a seguir perfecto, un amigo inestimable y por tu continua ayuda durante este tiempo. Y muchas gracias Berta, buena amiga y compañera, gran parte de este trabajo también te corresponde.

También tenéis gran culpa de lo que aquí queda recogido el resto de habitantes del laboratorio. Muchas gracias Ana por tu sonrisa perenne y por tu inagotable fuente de incondicional amistad, muchas gracias María José por soportar y ser partícipe de las continuas bromas que hacen más llevadero el día a día, muchas gracias Paula por tu carácter afable y las tardes de pádel-*beer* y muchas gracias al resto de vosotros, Fran, Belén, María Jesús, Sandra, Carla, María Luisa, Lourdes, Félix, Dolores, Antonio, Isabel, Rocío Fernández y Rocío Álvarez por ser las increíbles personas que sois.

Y para finalizar con la parte académica, muchas gracias a la gran cantidad de personas y entidades que me han ayudado de una forma o de otra a realizar esta tesis. Muchas gracias al Consejo Regulador de la D.O. Condado de Huelva, a la Cooperativa vitivinícola Nuestra Señora del Socorro y a Bodegas Roda por el aporte de muestras y a los alumnos que me han ayudado en su recolección y procesado. *Thank you very much* Hugh por guiarme de una forma tan eficaz durante mi estancia en Dublín. Pocas personas con tu posición académica son capaces de dedicarle tanto tiempo a un estudiante como a un investigador consagrado, y tú eres una de ellas.

No puedo olvidarme de la familia que se elige. Muchas gracias a todos los grandes amigos y amigas que están a las duras y a las maduras no solo durante estos cuatro años, sino desde siempre. Especial mención a Alberto que me ha acompañado desde párvulo hasta ahora y a Ignacio, Bauti, Juanlu, Ismael, Alberto Gutiérrez, Burgos y a “Las niñas”. Todo esto no habría sido posible sin las desconexiones semanales por las calles de Guadalcanal.

Muchas gracias también a mi FAMILIA, tanto la que aún permanece como la que no, tanto la sanguínea como la putativa. Sois muchos de los que me acuerdo como para poder siquiera nombraros todos.

Muchas gracias Ana, Manolo y Antonio Manuel por acogerme en vuestro hogar desde el primer día que me atreví a llamar a la puerta como si de repente os hubiera brotado de una de vuestras macetas un nuevo hijo o hermano de uno noventa. Esto ha ayudado mucho a la consecución de mis objetivos profesionales aunque no sea fácil de expresar en unas pocas líneas.

Muchas gracias Guadi por ser otro de mis referentes. Creo que he sabido captar parte de tu decisión, valentía y arrojo para atreverme a afrontar cosas que *a priori* parecen inalcanzables. Muchas gracias Fati por tu cariño y constante apoyo, me has llevado de la mano toda mi vida, incluso cuando me matriculé en la carrera o cuando hice mi primera entrevista de trabajo. Muchas gracias a ambas por ser los ejemplos a seguir perfectos, esos que te obligan a seguir trabajando a diario porque nunca terminas de alcanzarlos. Muchas gracias también por el regalo de hacerme tío, esos pequeños te quitan las penas con sus pequeñas sonrisas.

Muchas gracias Papá y Mamá. Sin vosotros sí que no hubiera sido nada posible, y no solo por el motivo obvio. Muchas gracias por vuestro continuo trabajo para conseguir la mejor educación para vuestros hijos. Muchas gracias por vuestro incondicional amor, cariño, apoyo, responsabilidad, honestidad,... sentimientos y valores entre los que hemos crecido y que hemos respirado hasta hacerlos nuestros.

Y muchas gracias Ana. Me has acompañado durante toda mi formación universitaria, has celebrado mis escasos éxitos y suavizado mis continuas derrotas, has creído en mí y me has apoyado. Has mostrado una paciencia infinita para soportar los kilómetros que nos separan semana tras semana y has soportado mis momentos de agobio. Muchas gracias por estar ahí siempre. Eres la coautora de mi vida.

*Muchas gracias*

Este trabajo ha sido realizado con el apoyo institucional del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España con el proyecto “Evaluación de la madurez fenólica de la uva, y de su contribución a la estabilización del color de vinos tintos, por técnicas ópticas de análisis de imagen” (AGL2011-30254-C02-02), del que el doctor Francisco José Heredia Mira es el investigador principal, y la Beca Predoctoral (BES-2012-060192) asociada a dicho proyecto. Parte de este trabajo ha sido desarrollado también con el apoyo del Ministerio de Economía y Competitividad con la ayuda para la realización de una estancia breve en Dublín de tres meses (EEBB-I-15-09193), gracias a la cual ha sido posible optar a la Mención Internacional del Título de Doctor.



*A mis padres,*

*Julio y Juani.*



## ÍNDICE





## Contenido

<b>PRODUCCIÓN CIENTÍFICA .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>9</b>
<b>1 CONTEXTO GENERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>2 LA UVA .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Morfología y composición de la uva .....</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Compuestos fenólicos en uva .....</b>	<b>15</b>
2.2.1 <i>Flavonoides</i> .....	15
2.2.2 <i>No flavonoides</i> .....	18
<b>2.3 Madurez tecnológica y madurez fenólica .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Extractabilidad de los compuestos fenólicos .....</b>	<b>19</b>
<b>3 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1 Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta–visible.....</b>	<b>23</b>
<b>3.2 Espectroscopía de infrarrojo.....</b>	<b>24</b>
3.2.1 <i>Análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano</i> .....	25
3.2.2 <i>Espectroscopía en el infrarrojo mediante transformada de Fourier</i> .....	29
<b>3.3 Espectroscopía Raman.....</b>	<b>30</b>
<b>4 COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 Análisis colorimétrico de imágenes digitales.....</b>	<b>35</b>
<b>5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA .....</b>	<b>37</b>
<b>5.1 Componentes de un equipo HPLC.....</b>	<b>37</b>
5.1.1 <i>Bombas</i> .....	37
5.1.2 <i>Inyectores</i> .....	38
5.1.3 <i>Columnas</i> .....	38
5.1.4 <i>Fases móviles</i> .....	39
5.1.5 <i>Detectores</i> .....	39
<b>6 QUIMIOMETRÍA.....</b>	<b>41</b>

<b>6.1</b>	<b>Pretratamientos espectrales.....</b>	<b>41</b>
<b>6.2</b>	<b>Análisis cualitativos utilizados .....</b>	<b>49</b>
6.2.1	<i>Análisis discriminante lineal (LDA).....</i>	49
6.2.2	<i>Agrupamiento mediante el algoritmo de K-medias .....</i>	51
6.2.3	<i>Análisis de componentes principales (PCA) .....</i>	51
<b>6.3</b>	<b>Análisis cuantitativos utilizados .....</b>	<b>54</b>
6.3.1	<i>Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS).....</i>	54
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>		<b>59</b>
<b>1</b>	<b>MUESTRAS .....</b>	<b>61</b>
<b>1.1</b>	<b>Muestreo.....</b>	<b>62</b>
1.1.1	<i>Muestreo para estudio de clasificación de variedades de uva tinta.....</i>	63
1.1.2	<i>Muestreo para los estudios de maduración .....</i>	64
1.1.3	<i>Muestreos para los estudios de extractabilidad.....</i>	64
<b>2</b>	<b>TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS.....</b>	<b>65</b>
<b>2.1</b>	<b>Análisis de imagen hiperespectral.....</b>	<b>65</b>
2.1.1	<i>Material y equipos.....</i>	65
2.1.2	<i>Adquisición de imágenes hiperespectrales.....</i>	65
2.1.3	<i>Segmentación de las imágenes hiperespectrales.....</i>	67
<b>2.2</b>	<b>Espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR-FTIR).....</b>	<b>67</b>
2.2.1	<i>Material y equipos.....</i>	67
2.2.2	<i>Medidas ATR-FTIR.....</i>	68
<b>2.3</b>	<b>Espectroscopía Raman.....</b>	<b>69</b>
2.3.1	<i>Material y equipos.....</i>	69
2.3.2	<i>Medidas Raman.....</i>	69
<b>2.4</b>	<b>Análisis de imagen digital en la región visible .....</b>	<b>70</b>
2.4.1	<i>Material y equipos.....</i>	70

2.4.2	<i>Adquisición de imágenes</i> .....	70
<b>3</b>	<b>ANÁLISIS QUÍMICO</b> .....	<b>71</b>
<b>3.1</b>	<b>Madurez tecnológica</b> .....	<b>71</b>
3.1.1	<i>Material y reactivos</i> .....	71
3.1.2	<i>Procedimiento analítico</i> .....	71
<b>3.2</b>	<b>Composición fenólica</b> .....	<b>71</b>
3.2.1	<i>Material y reactivos</i> .....	71
3.2.2	<i>Extracciones</i> .....	73
3.2.3	<i>Contenido en fenoles totales</i> .....	73
3.2.4	<i>Contenido en flavanoles totales</i> .....	74
3.2.5	<i>Determinación del perfil antocianico</i> .....	74
<b>4</b>	<b>TRATAMIENTO DE DATOS</b> .....	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Análisis de componentes principales (PCA)</b> .....	<b>75</b>
<b>4.2</b>	<b>Regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS)</b> .....	<b>76</b>
4.2.1	<i>Aplicación de los modelos</i> .....	77
<b>4.3</b>	<b>Análisis de vectores característicos</b> .....	<b>77</b>
<b>4.4</b>	<b>Análisis discriminante lineal (LDA)</b> .....	<b>77</b>
<b>4.5</b>	<b>Agrupamiento mediante el algoritmo de K-medias</b> .....	<b>78</b>
<b>4.6</b>	<b>Análisis de la varianza (ANOVA)</b> .....	<b>78</b>
	<b>OBJETIVOS GENERALES</b> .....	<b>79</b>
	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>85</b>
	<b>BLOQUE I</b> .....	<b>87</b>
	<b>CAPÍTULO 1: APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL A LA CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS DE UVA</b> .....	<b>89</b>
<b>1.1</b>	<b>Antecedentes</b> .....	<b>89</b>

1.2	Objetivos .....	90
1.3	Parte experimental .....	91
1.4	Conclusiones .....	93
 <b>BLOQUE II .....</b>		<b>95</b>
 <b>CAPÍTULO 2: DETERMINACIÓN DE LA MADUREZ TECNOLÓGICA EN UVA Y CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES EN HOLLEJO DE UVA POR ANÁLISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL.....</b>		<b>97</b>
2.1	Antecedentes .....	97
2.2	Objetivos .....	98
2.3	Parte experimental .....	98
2.4	Conclusiones .....	100
 <b>CAPÍTULO 3: ANALISIS DE VECTORES CARACTERÍSTICOS EN ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO PARA LA ESTIMACIÓN DE MADUREZ TECNOLÓGICA EN UVA TINTA Y CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES EN HOLLEJO DE UVA TINTA .....</b>		<b>103</b>
3.1	Antecedentes .....	103
3.2	Objetivos .....	105
3.3	Parte experimental .....	105
3.4	Conclusiones .....	107
 <b>CAPÍTULO 4: USO DE ANALISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL EN EL INFRARROJO CERCANO PARA LA ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTOCIANOS EN UVA DURANTE LA MADURACIÓN.....</b>		<b>109</b>
4.1	Antecedentes .....	109
4.2	Objetivos .....	110
4.3	Parte experimental .....	110
4.4	Conclusiones .....	112

<b>BLOQUE III.....</b>	<b>113</b>
<b>CAPÍTULO 5: APLICACIÓN DEL ANALISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL EN EL INFRARROJO CERCANO A LA ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO EXTRAIBLE DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN UVA TINTA .....</b>	<b>115</b>
5.1 Antecedentes .....	115
5.2 Objetivos .....	116
5.3 Parte experimental .....	117
5.4 Conclusiones .....	118
<b>CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE EXTRACTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN SEMILLA DE UVA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR Y RAMAN .....</b>	<b>121</b>
6.1 Antecedentes .....	121
6.2 Objetivos .....	122
6.3 Parte experimental .....	123
6.4 Conclusiones .....	125
<b>CAPÍTULO 7: RELACIÓN ENTRE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR Y RAMAN CON LA EXTRACTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y OTROS ATRIBUTOS DE INTERÉS EN HOLLEJO DE UVA .....</b>	<b>127</b>
7.1 Antecedentes .....	127
7.2 Objetivos .....	128
7.3 Parte experimental .....	129
7.4 Conclusiones .....	132
<b>CAPÍTULO 8: INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE SEMILLA DE UVA BLANCA EN LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANOS EN HOLLEJO DE UVA PREVIAMENTE CARACTERIZADOS MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL. ....</b>	<b>133</b>
8.1 Antecedentes .....	133
8.2 Objetivos .....	134
8.3 Parte experimental .....	134

<b>8.4 Conclusiones .....</b>	<b>136</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>139</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>145</b>

---

## PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

La estructura de esta memoria sigue la modalidad “Conjunto de Trabajos”, recogida en el Artículo 9 de la Normativa Reguladora de Tesis Doctoral de la Universidad de Sevilla (Bous nº 3 de 23 de mayo de 2012), a partir de la siguiente producción científica:

### Artículos:

- Nogales Bueno, Julio; Hernández Hierro, José Miguel; Rodríguez Pulido, Francisco José; Heredia Mira, Francisco José: *Comparative study on the use of anthocyanin profile, color image analysis and near infrared hyperspectral imaging as tools to discriminate between four autochthonous red grape cultivars from La Rioja (Spain)*. En: *Talanta* 2015. Vol. 131. Pag. 412–416, ISSN 0039–9140.
- Nogales Bueno, Julio; Hernández Hierro, José Miguel; Rodríguez Pulido, Francisco José; Heredia Mira, Francisco José: *Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: a preliminary approach*. En: *Food Chemistry* 2014. Vol. 152. Pag. 586–591, ISSN 0308–8146.
- Nogales Bueno, Julio; Ayala, Fernando; Hernández Hierro, José Miguel; Rodríguez Pulido, Francisco José; Echávarri, José Federico; Heredia Mira, Francisco José: *Simplified method for the screening of technological maturity of red grape and total phenolic compounds of red grape skin: application of the characteristic vector method to near-infrared spectra*. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Vol. 63 2015. Pag. 4284–4290, ISSN 4284–4290.
- Hernández Hierro, José Miguel; Nogales Bueno, Julio; Rodríguez Pulido, Francisco José; Heredia Mira, Francisco José: *Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of anthocyanins in intact grapes during ripening*. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013. Vol. 61. Pag. 9804-9809, ISSN 0021-8561.
- Nogales Bueno, Julio; Baca Bocanegra, Berta; Rodríguez Pulido, Francisco José; Heredia Mira, Francisco José; Hernández Hierro, José Miguel: *Use of near infrared hyperspectral tools for the screening of extractable polyphenols in red grape skins*. En: *Food Chemistry* 2015. Vol. 172. Pag. 559-564, ISSN 0308–8146.

- 
- Nogales Bueno, Julio; Baca Bocanegra, Berta; Rooney, Abigail; Hernández Hierro, José Miguel; Byrne, Hugh J.; Heredia Mira, Francisco José: *Study of phenolic extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and Raman spectroscopy*. Enviado a Food Chemistry, ISSN 0308-8146 (en revision).
  - Nogales Bueno, Julio; Baca Bocanegra, Berta; Rooney, Abigail; Hernández Hierro, José Miguel; Heredia Mira, Francisco José; Byrne, Hugh J.: *Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin*. Enviado a Talanta, ISSN 0039-9140 (en revision).
  - Nogales Bueno, Julio; Baca Bocanegra, Berta; Jara Palacios, María José; Hernández Hierro, José Miguel; Heredia Mira, Francisco José: *Evaluation of the influence of white grape seed extracts as copigment sources on the anthocyanin extraction from grape skins previously classified by near infrared hyperspectral tools*. En: Food Chemistry 2017. Pag. 1685-1690, ISSN 0308-8146.

#### **Capítulo de Libro**

- Nogales Bueno, Julio; Baca-Bocanegra, Berta; Rodríguez Pulido, Francisco José; González-Miret Martín, María Lourdes; Heredia Mira, Francisco José; Hernández Hierro, José Miguel: *Hyperspectral imaging – A novel green chemistry technology for the oenological and viticultural sectors*. En: Prathamesh Gorawala y Srushti Mandhatri (Eds.) *Agricultural research updates*. Nova Science Publishers, Inc. Vol. 12. Pag. 45-56. 2015. ISBN 978-1-63483-968-6.

#### **Patente**

- Patente de dispositivo de medición discreta por reflectancia de NIR multibanda del índice glucoacídico en uva para vinificación. Patente de invención, Propiedad industrial. Número publicación: ES2554396.

## RESUMEN





---

## RESUMEN

La calidad del vino depende en gran medida de las características de la uva en el momento de la vendimia. Tradicionalmente el control de la variedad, el estado de maduración, la composición fenólica o la facilidad de cesión de estos compuestos al vino se ha realizado mediante métodos de análisis físico-químicos, que pueden resultar complejos y tediosos.

Durante las últimas décadas ha comenzado el desarrollo de técnicas espectroscópicas que permiten estimar de forma rápida, no destructiva y respetuosa con el medio ambiente parámetros de interés agronómico. Entre estos métodos destacan los relacionados con la imagen hiperespectral, basados en la información espectral y espacial de la muestra. En el presente trabajo se ha utilizado el análisis de imagen hiperespectral en la región del infrarrojo cercano para la caracterización de uvas y el desarrollo de diferentes metodologías que permitan evaluar su estado de maduración y aptitud enológica.

Se ha comprobado la capacidad que el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano tiene para discriminar entre distintas variedades de uva consiguiendo resultados comparables con los obtenidos mediante la caracterización química de las muestras. Así mismo, se han desarrollado modelos para la estimación de parámetros de interés enológico a partir de análisis de imagen hiperespectral con resultados satisfactorios. Han sido modelados parámetros enológicos como la acidez total, el pH y la concentración de azúcares en el mosto de uva, y la concentración de fenoles totales y de antocianos en el hollejo, los cuales tienen gran importancia en la vinificación. Además, la comparación con espectros reconstruidos mediante análisis de vectores característicos ha demostrado que esta técnica permite reducir, en gran medida, la cantidad de información espectral necesaria para el desarrollo de modelos de calibración.

Igualmente, se han propuesto modelos de predicción del contenido extraíble de antocianos, flavanoles y fenoles totales en hollejo de uva que permiten estimar de forma rápida la facilidad de cesión de estos compuestos desde las partes sólidas de la uva. Así mismo, utilizando espectroscopía en el infrarrojo medio por transformada de Fourier y espectroscopía Raman se han caracterizado espectralmente muestras de material no extraíble de hollejo y de semilla de uva (residuo sólido resultante tras la extracción de los compuestos fenólicos) y se han relacionado las características espectrales más importantes con la facilidad de extracción de compuestos fenólicos. De esta forma, se ha podido confirmar la relación existente entre la extractabilidad de compuestos fenólicos en hollejo y semilla de uva con la composición de su pared celular.

---

Por último, se ha evaluado el efecto que tiene la adición de extractos de semilla de uva blanca en la extracción de compuestos antociánicos del hollejo de uva tinta. La semilla de uva contiene copigmentos que mejoran las características colorimétricas del vino tinto, sin embargo, es posible que la presencia de estos copigmentos pueda alterar el equilibrio de extracción de los compuestos antociánicos del hollejo de uva. En el presente trabajo se ha comprobado que la adición de copigmentos provenientes de semillas de uva blanca no reduce la cantidad de antocianos extraídos en hollejo de uva durante la etapa de maceración.

---

## ABSTRACT

Wine quality mainly depends on the characteristics of harvested grapes. Traditionally, variety control, grape maturity, phenolic composition or phenolic compounds extractability are determined by physical and chemical analyses which are usually time consuming.

During the past several decades, spectroscopic techniques have grown significantly as technology improved. This growth has allowed developing fast, non-destructive and green chemistry methods for the screening of different parameters of value for agriculture. Among them, hyperspectral imaging methods provide special and spectral information of the sample. In this work, near infrared hyperspectral imaging has been applied for the spectral characterisation of grapes. Afterwards, this spectral data has been used for the development of different methods for the evaluation of grape maturity and oenological capability.

The ability of near infrared hyperspectral imaging for discriminating among different grape varieties has been checked. This technique shows similar results than traditional techniques, such as chromatographic analysis, for this purpose. Furthermore, hyperspectral imaging has been applied to grapes in order to develop different calibration models for the screening of several parameters linked to wine sector (i.e., sugar concentration, titratable acidity and pH of grape must, and total phenolic and anthocyanic compounds in grape skin). Moreover, characteristic vector analysis has been applied in order to reduce the amount of spectral data which is necessary for the calibration model development.

In addition, calibration models have been developed for the screening of extractable content of anthocyanins, flavanols and total phenolic compounds in grape skins. These models allow knowing how easily phenolic compounds are released from grape seed and skin to wine. In order to provide more information in this respect, Fourier transform infrared and Raman spectroscopy have been applied to grape seed and skin non-extracted material (solid residue obtained after exhaustive phenolic extraction). The main spectral features have been linked to phenolic extractability and it has been confirmed that grape seed and skin phenolic extractability is closely linked to the cell wall composition.

Finally, the effect that copigments coming from white grape seeds has on the anthocyanin extraction from red grape skins has been evaluated. Grape seed contains copigments that can improve or stabilize wine colour, however, they might hamper the extraction equilibrium of anthocyanins compounds. In this work it has been proven that the addition of copigments coming from white grape seeds has not reduce the amount of extracted anthocyanins from red grape skin.



## INTRODUCCIÓN





## 1 CONTEXTO GENERAL

El sector vitivinícola depende de factores muy variados para conseguir una producción de uva y vino rentable y de calidad. Las condiciones climáticas y agrarias en las que se desarrolla cada campaña influyen de forma notable en la calidad de la uva. Además, para producir un vino de calidad, es necesario tener en cuenta y controlar muchos más factores en un proceso complejo y tedioso.

Una correcta elección del momento de la vendimia y un amplio conocimiento del estado enológico de la uva son aspectos fundamentales en la calidad futura de un vino. Los vitivinicultores deben decidir anualmente el momento de vendimia, que no tiene una fecha fija y depende de un gran número de factores. Dos de los factores más importantes que se tienen en cuenta para decidir cuándo es el momento adecuado para recolectar la uva son la madurez tecnológica y la madurez fenólica del fruto. La madurez tecnológica considera el contenido en azúcar, la acidez total y el pH. El contenido en azúcar está directamente relacionado con el grado alcohólico que se alcanzará en el vino, mientras que la acidez total y el pH ayudan a controlar el color y calidad de éste. La determinación del estado de madurez fenólica ayuda a conocer el estado de desarrollo de la uva, de su semilla, pulpa y hollejo, mediante la composición fenólica de cada una de estas partes (Meléndez, Ortiz, Sarabia, Íñiguez y Puras, 2013; Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, Doneche, Lonvaud, Glories, Maujean, *et al.*, 2006).

La importancia de la composición fenólica de la uva radica en que la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en el vino provienen de forma directa o indirecta de ésta. La cantidad de compuestos fenólicos que puede ceder la uva al vino durante la vinificación se denomina contenido extraíble y su relación respecto a la cantidad total de compuestos fenólicos extractabilidad. Es bien conocida la importancia que tienen los compuestos fenólicos en nuestra dieta por sus funciones antioxidantes y de control de radicales libres reduciendo así el estrés oxidativo que sufren las células del organismo (Crozier, Clifford y Ashihara, 2006; Rice-Evans, Miller y Paganga, 1997). Además, los fenoles presentes en el vino son los responsables de su astringencia, además de tener un papel fundamental en su conservación y crianza. Gran parte de estos fenoles son coloreados y son, por tanto, responsables directos de las características cromáticas del vino (Waterhouse, 2002).

Habitualmente en bodega, la elección del momento de la vendimia y el control del estado enológico de la uva conlleva una toma de muestras y posterior realización de análisis físico-químicos que, en la mayoría de los casos, son largos, laboriosos y destructivos. Continuamente, los avances tecnológicos están propiciando el afloramiento de nuevas tendencias hacia el desarrollo de métodos no invasivos, que permiten estimar, con adecuada precisión, los distintos

parámetros que influyen en el estado enológico de la uva. Estas técnicas no invasivas necesitan un calibrado previo que permite establecer una relación con los datos químicos o de otra naturaleza que se quieren determinar. Así, estas tecnologías necesitan una inversión inicial mayor y se suelen originar errores mayores que las técnicas tradicionales, debido a la propagación del error inicial propio de los métodos usados como referencia. Sin embargo, consiguen resultados positivos para múltiples parámetros de forma simultánea, con una mínima preparación de la muestra, de forma rápida, no destructiva, respetuosa con el medio ambiente y fácilmente automatizable. Debido a dichas ventajas, el uso de estas técnicas está en franco crecimiento en todos los sectores agroalimentarios y concretamente en el sector enológico (Baca-Bocanegra, Nogales-Bueno, Rodríguez-Pulido, González-Miret, Hernández-Hierro y Heredia, 2016; Nogales-Bueno, Rodríguez-Pulido, Baca-Bocanegra, González-Miret, Heredia y Hernández-Hierro, 2016).

## 2 LA UVA

### 2.1 Morfología y composición de la uva

La uva (*Vitis Vinifera* L.) es una baya globosa que se agrupa en la vid en forma de racimos. Presenta una estructura formada por una película exterior llamada hollejo, una masa que rellena interiormente la baya, conocida como pulpa y, en el centro de la misma, un número variable de semillas o pepitas.

El hollejo representa entre el 8 y el 20% del peso de la baya y tiene por misión encerrar los tejidos vegetales que contienen las sustancias de reserva que acumula el fruto, proteger las semillas como elementos perpetuadores de la especie hasta llegar a su maduración y defender estas estructuras de las agresiones externas. Se divide en tres capas claramente diferenciadas. La capa más externa, conocida como cutícula, está compuesta mayoritariamente por ácidos grasos hidroxilados y está cubierta por la pruina, un recubrimiento de ceras hidrofóbicas que le dan el característico aspecto mate o pulverulento a la baya. La capa intermedia es la epidermis y consiste en una o dos capas de células dispuestas de forma regular. Por último, la hipodermis es la capa más cercana a la pulpa, sus capas más interiores se confunden con esta. En estas dos últimas capas de células del hollejo, es donde se ubica la mayor parte de los polifenoles y sustancias aromáticas que contiene la uva (Hidalgo Togores, 2010; Pinelo, Arnous y Meyer, 2006).

El hollejo está compuesto mayoritariamente por agua (78 a 80%), seguido de ácidos orgánicos (0.8 a 1.6%), compuestos fenólicos (0.4 a 3.5%), compuestos nitrogenados (1.5 a 2.0%), minerales (1.5 a 2%) y ceras (1.0 a 2.0%) (Cabanis, Cabanis, Cheynier y Teissendré, 2003). Los compuestos fenólicos revisten una gran importancia en vitivinicultura debido al papel que juegan directa o indirectamente en la calidad de los vinos. La síntesis de estos compuestos en los hollejos se produce de forma paulatina a lo largo de la maduración, alcanzándose su máximo en el envero del fruto. Los antocianos, responsables del color en vinos tintos, se sitúan en las vacuolas o en estructuras especializadas (antocianoplastos) de las células del hollejo, siendo más ricos las que se localizan en la hipodermis. Solo están presentes en las variedades tintas, no existiendo más diferencias significativas, en cuanto a su estructura y composición, entre variedades blancas y tintas salvo la mencionada. En el caso de variedades blancas, las sustancias responsables del color amarillo son también polifenoles del grupo de los flavonoides: flavonoles, flavanoles, dihidroflavonoles y flavonas, que se localizan también en el hollejo y principalmente en la epidermis. Las variedades tintas también contienen estos compuestos, pero pasan a un segundo término de importancia respecto de los antocianos en lo

que a color se refiere, aunque no son de despreciar, pues intervienen en la coloración tinta de las uvas o de los vinos por fenómenos de copigmentación con los antocianos (Hidalgo Tогores, 2010).

La pulpa es la parte más voluminosa de la uva, representando un 75 a 85% del peso de esta. Está formada por grandes células en cuyas vacuolas se acumula el mosto, representando las partes solidas menos del 1% del total de la pulpa. Está compuesta por dos capas, el mesocarpio y el endocarpio, con un grosor total de unas 25 a 30 células que crecen durante la maduración de la baya. El agua es el componente mayoritario de la pulpa (más del 80%). Tiene la importante misión de hacer de solvente para el resto de componentes de la uva. Los siguientes compuestos más importantes son los azúcares, con concentraciones medias de entre 150 y 250 g/L que se van alcanzando a lo largo de la maduración del fruto. Los azúcares mayoritarios son la glucosa y la fructosa, existiendo en el envero el doble del primero que del segundo, mientras que en la maduración se encuentran en cantidades prácticamente iguales.

Junto con los azúcares, los ácidos orgánicos son compuestos de gran importancia en la pulpa, llegando a alcanzarse concentraciones de 3 a 7 g/L. En cuanto a materias minerales, el potasio es el catión más importante, representando más del 50% de las cenizas. Además también se pueden encontrar en cantidades significativas calcio y magnesio y por último otros elementos minoritarios como el hierro y el sodio.

Los polifenoles que contiene la pulpa son fundamentalmente del tipo no flavonoides, siendo los ácidos cinámicos y benzoicos los más abundantes. No suelen encontrarse en la pulpa polifenoles de tipo flavonoide excepto trazas de flavanoles muy poco polimerizados y en las variedades tintoreras de pulpa coloreada, antocianos responsables del color rojo característico (Hidalgo Tогores, 2010).

En la capa más interna de la pulpa (endocarpio) se encuentran las pepitas o semillas. Estas constituyen los elementos de la vid encargados de perpetuar la especie por vía sexual, por lo que la principal función de la baya es alcanzar la maduración de sus semillas, objetivo que se suele alcanzar durante el envero del fruto. Por lo tanto, se podría decir que la madurez de las uvas se debe a un exceso de sustancias de reserva acumuladas en la pulpa y no utilizadas por las pepitas. Así, uvas con mayor número de semillas presentan una pulpa menos madura. El número de semillas presentes en una baya puede ir desde ninguna a 4, alcanzando hasta el 6% del peso total de la baya.

Los principales componentes de las semillas de uva son: agua (25.0 a 45.0%), carbohidratos (34.0 a 36.0%), aceites (13.0 a 20.0%), compuestos fenólicos (4.0 a 6.0%), compuestos nitrogenados (4.0 a 6.5%), minerales (2.0 a 4.0%) y ácidos grasos (1.0%). Siendo los aceites y los compuestos fenólicos los de mayor interés debido a sus propiedades beneficiosas para la

salud (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, *et al.*, 2006). Los compuestos fenólicos más importantes en la semilla de uva son los flavanoles, apareciendo tanto en forma de monómeros (+)-catequina, (-)-epicatequina o 3-galato de epicatequina, como de oligómeros y polímeros compuestos de distintas subunidades monoméricas (Ristic y Iland, 2005).

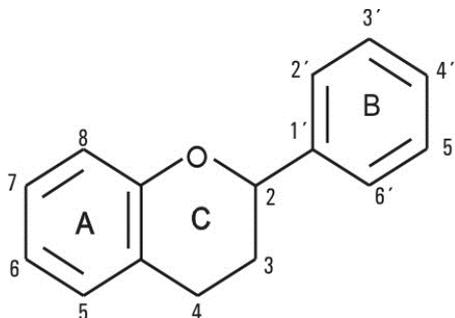
## 2.2 Compuestos fenólicos en uva

En la uva, al igual que en otros muchos frutos, existe una gran variedad de sustancias fenólicas. Estos compuestos se encuentran repartidos por todo el fruto, tanto en semillas como hollejos y pulpa, y pasarán directamente al vino (Waterhouse, 2002). Se conocen como compuestos fenólicos aquéllos que tienen en su estructura al menos un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (por ejemplo ácido caféico). Dentro de esta gran familia de compuestos, la mayoría tienen múltiples anillos fenólicos en su estructura por lo que, en general, se conocen como polifenoles (por ejemplo (+)-catequina o ácido elágico). Además, tradicionalmente, se han denominado como taninos los compuestos presentes en mezclas complejas de fenoles de alto peso molecular provenientes de extractos naturales de plantas.

Las familias más importantes de compuestos fenólicos presentes en uva y vino son flavonoides y no flavonoides (Cheynier, Moutounet y Sarni-Machado, 2003):

### 2.2.1 Flavonoides

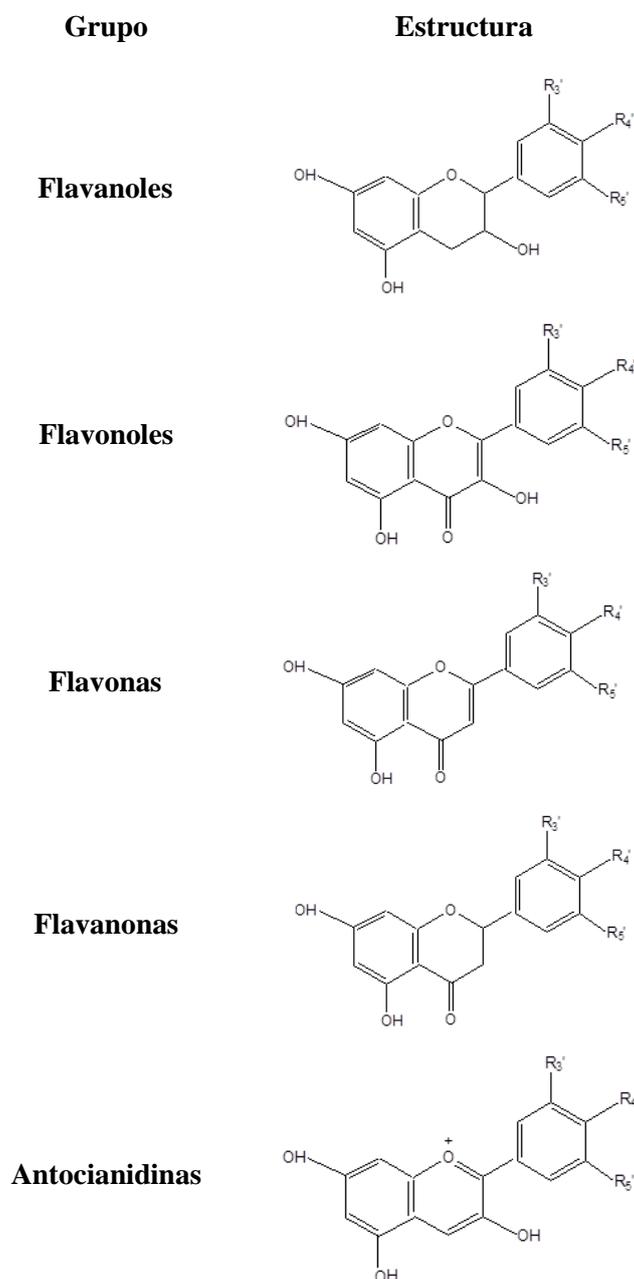
Se denominan flavonoides todos los compuestos fenólicos que comparten la estructura que se muestra en la Figura 1, un esqueleto de base de 15 átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) de tipo 2-fenil benzopirona. Esta estructura contiene varios anillos aromáticos con grupos hidroxilo, por lo que estos compuestos son polifenoles.



**Figura 1.** Estructura base de los flavonoides (2-fenil-1,4-benzopirona).

Esta familia está dividida en varias subclases que se distinguen por el grado de oxidación de su núcleo de pirano (anillo C). En la uva se pueden encontrar flavanoles, flavonoles y

antocianos. En cantidades relativamente menores están presentes también otros grupos como los dihidroflavonoles (flavononoles), y, en las hojas de la vid, las flavonas.



**Figura 2.** Estructura básica de los principales grupos de flavonoides encontrados en uva

#### 2.2.1.1 Flavanoles

Los flavanoles o flavan-3-oles son los flavonoides más abundantes en la uva. Se localizan principalmente en las semillas, aunque también se encuentran en los hollejos y se han encontrado trazas en pulpa. Lo más frecuente es encontrarlos formando polímeros y oligómeros en la piel y semillas del fruto. Los polímeros y oligómeros son habitualmente denominados

taninos. Generalmente, los contenidos globales, al igual que el grado de polimerización, varían de una cepa a otra y según las condiciones de cultivo.

Los principales flavanoles que pueden encontrarse en la uva en forma de monómeros son la (+)-catequina y su isómero la (-)-epicatequina. Este último puede encontrarse además en forma de éster gálico (3-galato de epicatequina). También pueden encontrarse, aunque solo en ciertas variedades la galocatequina, el 3-galato de catequina y el 3-galato de galocatequina (Cheynier, *et al.*, 2003).

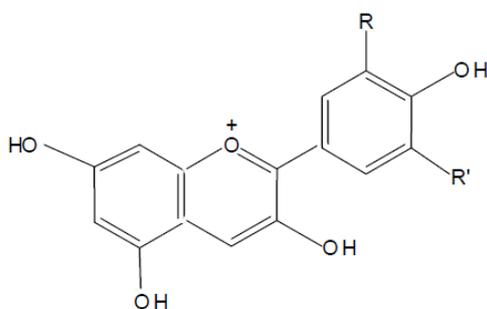
### 2.2.1.2 Flavonoles

Los flavonoles se encuentran únicamente en el hollejo y su principal función es proteger al fruto de la radiación solar. De esta forma, cuando la exposición solar es mayor, la concentración de estos compuestos se incrementa. Aparecen tanto en variedades blancas como en tintas, con concentraciones totales similares aunque con cambios composicionales en los compuestos individuales.

Los cuatro principales flavonoles que pueden encontrarse en uva son kaempferol, quercetina, miricetina e isoramnetol. Se pueden encontrar en forma glucosilada (más abundante), pero se encuentran igualmente cantidades importantes de glucurónidos. Otros azúcares a los que pueden aparecer unidos los flavonoles son galactosa, xilosa y arabinosa (Cheynier, *et al.*, 2003).

### 2.2.1.3 Antocianos

Los antocianos o antocianinas (del griego *anthos* flor y *kyanos* azul) son los principales responsables de la coloración de la uva y el vino tinto y representan una parte importante de los flavonoides de la baya. Se localizan en el hollejo y, para las variedades tintoreras, también en la pulpa. En la célula se localizan en los antocianoplastos, orgánulos especializados para su generación y almacenamiento.



**Figura 3.** Estructura de las antocianidinas presentes en uva

Antocianidina	R	R'
Cianidina	OH	H
Delfinidina	OH	OH
Peonidina	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidina	OCH <sub>3</sub>	OH
Malvidina	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Se denominan antocianidinas a las formas agliconas de los antocianos. Las principales antocianidinas que aparecen en uva están descritas en la Figura 3. Las diferencias entre ellas se limitan a los distintos niveles de hidroxilación y metilación del catión flavilio. Además, los distintos azúcares y ácidos que esterifican a las antocianidinas y la posición donde aparece el enlace glucosídico permiten distinguir las diferentes familias de antocianos. La glucosa es el principal azúcar que aparece unido a las antocianidinas en uva, comúnmente en la posición 3 del anillo C. Los principales ácidos que esterifican el azúcar son el ácido acético, el ácido *p*-cumárico y el ácido cafeico. Teniendo esto en cuenta, los antocianos presentes en uva pueden agruparse según se encuentren acilados o no acilados y dentro de los acilados, según cual sea el ácido que esterifique al azúcar (acetatos, cumaroatos o cafeoatos) (Cheynier, *et al.*, 2003).

### 2.2.2 *No flavonoides*

Se denominan no flavonoides el resto de compuestos fenólicos que no poseen la estructura 2-fenil-benzopirona. En este grupo están comprendidos los ácidos fenólicos, divididos en ácidos hidroxibenzóicos y ácidos hidroxicinámicos, y otros derivados fenólicos como los estilbenos (resveratrol), los fenoles volátiles y algunos compuestos heterogéneos (lignanós y cumarinas).

En uva son más comunes los ácidos hidroxicinámicos, que se encuentran en las vacuolas de las células del hollejo y la pulpa bajo la forma de ésteres tartáricos. Estos son los ácidos cafeoil tartárico (caftárico), *p*-cumaroil tartárico (cutárico) y feruloil tartárico (fertárico). La forma natural es la *trans* (E) pero los isómeros *cis* (Z) también existen aunque en pequeña cantidad. Además, los ácidos hidroxicinámicos, concretamente los ácidos *p*-cumárico y caféico, están muy implicados en la acilación de los sustitutos glucosídicos de los antocianos.

En cuanto a ácidos benzoicos, la uva contiene principalmente ácido gálico, presente bajo forma de éster de flavanoles. Este ácido puede alcanzar concentraciones superiores a 100 mg/L en vino tinto (Cheynier, *et al.*, 2003).

## 2.3 **Madurez tecnológica y madurez fenólica**

La madurez tecnológica y la madurez fenólica de la uva tienen especial importancia en la decisión del momento de la vendimia. Tradicionalmente, la madurez tecnológica ha sido la que más influencia ha tenido debido a la facilidad y rapidez con la que se determina. Sin embargo, en los últimos tiempos ha ido ganando importancia el concepto de madurez fenólica.

La madurez tecnológica se da cuando se alcanza un equilibrio entre la concentración de azúcares y la acidez de la pulpa que permite obtener unas características adecuadas en el vino: una suficiente graduación alcohólica y un pH adecuado. Una vez superado este estadio de

madurez tecnológica, la concentración de azúcares aumenta en demasía pudiéndose obtener caldos con demasiada graduación y con pH elevado (Meléndez, *et al.*, 2013; Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, *et al.*, 2006).

El mercado enológico es un mercado muy competitivo, con gran variedad de productos y donde, para conseguir ventas y por tanto beneficios, es necesario producir un vino de elevada calidad. Si se cosecha la uva en el momento óptimo de madurez tecnológica se puede llegar a obtener un vino con una correcta graduación alcohólica y pH. Sin embargo, es necesario tener en cuenta y controlar la madurez fenólica de la uva cosechada para hablar de un vino de calidad. La madurez fenólica está muy relacionada con el sabor, el aroma (a través de los compuestos fenólicos precursores de aromas) y el color del vino. Sucede cuando existe una relación proporcionada entre los compuestos fenólicos que aportan color, sabor y aroma y los compuestos fenólicos astringentes presentes en la uva (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, *et al.*, 2006; Zamora, 2003). Estos compuestos astringentes son principalmente flavanoles.

Consecuentemente, es de gran interés el poder determinar la madurez fenólica de la uva para poder estimar el potencial del vino en cuanto a color, composición fenólica y, en menor medida, compuestos fenólicos precursores de aromas. Se han desarrollado múltiples métodos para determinar cuantitativamente este parámetro que se basan en realizar extracciones de las uvas mediante maceración con distintos disolventes y posteriores determinaciones cromatográficas o espectrofotométricas de los extractos, algo que normalmente es lento y necesita de gran cantidad de trabajo.

## **2.4 Extractabilidad de los compuestos fenólicos**

Uno de los factores más influyentes en la calidad futura de un vino es la madurez fenólica de la uva de la que procede (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, *et al.*, 2006). Este factor muestra la cantidad de compuestos fenólicos presentes en los hollejos, las semillas o en el mosto que forman parte de la masa de vendimia. Sin embargo, no solo es importante conocer la cantidad total de compuestos fenólicos presente en la uva, sino también la cantidad de estos que son extraídos de la uva para formar parte del vino producido, es decir, el contenido extraíble de compuestos fenólicos. La extractabilidad de los compuestos fenólicos, o relación entre contenido extraíble y contenido total, depende en gran medida del grado de madurez de la uva. Uvas más maduras presentan una mayor degradación en las paredes celulares de sus tejidos y, por tanto, una mayor extractabilidad (Bautista-Ortín, Jiménez-Pascual, Busse-Valverde, López-Roca, Ros-García y Gómez-Plaza, 2013; Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, *et al.*, 2006).

Varios estudios relacionan la extractabilidad de compuestos fenólicos con el grado de madurez de la uva o con parámetros íntimamente ligados a la madurez. En hollejo de uva, el

contenido extraíble de fenoles totales, antocianos y flavanoles aumenta con el contenido en sólidos solubles totales en el mosto, es decir con el grado de madurez de la uva (Fournand, Vicens, Sidhoum, Souquet, Moutounet y Cheynier, 2006; Torchio, Cagnasso, Gerbi y Rolle, 2010; Zouid, Siret, Jourjon, Mehinagic y Rolle, 2013). También se han relacionado estos contenidos extraíbles directamente con las distintas etapas de maduración de la uva (envero, maduración y sobremaduración) (Canals, Llaudy, Valls, Canals y Zamora, 2005; Fournand, *et al.*, 2006; Hernández-Hierro, Quijada-Morín, Rivas-Gonzalo, Rivas-Gonzalo y Escribano-Bailón, 2012), y con las condiciones durante la etapa de maceración de la masa de vendimia (González-Manzano, Rivas-Gonzalo y Santos-Buelga, 2004). A lo largo del proceso de maduración de la uva, se produce una disminución de material en la pared celular, galactosa, celulosa y manosa, acompañado por un descenso del grado de esterificación de los polisacáridos pécticos o pectinas. Estos factores tienen gran influencia en la extractabilidad de compuestos fenólicos desde las partes sólidas de la uva, siempre teniendo en cuenta que otros parámetros fisiológicos como el espesor del hollejo o tamaño de las semillas pueden también influir de forma significativa (Bautista-Ortín, *et al.*, 2013; Ortega-Regules, Ros-García, Bautista-Ortín, López-Roca y Gómez-Plaza, 2008).

Otro aspecto a tener en cuenta, en cuanto a la extractabilidad de compuestos fenólicos del hollejo de uva, es la existencia de diferente material celular en las distintas capas que forman el hollejo, además de las distintas cantidades de compuestos fenólicos que se pueden encontrar en cada capa. En la cutícula no se almacenan compuestos fenólicos, estos se encuentran en las dos capas interiores del hollejo, siendo más ricas las células de la hipodermis más cercanas a la epidermis (Hidalgo Togores, 2010). Por tanto, la extractabilidad de los compuestos fenólicos depende de la eficiencia de la etapa de estrujado, donde se provoca la rotura de las bayas para liberar el mosto (Asselin y Delteil, 2003).

En la actualidad, y de forma industrial, ya se añaden enzimas a la masa de vendimia con el objetivo de favorecer o acelerar la degradación de la pared celular de los hollejos y aumentar la cantidad de color extraído (antocianos). Esta práctica también afecta a otras partes de la uva, aumentando la cantidad extraída de compuestos como los flavanoles o taninos. Estos compuestos aumentan la estructura o cuerpo del vino, pero también pueden producir efectos no deseados, como aumentos de astringencia y amargor de la bebida (Bautista-Ortín, *et al.*, 2013). Es necesario, por tanto, entender en profundidad los procesos implicados en la degradación de la pared celular de los tejidos de la uva y poder estimar con anterioridad las cantidades de las distintas familias de compuestos fenólicos que la uva va a ceder al vino.

### 3 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

La radiación electromagnética está formada por ondas que se propagan por el espacio a gran velocidad y están constituidas por campos eléctricos y magnéticos perpendiculares entre sí. Cuando la radiación incide sobre la materia, la interacción entre la radiación electromagnética y la materia puede ser muy diversa (absorción, transmisión, reflexión o dispersión).

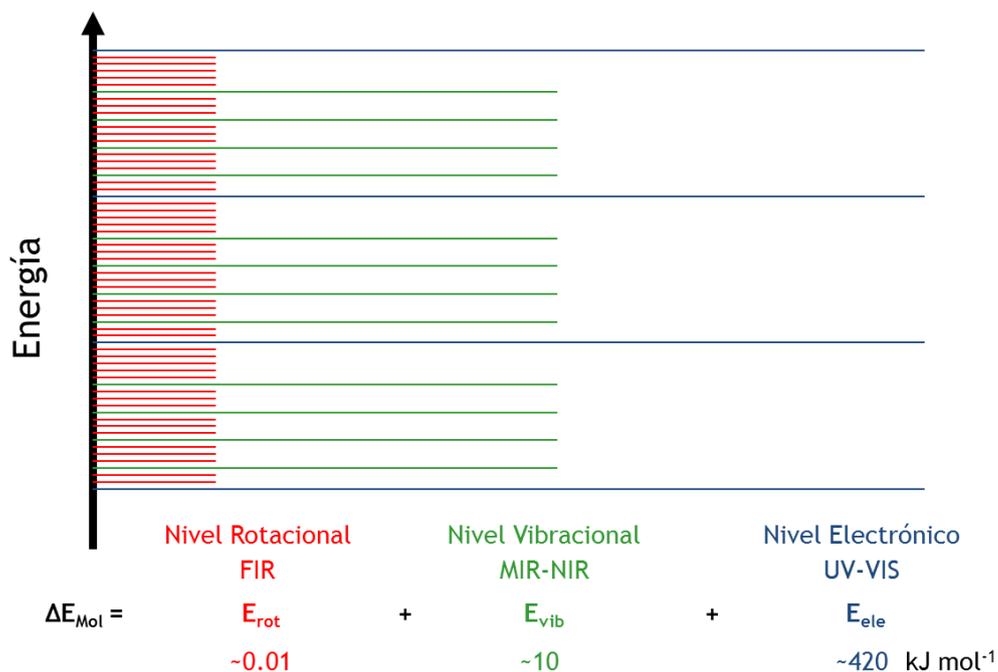
La característica común de las técnicas espectroscópicas es el uso de la interacción muestra–radiación electromagnética como vehículo para el análisis. En el caso de aplicaciones agroalimentarias, la muestra puede tener una gran variabilidad en estado de agregación, tamaño, forma, textura, etc., mientras que la radiación electromagnética usada también puede pertenecer a distintas zonas del espectro electromagnético. Por tanto, el análisis de muestras agroalimentarias mediante técnicas espectroscópicas tiene numerosas variantes en función de las características de las muestras analizadas y de la radiación electromagnética usada.

Entre las técnicas espectroscópicas, aquellas que tienen en cuenta las interacciones radiación materia a nivel molecular son de gran utilidad. Si se prescinde de la energía de los núcleos, las moléculas poseen tres clases de energía interna: energía de los electrones, energía de vibración y energía de rotación. Todas ellas están cuantizadas, de modo que solamente son posibles determinados niveles energéticos, es decir, determinadas transiciones electrónicas escogidas, así como determinadas frecuencias de vibración y de rotación. Por absorción de radiación electromagnética se puede producir una excitación de las moléculas, es decir, una transición a un estado de energía más alta. La existencia de niveles energéticos discretos tiene como consecuencia la absorción de radiación a determinadas longitudes de onda o su inversa, frecuencias. Para la energía interna de una molécula se cumple, por tanto:

$$\Delta E_{mol} = \Delta E_{el} + \Delta E_{vib} + \Delta E_{rot} \quad \text{Ec. 1}$$

Cada nivel energético está caracterizado por un determinado número cuántico y por la región del espectro a la que pertenecen las radiaciones que originan las transiciones entre niveles. Cuando la absorción de radiación provoca un cambio en el nivel rotacional de la molécula, el salto energético es relativamente pequeño. La absorción se da a una frecuencia relativamente baja y a una longitud de onda alta. Los espectros de rotación aparecen en la región de las microondas y del infrarrojo lejano (espectroscopía rotacional). Si la absorción de luz provoca un cambio en el nivel vibracional de la molécula, el salto energético se da a una mayor frecuencia o menor longitud de onda, situándose este en las regiones del infrarrojo medio o cercano (espectroscopía vibracional). Por último, si la absorción de luz provoca un cambio en el nivel electrónico donde se encuentran los electrones de enlace, se obtienen los mayores saltos

energéticos, con alta frecuencia y baja longitud de onda. En este caso la absorción aparece en la región visible o ultravioleta (Christen y Beltrán, 1977).



**Figura 4.** Niveles energéticos del enlace.

Entre las técnicas espectroscópicas más útiles para el estudio de muestras agroalimentarias están las englobadas en el término espectroscopía vibracional. Este término engloba a la espectroscopía Raman y a la espectroscopía de infrarrojo que además puede dividirse en dos técnicas claramente diferenciadas según la región del infrarrojo que utilicen (infrarrojo cercano o medio). La espectroscopía vibracional analiza las vibraciones que se producen en los enlaces de las moléculas que conforman una muestra. Cada molécula puede tener varios modos vibracionales distintos y cada modo puede cambiar en uno o más niveles vibracionales. En muestras complejas, como las que aparecen en agroalimentación, se encuentran gran variedad de moléculas poliatómicas, por lo que la espectroscopía vibracional permite obtener huellas espectrales del compuesto o muestra analizada (Byrne, Ostrowska, Nawaz, Dorney, Meade, Bonnier, *et al.*, 2014).

La espectroscopía Raman y de infrarrojo son en realidad dos técnicas complementarias. Para que un enlace molecular genere una absorción de energía en la región del infrarrojo se necesita que se produzca un cambio en el momento dipolar permanente del enlace. Sin embargo, para que se produzca el fenómeno de dispersión de Raman es necesario que cambie la polarizabilidad (momento dipolar inducido) del enlace como resultado de esta dispersión energética. Se puede demostrar que siempre que la molécula tenga centro de simetría, cualquier vibración que sea activa en Raman no lo puede ser en el infrarrojo. Esta es la llamada regla de exclusión mutua

(Peña y Muntaner, 1989). Esto implica que, en la mayoría de los casos, un único modo vibracional solo pueda ser activo para espectroscopía infrarroja o para espectroscopía Raman. Por tanto, la espectroscopía vibracional puede aportar información de una muestra desde dos puntos de vista diferentes y complementarios (Byrne, Sockalingum y Stone, 2011; Christen, *et al.*, 1977).

### 3.1 Espectrofotometría de absorción en el ultravioleta–visible

Esta técnica analítica permite cuantificar la absorción de radiación ultravioleta o visible por sustancias químicas líquidas o en disolución para después relacionar la cantidad de radiación absorbida con la concentración de determinados componentes de la muestra. Los compuestos que absorben radiación en la región de ultravioleta y visible se denominan cromóforos, especies químicas que presentan espectros relativamente específicos en estas regiones. No obstante, la posición e intensidad de los picos de absorción que aparecen en estos espectros pueden servir únicamente como orientación en la identificación de compuestos. El disolvente, pequeños cambios estructurales o la conjugación entre dos o más cromóforos pueden ocasionar cambios en los máximos de absorción (Sogorb Sánchez y Vilanova Gisbert, 2006).

Los equipos utilizados para realizar estas medidas se denominan espectrofotómetros de absorción y están formados por los siguientes componentes:

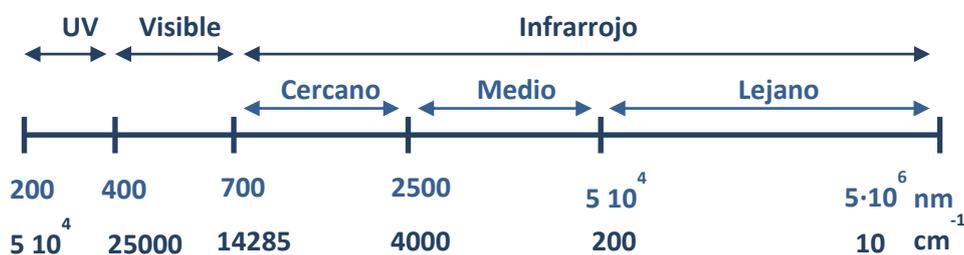
- Una fuente de iluminación que emite la radiación que posteriormente interactúa con la muestra. Comúnmente se utilizan fuentes incandescentes con filamento de wolframio para emisión de luz visible y lámparas de arco rellenas de deuterio para la emisión de luz ultravioleta.
- Un sistema monocromador que permite separar la radiación en estrechas bandas, ya sea antes o después de la interacción con la muestra.
- Un compartimento para alojar la muestra, situado de forma que el haz de luz pueda atravesar la muestra que se sitúe en él. En este compartimento se colocan celdas o cubetas apropiadas para medir en la región del espectro utilizada.
- Un sistema para la detección de la radiación que ha atravesado la muestra. Los detectores convierten la radiación electromagnética recibida en una pequeña corriente eléctrica que es medida una vez amplificada.
- Sistemas de registro de señal o almacenamiento de datos.

### 3.2 Espectroscopía de infrarrojo

La radiación infrarroja fue descubierta de forma fortuita por William Herschel en 1800. Mientras intentaba determinar el aumento de temperatura que produce la radiación solar en un termómetro, descubrió que existía una radiación invisible más allá del espectro visible. Esta radiación, que fue llamada en un principio “rayos calóricos”, es la radiación infrarroja.

Más tarde, en 1880, Samuel Pierpont Langley fue el primero en hacer una medición en infrarrojo. Desarrolló el bolómetro, un instrumento que le permitió registrar la intensidad y el espectro infrarrojo de la radiación solar. En 1903 W. W. Coblentz adquirió el primer espectro infrarrojo de compuestos y encontró características similares entre compuestos de la misma familia. En la Segunda Guerra Mundial se usaron detectores de sulfuro de plomo para detectar tropas y tanques en la oscuridad por medio del infrarrojo, y poco después, en la década de los 50 aparecieron los primeros espectroscopios de infrarrojo comerciales. Hasta entonces, el infrarrojo cercano estaba poco estudiado debido a la complejidad de sus bandas. Sin embargo, en la década de los 70, K. H. Norris acopló un espectroscopio a un ordenador consiguiendo desentrañar por primera vez el espectro NIR. Gracias a esta combinación, Norris consiguió medir el contenido proteico en cereal de forma no destructiva. A partir de este momento, de la mano de los avances informáticos, continuos avances se han estado sucediendo en el campo de la espectroscopía NIR (Rogalski, 2012).

En el espectro electromagnético, la radiación infrarroja se encuentra de forma correlativa al espectro visible, a longitudes de onda mayores y frecuencias menores ( $700 \cdot 10^6$  nm). Esta radiación se relaciona con los movimientos vibracionales y rotacionales de los enlaces moleculares. Se divide a su vez en tres zonas según su cercanía al espectro visible: infrarrojo cercano, infrarrojo medio e infrarrojo lejano (NIR, MIR y FIR por sus siglas en ingles).



**Figura 5.** Espectros ultravioleta, visible e infrarrojo.

La energía del infrarrojo medio es del orden de la energía necesaria para alterar el estado vibracional de un enlace. Energías menores (infrarrojo lejano) solo consiguen alterar los estados rotacionales de los átomos y moléculas presentes en la muestra, mientras que energías mayores

(NIR) permiten conseguir mayores saltos vibracionales, los llamados sobretonos y bandas de combinación.

En el espectro infrarrojo aparecen, por tanto, bandas de absorción en longitudes de onda pertenecientes a las regiones del infrarrojo medio y del infrarrojo cercano. Las bandas del infrarrojo medio, que, como se ha dicho, se deben a absorciones menos energéticas producidas por saltos vibracionales fundamentales, son bandas intensas y estrechas por lo general. Esto es debido a que los saltos de este tipo son relativamente frecuentes y se dan a longitudes de onda concretas para cada enlace y modo vibracional. Sin embargo, las bandas en el infrarrojo cercano son debidas a saltos vibracionales entre niveles energéticos más distantes (sobretonos) y a combinaciones de varios saltos fundamentales pertenecientes a distintos modos vibracionales. Estas bandas son, por tanto, menos intensas debido a que los cambios energéticos que las producen son menos frecuentes. Además, en la región del infrarrojo cercano los sobretonos y las bandas de combinación de los distintos enlaces presentes en las muestras agroalimentarias se superponen, complicando sobremanera la interpretación directa de esta región del espectro infrarrojo (Bokobza, 1998).

### *3.2.1 Análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano*

El análisis de imagen hiperespectral permite obtener, de manera simultánea, información espacial y espectral de una misma muestra (Sun, 2010). Esta tecnología integra las características del análisis de imagen con las de técnicas espectroscópicas, consiguiendo convertirse en pocos años en una técnica poderosa y en rápido crecimiento para el control de alimentos. Su utilidad y el motivo por el que el análisis de imagen hiperespectral está en auge radican en la esencia del funcionamiento de esta tecnología: en una imagen hiperespectral se encuentra asociado a cada uno de sus píxeles el espectro medio de la pequeña zona que representa este, pudiéndose llegar a relacionar la composición superficial de una muestra con el espectro de cada píxel.

Por tanto, el análisis de imagen hiperespectral se encuentra entre el análisis de imagen convencional y la espectroscopía, superando en algunos casos a ambas técnicas (Tabla 1).

**Tabla 1.** Principales diferencias entre el análisis de imagen convencional, espectroscopía y el análisis de imagen hiperespectral.

Característica	Análisis de Imagen	Espectroscopía	Análisis de imagen hiperespectral
Información espacial	✓	NO	✓
Información espectral	NO	✓	✓
Información multiconstituyente	NO	✓	✓
Construcción de imagen química	NO	NO	✓
Facilidad de extracción de información espectral	NO	NO	✓

Las técnicas de imagen hiperespectral, al igual que la mayoría de las técnicas de análisis espectroscópico, pueden ser desarrolladas para trabajar usando reflectancia, transmisión o fluorescencia. En el campo del análisis de alimentos se pueden encontrar ejemplos de las tres (Baiano, Terracone, Peri y Romaniello, 2012; Barbin, Elmasry, Sun y Allen, 2013; Kim, Kim, Chen y Kong, 2004; Yoon, Lawrence, Smith, Park y Windham, 2008), aunque lo más común es trabajar con reflectancias, que pueden transformarse fácilmente en absorbancias aparentes.

$$A = \log\left(\frac{1}{R}\right) \quad \text{Ec. 2}$$

Para la industria de los alimentos el análisis de imagen hiperespectral tiene un gran interés ya que permite conseguir una información precisa y detallada, pero sobre todo de forma más rápida que otras tecnologías. Es una técnica no destructiva y perfectamente apta para aplicaciones *on-line*, las cuales, requieren una rápida respuesta para que otros equipos actúen de forma inmediata. Las características de esta técnica la hacen muy apropiada para la realización de dos procesos muy comunes en la industria de alimentos: la identificación de productos con una determinada cualidad y la determinación de la composición de los productos de interés.

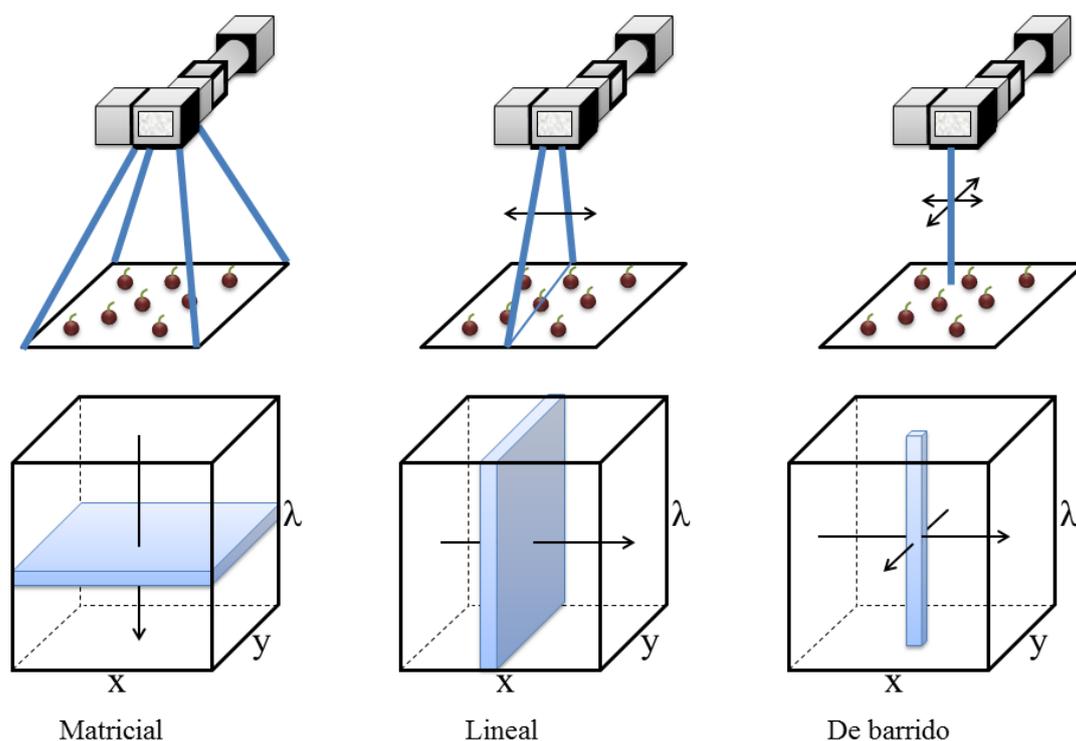
Para la realización del análisis de imagen hiperespectral no es necesaria una preparación de muestra tediosa, ya que la captura de la imagen se realiza sobre el alimento en su estado original. Además, es un método de análisis no contaminante y seguro, pues no necesita del uso de reactivos químicos. Una vez puesto a punto, tiene grandes ventajas económicas con respecto a análisis tradicionales, es más rápido, requiere menos inversión en reactivos y no genera residuos. Por último, el hecho de ser una técnica no invasiva ni destructiva permite la utilización de la misma muestra para realizar otros análisis tras la captura de los datos hiperespectrales (Sun, 2010).

En el análisis de imagen hiperespectral se genera un espacio tridimensional de datos compuesto por la información espacial en forma de píxeles y el espectro de cada píxel. Este conjunto de datos es conocido como hipercubo. Tras la adquisición de datos existe la posibilidad de seleccionar determinadas regiones de interés (ROI por sus siglas en inglés). Esta selección se puede hacer de forma previa o posterior a la adquisición y es usada para seleccionar objetos con una determinada característica espectral.

Con esta técnica se consigue una buena resolución espectral y es posible realizar estudios cualitativos y cuantitativos para determinar uno o varios parámetros de forma simultánea. Otra característica interesante del análisis de imagen hiperespectral, al menos para muestras relativamente grandes o con cierta heterogeneidad, es que se puede realizar un mapa de composición de la muestra debido a que la composición está íntimamente relacionada con el espectro y a que se dispone de información espacial de la muestra.

De forma orientativa, los equipos de adquisición de imágenes hiperespectrales constan de una fuente de iluminación, con un espectro de emisión adecuado para medir en la zona del espectro electromagnético donde el detector es sensible, una zona de medida o porta muestras, un sistema óptico de recogida y guiado de la radiación electromagnética proveniente de la muestra (lentes, espejos, fibra óptica, etc.), un elemento dispersivo o espectrógrafo que permite separar la radiación en las distintas longitudes de onda, un detector y un sistema informático que permite gobernar el instrumento, guardar y tratar los datos adquiridos.

La combinación de sensor, espectrógrafo y sistema óptico que utilice una cámara hiperespectral permite clasificarlas en cámaras matriciales, lineales o de barrido. Los sistemas matriciales adquieren imágenes monocromáticas de la zona de medida y con la ayuda de un filtro sintonizable varían la longitud de onda de adquisición formándose así el hipercubo. Es necesario, por tanto, el uso de sensores matriciales. Los sistemas lineales adquieren de forma simultánea una dimensión espacial y la dimensión espectral. Mediante el movimiento de la muestra, o un sistema de escaneo consistente en un espejo giratorio, escanean la dimensión espacial restante construyendo así el hipercubo. Estos sistemas utilizan sensores lineales. Finalmente, los sistemas de barrido adquieren el espectro punto a punto y barren las dos dimensiones espaciales para formar el hipercubo a medida que escanean toda la muestra (Boldrini, Kessler, Rebnera y Kessler, 2012).



**Figura 6.** Distintas geometrías de medida en análisis de imagen hiperespectral.

Los dispositivos de adquisición de imágenes hiperespectrales más utilizados en agroalimentación usan detectores sensibles en la zona del visible o del infrarrojo cercano. Son detectores compuestos a base de semiconductores que utilizan el efecto llamado unión p-n. Este efecto consiste en la unión de dos semimetales dopados con impurezas que permiten tener una estructura con electrones o huecos con cierta libertad de movimiento. Al incidir radiación electromagnética sobre el detector, se produce un movimiento de los electrones o huecos que puede ser fácilmente contabilizado y relacionado con la radiación recibida (Rogalski, 2003). Este tipo de detectores son usados en una amplia zona del espectro electromagnético. Los detectores a base de silicio trabajan principalmente en la zona visible del espectro aunque son sensibles también en una pequeña parte de la región del infrarrojo cercano (hasta 1000 nm). Sin embargo, el más utilizado en esta región es el detector InGaAS, el cual tiene gran sensibilidad, rápida respuesta y funciona en un gran intervalo espectral dentro de esta región, desde 900 a 1700 nm o incluso hasta 2500 nm si se incrementa la proporción de Indio en la aleación, aunque esto genera una menor relación señal-ruido (Rogalski, 2003; Sun, 2010).

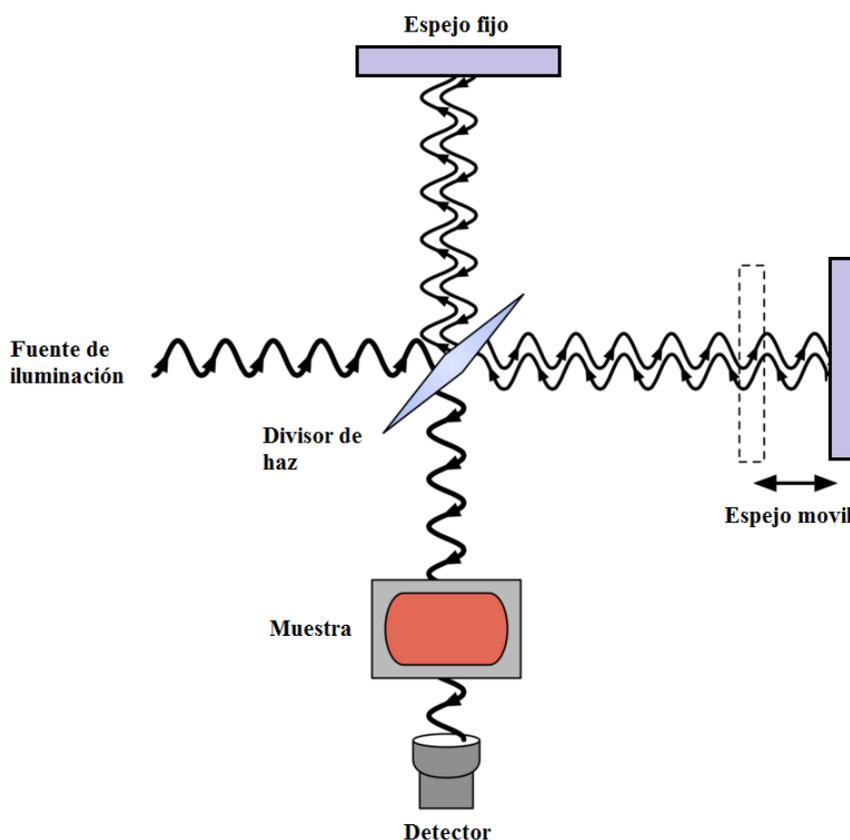
El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano y su aplicación a la industria alimentaria han sido ampliamente estudiados. Se ha aplicado extensamente en carnes (cerdo, pollo y carnes rojas) para determinar distintos atributos de calidad y composicionales así como para caracterización y autenticación (Barbin, ElMasry, Sun y Allen, 2012; Barbin, *et al.*, 2013; Gou, Santos-Garcés, Høy, Wold, Liland y Fulladosa, 2013; Kamruzzaman, Barbin, Elmasry,

Sun y Allen, 2012; Kamruzzaman, ElMasry, Sun y Allen, 2012). Además se han realizado numerosos estudios en fruta usando esta región del espectro electromagnético para controlar deficiencias de nutrientes, desperfectos y otros parámetros relevantes como el contenido en sólidos solubles (Guo, Zhao y Dong, 2016; Ji-Yong, Xiao-Bo, Jie-Wen, Kai-Liang, Zheng-Wei, Xiao-Wei, *et al.*, 2012; Lu, 2003; Nicolai, Lötze, Peirs, Scheerlinck y Theron, 2006). En particular, una fruta ampliamente estudiada es la uva, que está entre las más consumidas, produciéndose anualmente del orden de 70.000 toneladas a nivel mundial (OIV, 2012). Existen numerosos estudios que utilizan análisis de imagen hiperespectral para determinar parámetros de interés vitivinícola en uva. Entre ellos, se aplica análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano para predecir contenidos de compuestos fenólicos tanto en la baya completa como en la semilla (Chen, Zhang, Ning, Liu, Zhang y Yang, 2015; F.J. Rodríguez-Pulido, Hernández-Hierro, Nogales-Bueno, Gordillo, González-Miret y Heredia, 2014), caracterización de semillas (F.J. Rodríguez-Pulido, Barbin, Sun, Gordillo, González-Miret y Heredia, 2013) y en la caracterización de subproductos de vinificación (M.J. Jara-Palacios, Rodríguez-Pulido, Hernanz-Vila, Escudero-Gilete y Heredia, 2016).

### 3.2.2 *Espectroscopía en el infrarrojo mediante transformada de Fourier*

A diferencia de la espectroscopía dispersiva, la espectroscopía de transformada de Fourier en el infrarrojo (FT-IR) no necesita de un espectrógrafo que difracte la luz que llega al detector. En su lugar, consta de un elemento, llamado interferómetro, que divide el haz de luz proveniente de la fuente de iluminación en dos haces. Ambos haces recorren caminos distintos, uno de ellos con una longitud variable y pasando por la muestra. El diferente camino óptico genera una diferencia de fase entre ambos haces además de diferencias espectrales debidas a que uno de los haces interacciona con la muestra.

El interferómetro genera interferencias constructivas o destructivas, según la posición del espejo móvil, y el detector mide la intensidad de esta radiación. Posteriormente, el sistema informático permite, con la ayuda de la transformada de Fourier, obtener el espectro de la muestra medida.



**Figura 7.** *Diagrama esquemático de un interferómetro de Michelson.*

En este tipo de equipos, la luz proveniente de la muestra puede guiarse de forma muy eficiente hacia el detector debido a que no es necesaria la utilización de una rejilla que seleccione la longitud de onda que llega al detector en cada momento. Por tanto pueden medirse todas las longitudes de onda de forma simultánea. Esto ayuda además a mejorar la relación señal–ruido con respecto al ruido térmico. Por último, estos equipos permiten obtener espectros con una alta resolución de una forma más rápida que en los equipos dispersivos. Estas ventajas han provocado que la espectroscopía de transformada de Fourier en el infrarrojo haya sido ampliamente usada en detrimento de la espectroscopía de difracción (Siesler, Ozaky, Kawata y Heise, 2002).

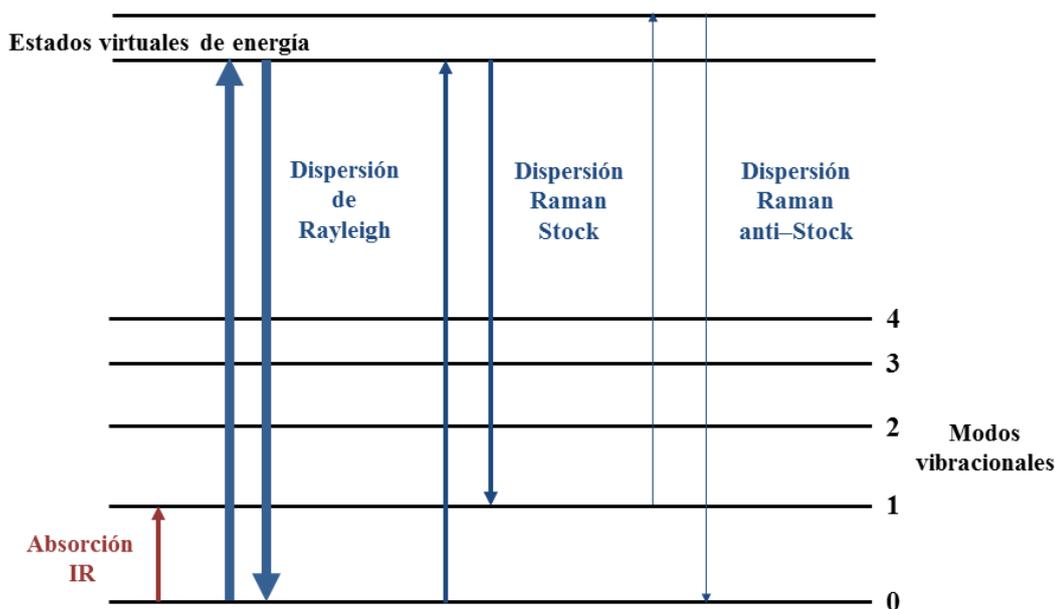
### 3.3 Espectroscopía Raman

El efecto Raman fue teorizado y demostrado por C. V. Raman en 1928 (Raman y Krishnan, 1928) basándose en el ya aceptado efecto de dispersión inelástica de la radiación de rayos X. Raman demostró que además de la dispersión elástica (Rayleigh o Mie), en la cual la radiación dispersada no sufre cambios de energía, la radiación electromagnética puede ser dispersada de forma inelástica, es decir, con variación energética. Estos cambios energéticos están asociados a

cambios en los estados vibracionales de los enlaces. Como resultado del descubrimiento de esta radiación surgió una nueva forma de espectroscopía, la espectroscopía Raman, que complementa a la espectroscopía en el infrarrojo.

Una molécula puede absorber un fotón si la energía de este coincide con la diferencia energética entre dos niveles cuánticos. Sin embargo, la colisión entre fotón y molécula también puede dispersar el fotón independientemente de la energía de este. La mayoría de los fotones dispersados no sufren ningún cambio en su frecuencia y energía (dispersión elástica), pero una pequeña fracción intercambia energía con la molécula durante la colisión (dispersión inelástica), produciéndose así el llamado efecto Raman. La dispersión inelástica puede provocar aumentos o disminuciones de la energía del enlace que generan, respectivamente, líneas Stokes o anti-Stokes en el espectro Raman. Estas variaciones energéticas son debidas a cambios en los estados vibracionales o rotacionales de los enlaces presentes en la molécula, por lo que los desplazamientos energéticos de los fotones dispersados frente a los fotones incidentes son medidas directas de los distintos modos vibracionales o rotacionales de la molécula.

Debido a que a temperatura ambiente muy pocas moléculas se encuentran en un estado vibracional excitado, la probabilidad de que un fotón interactúe con una molécula que se encuentre en estado excitado es mucho menor que la probabilidad de que lo haga con una molécula en estado energético fundamental. Es por esto que la intensidad de las señales Raman tipo Stokes es mucho mayor que la de las señales tipo anti-Stokes.



**Figura 8.** Representación esquemática de los estados energéticos por los que pasa una molécula durante las dispersiones de Rayleigh y Raman en comparación con la absorción fundamental en el infrarrojo.

Mientras que las absorciones medidas por la espectroscopía de infrarrojo están provocadas por transiciones vibracionales con energías confinadas en la región infrarroja del espectro, el efecto Raman, al ser provocado por una dispersión energética, puede aparecer en cualquier región del espectro electromagnético. Por tanto, la espectroscopía Raman es una técnica extremadamente versátil ya que puede ser llevada a cabo excitando en las regiones UV, visible o infrarrojo cercano. Otra gran ventaja de la espectroscopía Raman frente a la espectroscopía en el infrarrojo radica en el hecho de que la molécula de agua es prácticamente pasiva frente al efecto Raman. Por tanto, los espectros Raman no están dominados por las bandas pertenecientes al agua, como ocurre en el infrarrojo. Esto es de gran utilidad a la hora de medir muestras biológicas.

La espectroscopía Raman ha evolucionado de la mano del desarrollo tecnológico. La aparición del láser aportó una fuente de luz monocromática con gran intensidad lumínica que permitió superar el problema de la poca intensidad del efecto Raman. Además el desarrollo de láseres que emiten en el infrarrojo evitó los problemas de fluorescencia que provocan las fuentes que emiten en las regiones ultravioleta y visible. La aparición de los interferómetros permitió construir equipos FT-Raman que se beneficiaban de las mismas ventajas que los espectroscopios FT-IR. Sin embargo, estos sistemas tenían baja sensibilidad. Posteriormente, los detectores CCD (*charge-coupled device*) permitieron volver a equipos dispersivos, superando así los problemas de sensibilidad. Finalmente, el uso de filtros de banda estrecha, sistemas multicanales de detección de señal y el desarrollo de la tecnología led ha permitido que la espectroscopía Raman se establezca como una herramienta de laboratorio, relativamente asequible a nivel económico, que rivaliza con la espectroscopía de infrarrojo convencional (Byrne, *et al.*, 2011).

## 4 COLORIMETRÍA TRIESTÍMULO

El color es la respuesta mental al estímulo que una radiación luminosa visible produce en la retina, y que el nervio óptico transmite al cerebro. Es un concepto psicofísico al implicar un fenómeno físico (la radiación electromagnética visible) y un fenómeno psíquico (interpretación por parte del cerebro de las señales que los receptores de la retina reciben). No es, por tanto, una propiedad intrínseca del objeto que refleja o transmite la radiación electromagnética, pues cambios en la fuente de iluminación o en el observador bastan para modificar el estímulo producido. Depende, de la distribución espectral de la radiación incidente, de la capacidad del objeto para transformarla y de la fisiología del observador.

Se conoce como luz, o radiación luminosa a cualquier radiación electromagnética que tenga la capacidad de estimular el sistema visual humano. La interacción entre la luz y un objeto provoca la absorción de parte de esta energía por algunas de las moléculas que forman parte del objeto, mientras que el resto de la energía es transmitida o reflejada. La luz que llega al observador será una mezcla de las radiaciones no absorbidas por ese objeto. Los receptores capaces de ser estimulados por la radiación lumínica no absorbida por el objeto se encuentran en la retina y se denominan conos. Existen tres tipos de conos diferenciados entre sí por la longitud de onda a la que se estimulan. Uno lo hace con radiaciones correspondientes a la región del verde, otro con las del rojo y otros con las del azul. A partir de las señales de esos tres tipos de conos el cerebro es capaz de interpretar todos los colores.

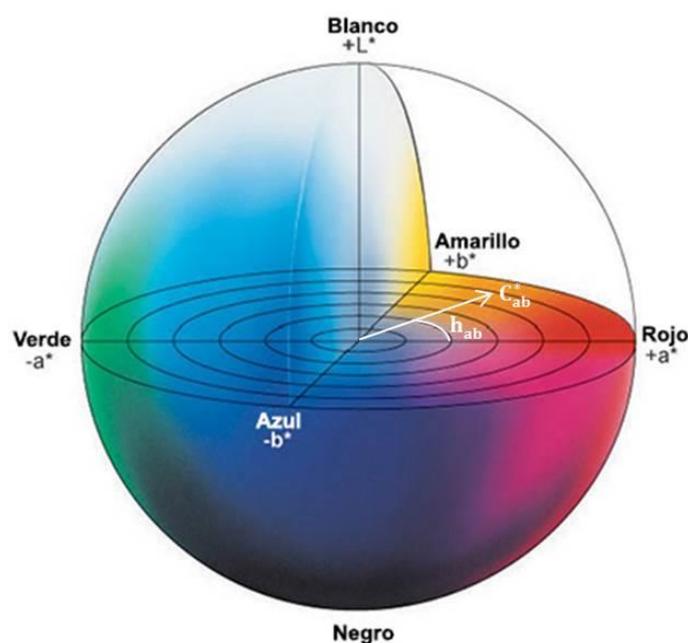
El estímulo cromático está compuesto por tres sensaciones bien diferenciadas: tono, luminosidad y saturación, que definen cualquier color. El tono o matiz, es un atributo cualitativo y nos permite clasificar los colores en rojizos, azulados, etc. Está relacionado con las diferencias de absorbancia de la energía radiante a diferentes longitudes de onda. La luminosidad o brillo es la característica que permite clasificar un color como claro u oscuro y considerarlo dentro de la escala de grises, entre el negro y el blanco. Es una medida relativa entre la luz reflejada y absorbida. Finalmente, la pureza o saturación determina para cada matiz su grado de diferencia frente al gris del mismo brillo.

La colorimetría estudia la especificación numérica del color de un estímulo visual definido físicamente de manera que: estímulos con la misma especificación y bajo las mismas condiciones de observación aparecen iguales para un observador con visión normal de los colores, estímulos que aparecen iguales poseen la misma especificación y los números que comprende la especificación son funciones continuas de los parámetros físicos que definen la distribución de energía radiante espectral del estímulo.

El color queda definido por tres componentes (uno por cono) denominados valores triestímulo que representan la respuesta de cada uno de los conos envía al cerebro ante un estímulo luminoso.

Cada fuente de luz tiene un espectro de emisión (representación de la cantidad de luz emitida a cada longitud de onda) característico y ninguna fuente de luz es equienergética, es decir no existe ninguna fuente que emita la misma cantidad de luz en todas y cada una de las longitudes de onda que constituyen el espectro visible. Con el objetivo de estandarizar las coordenadas de color y facilitar el intercambio y comparación de datos entre laboratorios, la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE) recomienda, para colorimetría general, utilizar unos estándares en la fuente de iluminación y también en el observador. Como fuente de iluminación propone distribuciones espectrales relativas (iluminantes) para varios tipos de fuentes, siendo el iluminante D65 el que la CIE recomienda en la mayoría de los casos. El iluminante D65 está relacionado con la radiación que emite un cuerpo negro a la temperatura de 6500 K, cuya luz emitida sería parecida a la luz de un día con el cielo totalmente cubierto. Como observador estándar, la CIE recomienda el observador de 10°, que recoge las funciones de igualación de color (series de valores triestímulo espectrales de cada estímulo monocromático en un determinado sistema de estímulos primarios) para un campo visual de 10°.

La CIE ha propuesto distintos sistemas de representación del color buscando uno que refleje la sensación visual percibida por el observador. De todos los propuestos, el espacio de Color CIE 1976  $L^*a^*b^*$  (CIELAB) es el más empleado en la actualidad y es recomendado por la CIE.



**Figura 9.** *Espacio de Color CIE 1976-( $L^*a^*b^*$ ).*

El espacio CIELAB es un espacio esférico (Figura 9) donde  $L^*$  representa la claridad,  $a^*$  y  $b^*$  son las coordenadas colorimétricas,  $C_{ab}^*$  el croma y  $h_{ab}$  el tono. La claridad presenta valores desde 0 a 100, de más oscuro a más claro, englobando la escala de grises para valores nulos de cromaticidad. El tono es el ángulo de la circunferencia y está comprendido entre  $0^\circ$  y  $360^\circ$ , y el croma es la distancia entre el eje de la luminosidad y el estímulo en cuestión

### 4.1 Análisis colorimétrico de imágenes digitales

El uso de cámaras digitales para la medida del color se ha desarrollado y extendido rápidamente en los últimos años debido a la calidad de las imágenes que pueden ser obtenidas mediante el uso de estos dispositivos. La cámara digital permite cuantificar no solo el color de los objetos mediante una fotografía, sino también su forma, tamaño y textura (Zheng y Sun, 2008).

Sin embargo, el uso de la cámara digital para la evaluación del color tiene limitaciones. Estos dispositivos utilizan el espacio de color RGB, el cual depende del dispositivo con el que se adquiera o donde se muestre la imagen, con lo que la reproducibilidad de las medidas es limitada. Además, la falta de linealidad entre los valores RGB y los valores triestímulo hace que la transformación entre ambos sistemas no sea inmediata.

Para solventar las limitaciones que suponen la dependencia del dispositivo, algunos autores realizan las medidas manteniendo constantes las condiciones de medida (Du y Sun, 2008; Foca, Masino, Antonelli y Ulrici, 2011). Sin embargo, lo más adecuado es transformar los datos obtenidos en el espacio de color RGB a un espacio de color uniforme como es el CIELAB. Para hacer esto, es necesario caracterizar la cámara mediante el uso de materiales de referencia, con valores triestímulo conocidos, que permiten realizar la transformación de un sistema a otro mediante ajustes por mínimos cuadrados, interpolación frente a una tabla de datos o mediante el uso de redes neuronales (F. J. Rodríguez-Pulido, 2013).



## 5 CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

La cromatografía se define como el conjunto de técnicas utilizadas para la separación de los componentes de una mezcla sobre la base de su diferente movilidad en un medio poroso (fase estacionaria) cuando son arrastrados por un fluido (fase móvil o eluyente) (Sogorb Sánchez, *et al.*, 2006).

La cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) ha surgido mediante la evolución sufrida durante los últimos 50 años por los sistemas de cromatografía líquida (Sogorb Sánchez, *et al.*, 2006). Inicialmente, las columnas de cromatografía líquida tenían una longitud de varias decenas de centímetros, un diámetro interno de entre 10 y 50 mm y un relleno de entre 100 y 200  $\mu\text{m}$  como fase estacionaria. Mediante bombas peristálticas y con la ayuda de la gravedad se hacía pasar la fase móvil a través de estas columnas alcanzando un flujo máximo de 0.5mL/min. Los intentos de alcanzar flujos mayores mediante aumentos de presión generaban pérdidas de eficiencia y rápidos deterioros de los equipos.

Pronto se encontró que disminuciones en el tamaño de partícula y mejoras en su empaquetamiento producían un aumento en la cantidad de centros activos separadores, resultando en mejoras en la eficiencia de separación. De esta forma se pudo reducir el tamaño de las columnas sin menoscabar la separación conseguida. Estas nuevas columnas necesitaban una mayor presión para operar a flujos aceptables, por lo que se substituyó el vidrio por metal, y tenían una menor capacidad de carga, es decir, aceptaban menor cantidad de muestra para analizar. Por consiguiente, fue necesario el desarrollo de detectores capaces de registrar señales originadas por muy pequeñas cantidades de electrolito.

### 5.1 Componentes de un equipo HPLC

Los componentes básicos e imprescindibles que conforman un equipo HPLC son: bomba impulsora de disolvente, sistema de inyección de muestras, columna y sistema de registro. Además, todos estos componentes están comunicados entre sí, controlados y sincronizados mediante un sistema informático (Sogorb Sánchez, *et al.*, 2006).

#### 5.1.1 Bombas

La bomba es el sistema encargado de impulsar la fase móvil. Absorbe el disolvente del recipiente contenedor, normalmente una botella, por una tubería de teflón de varios mm de diámetro y lo desplaza presurizado por todo el sistema a través de un tubo capilar de acero de entre 0.1 y 0.25 mm de diámetro. Normalmente se dispone de varias bombas (cada una de las

cuales puede tener más de una línea) para poder hacer cambios en la composición de la fase móvil.

Existen dos tipos de bomba, la bomba de desplazamiento positivo y la bomba de pistón con movimiento de vaivén. La bomba de pistón con movimiento de vaivén puede mantener el flujo por tiempo indefinido; por el contrario las bombas de desplazamiento positivo deben ser rellenadas cada vez que se agota el volumen de la jeringa.

### 5.1.2 *Inyectores*

El inyector es el dispositivo encargado de introducir la muestra en la corriente de fase móvil que fluye desde la bomba hacia la columna. El mayor requisito que debe cumplir es el de inyectar la muestra en el sistema sin alterar significativamente el flujo.

Existen principalmente dos tipos de inyectores: manuales y automáticos. Los manuales han sido montados en equipos hasta principios de siglo por lo que aún pueden encontrarse fácilmente. Requieren la presencia física del operador en el momento del inicio del cromatograma, lo que es un gran inconveniente que derivó en el desarrollo de inyectores automáticos.

Los inyectores automáticos incorporan bandejas de muestras donde pueden almacenarse viales preparados para la inyección, siendo posible analizar un gran número de muestras sin intervención directa del operador. Además, su uso mejora notablemente la precisión y reproducibilidad de los procesos. En este caso es el equipo el que se encarga de tomar un volumen fijado de muestra e introducirlo en el flujo.

### 5.1.3 *Columnas*

Las columnas analíticas de HPLC son cilindros de acero de entre 10 y 25 cm de longitud y 4–5 mm de diámetro interno. La fase estacionaria se halla en el interior de los cilindros, siendo lo más común fases estacionarias en fase reversa a base de sílice químicamente modificada mediante la inclusión de cadenas de hidrocarburos. Pueden encontrarse columnas con cadenas constituidas por 8 y por 18 átomos de carbono (C8 y C18 respectivamente) siendo más usadas estas últimas. El tamaño de partícula de la fase estacionaria oscila entre 2 y 10  $\mu\text{m}$ , dimensiones que se consideran el mejor compromiso entre capacidad, consumo de fase móvil, velocidad de elución y resolución.

### 5.1.4 Fases móviles

Existe una gran variedad en cuanto a fases móviles dependiendo de las características de los analitos que componen la muestra. Para muestras con composición polifenólica usualmente se usa como fase móvil un gradiente binario, formado por un solvente polar acidificado y otro menos polar.

Los modificadores orgánicos que más comúnmente se utilizan en las fases móviles son el acetonitrilo y el metanol. Habitualmente se acidifican las fases móviles para reducir la cola de los picos cromatográficos. Los acidificadores más frecuentes son el ácido acético, el ácido fórmico y el ácido trifluoroacético, siendo este último menos corrosivo y permitiendo mejorar la reproducibilidad de los tiempos de retención de antocianos (Lopes-da-Silva, de Pascual-Teresa, Rivas-Gonzalo y Santos-Buelga, 2002).

### 5.1.5 Detectores

El detector es un dispositivo electrónico que registra una propiedad físico-química del material eluido por la columna en función del tiempo. Los detectores actuales tienen sensibilidades del orden de nanogramos.

El sistema de detección más habitual en HPLC es la detección ultravioleta/visible (UV-Vis), utilizando fotodiodos matriciales como sensores. Sin embargo, también se usan sistemas de detección por fluorescencia o electroquímica cuando la absorbancia de los compuestos en UV-Vis es muy baja. No obstante, la detección mediante espectrómetro de masas ha progresado mucho en las dos últimas décadas por ser el detector más sensible, selectivo y universal de los existentes.



## 6 QUIMIOMETRÍA

La quimiometría es una disciplina que utiliza las matemáticas, la estadística y la lógica formal para diseñar o seleccionar los procedimientos óptimos de experimentación y proporcionar la máxima información analizando los datos y sistemas químicos (Vandeginste, Massart y Buydens, 1998).

Atendiendo al tipo de información que se necesite obtener (respuesta categórica o de escala) los métodos se dividen en cualitativos o cuantitativos.

Los cualitativos o métodos de reconocimiento de pautas, se pueden subdividir en métodos supervisados y no supervisados, dependiendo de si se conoce o no *a priori*, si el objeto pertenece a una clase determinada. Los métodos no supervisados buscan agrupamientos en un espacio  $n$ -dimensional sin conocer las clases a las que pertenece el objeto; sin embargo, en los supervisados se tiene un conocimiento previo de las clases y posteriormente, tras generar el modelo, se obtiene a cuál de ellas pertenece un determinado objeto.

En el caso de los métodos cuantitativos, se puede hacer una primera división entre métodos univariantes y multivariantes. Dentro de éstos se distingue entre modelos lineales y no lineales dependiendo del tipo de función matemática que presente su algoritmo. Tradicionalmente, los modelos lineales han sido los más empleados debido a su mayor sencillez. Si se opera con las variables originales, se utiliza la regresión lineal múltiple, y cuando se trabaja con variables reducidas, se usa la regresión por componentes principales o la regresión por mínimos cuadrados parciales (Brereton, 2003; Vandeginste, *et al.*, 1998).

### 6.1 Pretratamientos espectrales

Los principales problemas que presentan los espectros en espectroscopía de infrarrojo y Raman se encuentran asociados a la dispersión de la luz, considerada en este caso desde un punto de vista macroscópico, y en el caso particular de la espectroscopía Raman a la fluorescencia. La dispersión de la luz se origina por características físicas de la muestra como el tamaño de partícula, la forma o el grado de compactación o factores externos como la temperatura o la humedad. Además, también tienen influencia aspectos relacionados con la medida instrumental, unido a la forma de los espectros en el infrarrojo cercano y en algunas regiones del infrarrojo medio con bandas muy anchas que se solapan.

En espectroscopía Raman, la iluminación usada para excitar la muestra puede producir fluorescencia. Este fenómeno se da principalmente en muestras coloreadas cuando la excitación se produce en la región UV-visible. El uso de fuentes de iluminación que emiten en el infrarrojo

cercano reduce sobremanera este efecto, aunque también reduce la intensidad de las señales Raman. Por esto, en algunos casos, incluso una débil fluorescencia puede enmascarar las señales Raman.

La combinación de los pretratamientos que se describen a continuación ofrece un amplio abanico para intentar eliminar o reducir los efectos que enmascaran, de alguna forma, la señal apropiada para el propósito analítico. Los pretratamientos comúnmente utilizados son:

*Promediado de espectros*: el promediado pretende, entre otras cosas, reducir el ruido aleatorio, y por tanto aumentar la relación señal/ruido. Es un método muy efectivo en análisis de imagen hiperespectral debido a la gran cantidad de espectros que proporciona una imagen. Sin embargo, también puede usarse en otras ramas de la espectroscopía con buenos resultados.

*Corrección del efecto multiplicativo de la dispersión MSC (Multiplicative Scatter Correction)*: los efectos de la dispersión de la luz se asocian principalmente a factores físicos como puede ser el tamaño de partícula o de muestra. Estos efectos pueden ser aditivos o multiplicativos, afectando a la relación del espectro con las propiedades químicas de la muestra. Mediante este tratamiento se pretende evitar que los efectos de la dispersión se impongan a las propiedades químicas de la muestra. La corrección se efectúa utilizando un espectro ideal, que suele ser el espectro medio del conjunto de muestras. Se realiza una regresión lineal por mínimos cuadrados entre los datos a cada longitud de onda del espectro original y los datos del espectro medio (o de referencia) para cada espectro a cada longitud de onda,  $X_{Log(1/R),i}$ , y  $\bar{X}_{Log(1/R),i}$  respectivamente, obteniendo una recta para cada  $i$ -espectro.

$$X_{Log(1/R),i} = a_i + b_i \bar{X}_{Log(1/R),i} + e_i \quad \text{Ec. 3}$$

Para cada espectro se obtiene la ordenada en el origen  $a_i$ , que representa los efectos aditivos, la pendiente  $b_i$ , que representa los efectos multiplicativos, y un término residual  $e_i$ .

La corrección de los efectos aditivos (visible si representamos la recta que define cada espectro en variaciones verticales de las mismas dentro del conjunto) se realiza mediante la sustracción del término  $a_i$  a cada valor del espectro original.

$$X_{Log(1/R),i,aditivo} = X_{Log(1/R),i} - a_i \quad \text{Ec. 4}$$

La corrección de los efectos multiplicativos (visible si representamos la recta que define cada espectro en variaciones de pendiente de las mismas dentro del conjunto) se realiza dividiendo por la pendiente  $b_i$  cada valor del espectro original.

$$X_{Log(1/R),i,multiplicativo} = \frac{X_{Log(1/R),i}}{b_i} \quad \text{Ec. 5}$$

Si queremos corregir los dos efectos (aditivos y multiplicativos) aplicaremos la corrección completa:

$$X_{Log(1/R),i,MSC} = \frac{X_{Log(1/R),i} - a_i}{b_i} \quad \text{Ec. 6}$$

En general, esta corrección mejora la linealidad de los espectros y conserva la información química a la vez que se minimizan las diferencias entre los espectros (Geladi, MacDougall y Martens, 1985); presenta el inconveniente de que es necesario realizar de nuevo los cálculos cuando se hace algún cambio en el conjunto de muestras; recalculando el espectro medio y por consiguiente todos los parámetros.

*Tipificación de la absorbancia SNV (Standard Normal Variate):* al igual que el anterior, este tratamiento intenta minimizar la dispersión debida principalmente a factores físicos, como puede ser el tamaño de partícula o de muestra. Este tratamiento se aplica individualmente a cada espectro y por tanto no necesita el cálculo de un espectro medio o de referencia, ni rehacer los cálculos si se elimina alguna muestra del conjunto inicial. Existe una relación lineal con MSC, haciendo que los resultados ofrecidos por ambos métodos sean similares (Barnes, Dhanoa y Lister, 1989).

En este método se realiza el cálculo del valor medio y la desviación estándar de los valores  $Log(1/R)$  a todas las longitudes de onda de cada  $i$ -espectro,  $\bar{X}_{Log(1/R),i}$  y  $\sigma_{Log(1/R),i}$  respectivamente. Los nuevos datos para cada  $i$ -espectro se obtienen aplicando la siguiente transformación sobre cada dato a todas las longitudes de onda de cada  $i$ -espectro,  $X_{Log(1/R),i}$ :

$$X_{Log(1/R),i,SNV} = \frac{X_{Log(1/R),i} - \bar{X}_{Log(1/R),i}}{\sigma_{Log(1/R),i}} \quad \text{Ec. 7}$$

Después de este tratamiento, cada  $i$ -espectro tiene una desviación estándar igual a 1 y una media igual a 0, siendo una distribución normal estandarizada, independiente de la escala original.

Una variante de este método, que es la utilizada en esta memoria, excluye el centrado de los datos, proporcionado por tanto  $i$ -espectros con una desviación estándar igual a uno y una media, que en este caso, no debe ser cero, produciéndose así un autoescalado de cada  $i$ -espectro que conduce a una distribución normal. La transformación realizada es la siguiente:

$$X_{Log(1/R),i_{SNV}} = \frac{X_{Log(1/R),i}}{\sigma_{Log(1/R),i}} \quad \text{Ec. 8}$$

*Corrección de la tendencia DT (Detrend)*: este tratamiento se aplica de forma individual a cada espectro e intenta minimizar la curvatura de la línea base, que surge como consecuencia del diferente tamaño de partícula o de muestra y del distinto grado de compactación en su empaquetamiento. El procedimiento consiste en ajustar cada espectro mediante mínimos cuadrados a una función cuadrática, donde la variable dependiente sea el dato a cada longitud de onda en cada  $i$ -espectro  $X_{Log(1/R),i}$  y las independientes, las longitudes de onda  $W$ . De esta manera se obtienen los coeficientes  $A$ ,  $B$  y  $C$ , y un término residual,  $e_i$ , pudiendo calcular los valores a cada longitud de onda de cada  $i$ -espectro  $\hat{X}_{Log(1/R),i}$  según la ecuación:

$$\hat{X}_{Log(1/R),i} = A + B \cdot W + C \cdot W^2 + e_i \quad \text{Ec. 9}$$

La corrección se consigue sustrayendo este valor del dato original:

$$X_{Log(1/R),i_{DT}} = X_{Log(1/R),i} - \hat{X}_{Log(1/R),i} \quad \text{Ec. 10}$$

Cada  $i$ -espectro, después de esta corrección, tiene una media igual a cero y una desviación estándar distinta a la unidad (Barnes, *et al.*, 1989).

*Derivadas*: son una herramienta muy utilizada en el procesado de los espectros en el infrarrojo cercano porque permiten disminuir sus problemas más característicos: bandas solapadas y variaciones en la línea base ocasionadas por características físicas de las muestras, como pueden ser el tamaño de partícula, empaquetamiento de muestras sólidas y otra serie de factores relacionados con las muestras y su presentación. El método para el cálculo de las derivadas emplea el método *gap* o segmento, utilizando la información de un segmento localizado en el espectro para calcular la derivada. Previamente se puede aplicar un suavizado sustituyendo los datos de un segmento por el valor promedio. La utilización de la primera derivada, pendiente de la curva espectral, elimina los términos constantes a todas las longitudes de onda, por lo que corrige desplazamientos de la línea base. La segunda derivada representa el cambio de pendiente de la curva espectral, y además, corrige los términos que varían de forma lineal con la longitud de onda. No suelen utilizarse derivadas superiores a la segunda ya que suponen un aumento del ruido en las medidas espectrales. La notación utilizada consta de 4 dígitos como  $a,b,c,d$ , siendo  $a$ , el orden de derivada,  $b$ , el número de puntos en los cuales se realiza la derivada,  $c$  el número de puntos en los cuales se realiza el primer suavizado y  $d$ , el número de puntos en los cuales se realiza el segundo suavizado (Shenk y Westerhaus, 1995). En este método de derivadas y suavizado se introduce una variable que es el segmento en el cual se realizan estas correcciones. Un segmento demasiado pequeño puede aumentar el ruido espectral,

mientras que uno demasiado grande puede hacer que no se represente el comportamiento del espectro en el resultado o eliminar información importante (Infrasoft International LLC, 2000).

*Eliminación de la línea base:* además de términos constantes y linealmente dependientes a la longitud de onda, los espectros pueden presentar otras modificaciones no lineales de la línea base, tanto en Raman como en el infrarrojo. Estas modificaciones son difíciles de eliminar mediante los tratamientos anteriores. En espectroscopía Raman suelen ser debidas a dispersiones de Rayleigh residuales que los procesos de filtrado de señal no han podido suprimir por completo o a fenómenos de fluorescencia producidos fundamentalmente por moléculas orgánicas inherentes a la muestra o provenientes de algún tipo de contaminación. En espectroscopía de infrarrojo, heterogeneidades en el sólido, contaminación lumínica o absorciones no controladas pueden provocar también este efecto. La eliminación de esta línea base permite obtener señales más fácilmente interpretables, pudiendo así dilucidar mejor las longitudes de onda donde aparecen los picos o la intensidad de estos (Goehner, 1978; Mazet, Carteret, Brie, Idier y Humbert, 2005).

Existen procedimientos que estiman la línea base usando ajustes por regresión de mínimos cuadrados. Estos procedimientos necesitan que el usuario identifique y seleccione partes de los espectros pertenecientes a la línea base, sin incluir picos espectrales (Goehner, 1978). Si se omite la selección de estas zonas la estimación de la línea base incluiría a los picos espectrales, perdiéndose así información de interés. Una vez que estos puntos son seleccionados, la regresión de mínimos cuadrados arroja resultados bastante fiables. Sin embargo, seleccionar los puntos correctos no es siempre sencillo, puede ser un proceso bastante complejo y lento si deben de ser procesados un gran número de espectros. Para automatizar el proceso de eliminación de la línea base de los espectros se han desarrollado métodos basados en la minimización de funciones de costo no cuadráticas, donde no existe la necesidad de seleccionar manualmente zonas pertenecientes a la línea base (Lieber y Mahadevan-Jansen, 2003; Mazet, *et al.*, 2005).

Los ajustes a la línea base espectral mediante funciones de costo no cuadráticas se diseñan para que a valores de error cercanos a 0 (en regiones donde la función de costo y el espectro a ajustar están próximos), el ajuste sea similar al conseguido con funciones cuadráticas. Sin embargo, para mayores errores (en regiones donde la función de costo y el espectro a ajustar no están próximos) el comportamiento del ajuste sea lineal. De esta forma, las funciones de costo no cuadráticas permiten ajustar la línea base de los espectros a funciones poligonales sin tener en cuenta los picos. En este tipo de ajustes, el usuario tiene que definir un umbral que permite que el algoritmo diferencie los picos espectrales de la curvatura natural de la curva base (Mazet, *et al.*, 2005).

*Transformada de Fourier:* el uso del interferómetro en espectroscopía implica la adquisición de datos a periodos regulares en el tiempo, por lo que se obtiene una señal en el dominio del tiempo. De esta forma se consigue una mayor velocidad de adquisición de datos que usando medios convencionales (espectroscopía de difracción). Sin embargo, el dominio del tiempo no es fácilmente interpretable, y es necesaria una herramienta que transforme la señal al dominio de las frecuencias, es decir, al dominio donde los datos aparecen ordenados según la frecuencia.

En el dominio del tiempo aparece un conjunto de series superpuestas entre sí. Cada serie en el tiempo se corresponde con un pico del espectro en el dominio de las frecuencias. Las características de cada una de las series que aparecen en el dominio del tiempo pueden relacionarse con las características del pico al que se corresponden en el dominio de las frecuencias. Así, la intensidad inicial de la serie se corresponde con el área del pico, la frecuencia de oscilación de la señal en el dominio del tiempo con la posición del pico (frecuencia) y la velocidad de declive de la señal con la anchura del pico.

La aplicación de la transformada de Fourier a una señal en el dominio del tiempo permite conseguir dos señales en el dominio de las frecuencias, el espectro real y el espectro imaginario.

$$F(\omega) = RL(\omega) - iIM(\omega) \quad \text{Ec. 11}$$

donde  $F$  es la transformada de Fourier,  $\omega$  la frecuencia,  $i$  la raíz cuadrada de  $-1$  y  $RL$  e  $IM$  las partes reales e imaginarias de la transformada, respectivamente.

Las partes reales e imaginarias son obtenidas, respectivamente, realizando una transformada en coseno y seno de los datos en el dominio del tiempo:

$$RL_{(n)} = \sum_{m=0}^{M-1} f_{(m)} \cos\left(\frac{nm}{M}\right) \quad \text{Ec. 12}$$

$$IM_{(n)} = \sum_{m=0}^{M-1} f_{(m)} \sin\left(\frac{nm}{M}\right) \quad \text{Ec. 13}$$

donde  $M$  es el número de puntos presentes en los datos originales,  $m$  se refiere a cada punto individual en los datos originales y  $n$  es un punto cualquiera de la transformada.

*Análisis de vectores característicos:* una característica común a todas las técnicas espectroscópicas es la gran cantidad de datos que recogen. En estos datos se puede encontrar información más y menos relevante, por lo que la aplicación de una técnica que permita identificar la información más importante dentro de un conjunto de datos es de gran interés. El análisis de vectores característicos permite hacer esta identificación.

Los espectros de las muestras,  $X_i$ , se pueden considerar como una familia de curvas o vectores de  $r$  dimensiones con estructura de espacio vectorial. Por lo tanto, se puede encontrar un conjunto de  $r$  vectores linealmente independientes que formen una base de dicho espacio vectorial. En la práctica, se demuestra que el número de vectores necesarios para explicar la mayor parte de las curvas es mucho menor que el número de elementos originariamente necesarios para representar la familia de curvas experimentales.

El análisis de vectores característicos permite determinar el número y la forma de una serie de curvas básicas, llamadas vectores característicos, cuya combinación lineal representa, ajustándose al máximo, la familia de curvas empíricas de partida. Los escalares que acompañan a cada uno de los vectores característicos serán las componentes de la familia de curvas respecto de ese conjunto de vectores.

Un tratamiento matemático del método consiste en lo siguiente (Lebart, Morineau y Fénelon, 1985; Simonds, 1963):

Los diferentes conjuntos de datos,  $X_i$ , se obtienen para  $r$  valores de la variable  $x$ . Para cada medida experimental  $i$ , los  $r$  valores de  $X_i$  constituyen un vector fila de datos de  $r$  columnas. Para  $n$  conjuntos de datos, los vectores pueden ordenarse para formar una matriz de datos de  $n$  filas y  $r$  columnas.

Como consecuencia de la teoría general del método es posible encontrar una serie de vectores característicos tales que, cuando son sumados en proporciones apropiadas al vector medio de datos, representan, con una buena aproximación, cualquiera de los  $n$  vectores originales.

Si se calcula la matriz de varianza-covarianza  $S$ , de la matriz original de  $n \times r$  datos de los vectores, los vectores característicos que se obtienen de esta matriz corresponden a las soluciones de la ecuación matricial:

$$S - LI = 0 \qquad \text{Ec. 14}$$

donde  $L$  es la matriz diagonal de las raíces propias e  $I$  es la matriz unitaria de  $r \times r$ .

Los vectores característicos son series de  $r$  números que forman una base del subespacio vectorial formado por todos los vectores de datos. Las respuestas para cada valor  $X_i$  vienen dadas, matemáticamente, por las ecuaciones:

$$\begin{aligned}
X_1 &= \hat{X}_1 + M_1 V_{11} + M_2 V_{21} + M_3 V_{31} + \dots + M_p V_{p1} \\
X_2 &= \hat{X}_2 + M_1 V_{12} + M_2 V_{22} + M_3 V_{32} + \dots + M_p V_{p2} \\
X_r &= \hat{X}_r + M_2 V_{1r} + M_2 V_{2r} + M_3 V_{3r} + \dots + M_p V_{pr}
\end{aligned}
\tag{Ec. 15}$$

donde  $\hat{X}_i$  son las componentes del vector media,  $V_{1i}, V_{2i}, \dots, V_{pi}$  son las componentes los respectivos vectores característicos con  $p \leq r$  y  $M_j$  son los coeficientes escalares, las proporciones en que deben sumarse los vectores característicos al vector media para obtener los vectores de datos originales.

Los vectores característicos  $V_p$  están unívocamente determinados por la familia de vectores de datos, y son suficientes para obtener todos los vectores de datos pertenecientes a la familia original de la cual han sido derivados. Sin embargo, los valores de los coeficientes  $M_j$  varían de un vector de datos a otro. Por lo tanto, los coeficientes  $M_j$  especifican completamente cada vector de datos, es decir son sus coordenadas respecto a la base encontrada.

La potencia de este método nace del hecho de que, usando unos pocos vectores característicos, puede reconstruirse un gran número de vectores de la familia de curvas original, con una aproximación suficientemente buena.

El principal inconveniente de esta metodología es que a la hora de realizar el proceso de validación es necesario recalcular los valores de los coeficientes  $M_j$  para los espectros presentes en el set de validación. Para resolver este problema, tras calcular los vectores característicos, se obtienen las expresiones que permiten calcular los coeficientes  $M_j$ . Estas expresiones son función de los datos obtenidos (absorbancias o reflectancias) para un número de valores de la variable  $x$  (longitudes de onda) igual al número de vectores característicos utilizados para hacer la reconstrucción. Una vez obtenidas estas expresiones, es posible obtener los coeficientes  $M_j$  para todos los vectores usados en la calibración y en el posterior proceso de validación. De esta forma se cumple uno de los requisitos más importantes de la metodología, validar los modelos desarrollados con muestras diferentes a las utilizadas para su desarrollo. Finalmente, para comprobar la bondad de la reconstrucción realizada mediante el método de vectores característicos es conveniente calcular algún indicador de precisión como puede ser el error cuadrático medio. Este error permite obtener el error promedio de todos los valores de la variable  $x$  de los espectros originales frente a los espectros reconstruidos.

## 6.2 Análisis cualitativos utilizados

### 6.2.1 Análisis discriminante lineal (LDA)

El análisis discriminante es un método de clasificación supervisada que crea un modelo predictivo para determinar la pertenencia de una muestra a un grupo. El modelo está compuesto por una función discriminante (o, para más de dos grupos o categorías, un conjunto de funciones discriminantes  $q - 1$ ) basada en combinaciones lineales de las variables predictoras que proporcionan la mejor discriminación posible entre los grupos. Las funciones se generan a partir de un conjunto de casos para los que se conoce el grupo de pertenencia; posteriormente, las funciones pueden ser aplicadas a nuevos casos que dispongan de datos para las variables predictoras pero de los que se desconozca el grupo de pertenencia.

El análisis discriminante es una técnica estadística capaz de determinar qué variables permiten diferenciar a los grupos y cuántas de estas variables son necesarias para alcanzar la mejor clasificación posible. La pertenencia a los grupos, conocida de antemano, se utiliza como variable dependiente (una variable categórica con tantos valores discretos como grupos). Las variables en las que se supone que se diferencian los grupos se utilizan como variables independientes o variables discriminantes. Estas variables deben ser cuantitativas continuas, o al menos, admitir un tratamiento numérico con significado. El análisis discriminante aprovecha las relaciones existentes entre las variables independientes para maximizar la capacidad de discriminación. No todas las variables independientes de las que se parte para realizar un análisis discriminante influyen en la misma medida en el resultado final. Debido a esto, existen distintos algoritmos para seleccionar las variables independientes usadas en el análisis discriminante: algoritmos de selección de variables hacia adelante, eliminación hacia atrás y de regresión por pasos.

- Los algoritmos de selección hacia adelante comienzan eligiendo la variable que más discrimina entre las  $q$  categorías. A continuación seleccionan la segunda más discriminante y así sucesivamente. Cuando ninguna de las variables que quedan por elegir discrimina de forma significativa entre los grupos analizados el algoritmo finaliza y no se seleccionan más variables.
- Los algoritmos de eliminación hacia atrás proceden de forma inversa. Se comienza suponiendo que todas las variables son necesarias para discriminar y se elimina la menos discriminante entre los grupos analizados y así sucesivamente. Cuando todas las variables no eliminadas discriminan significativamente entre los grupos analizados el algoritmo finaliza.

- Los algoritmos de regresión por pasos utilizan una combinación de los dos algoritmos anteriores. Permiten la posibilidad de rectificar, eliminando del conjunto seleccionado una variable introducida en el conjunto de discriminación en un paso anterior o introduciendo en dicho conjunto una variable previamente eliminada.

Para construir el modelo, es necesario asignar los objetos del conjunto de entrenamiento a una categoría dada. Para ello, se añade una variable categórica a la matriz de datos conteniendo tantas categorías como sean necesarias. El análisis discriminante estima los coeficientes  $a_1, a_2, \dots, a_m$ , de la función discriminante lineal,  $f$ :

$$f = a_1x_1 + a_2x_2 + \dots + a_mx_m \quad \text{Ec. 16}$$

que es capaz de predecir la pertenencia de los objetos a una u otra categoría. Por encima de un cierto valor de  $f$ , el objeto queda clasificado en una determinada categoría, y por debajo de dicho valor en otra. Si existen tres categorías, es necesario construir dos funciones discriminantes  $f_1$  y  $f_2$  que separan las distintas categorías entre sí, en general  $q - 1$  funciones, siendo  $q$  el número de categorías.

Las funciones discriminantes se construyen de una en una, buscando las direcciones del espacio que maximizan la expresión:

$$\lambda' = \frac{SC_D}{SC_I} \quad \text{Ec. 17}$$

donde  $SC_D$  es la suma de los cuadrados de las distancias euclídeas entre los objetos que pertenecen a distintas categorías, en la dirección que indica la función discriminante, y  $SC_I$  la suma de los cuadrados de las distancias euclídeas entre los objetos pertenecientes a la misma categoría, también en la dirección de la función discriminante. A partir de  $q$  categorías se obtienen  $q - 1$  funciones discriminantes, en orden decreciente de su valor de  $\lambda'$ , y manteniendo la ortogonalidad entre ellas. Por tanto, la primera función discriminante es la dirección del espacio en la que los grupos se ven más separados entre sí, y a la vez más compactos internamente. Análogamente, la segunda función discriminante es la dirección del espacio que, siendo ortogonal a la primera, cumple con el mismo criterio.

La función  $\lambda'$  no está acotada, por lo que varía solamente con el número de objetos y con la separación entre ellos. Por ello, en lugar de maximizar  $\lambda'$ , se suele minimizar la lambda de Wilks ( $\lambda_W$ ), que se define como:

$$\lambda_W = \frac{1}{1 + \lambda'} = \frac{SC_I}{SC_I + SC_D} \quad \text{Ec. 18}$$

La lambda de Wilks tiene valores entre 0 y 1. Categorías con una separación nítida, dan valores de  $\lambda_W$  cercanos a 0, mientras que categorías ampliamente solapadas dan valores cercanos a la unidad.

El análisis discriminante lineal permite además establecer una serie de curvas circulares alrededor del centroide de cada categoría. Todos los puntos situados en una misma curva tienen idéntica probabilidad de pertenecer a la categoría en cuestión. La probabilidad decrece por igual en todas las direcciones del espacio, siendo alta para puntos situados cerca del centroide de la categoría considerada, y baja para puntos alejados. Sin embargo, no es habitual su uso, evaluándose la bondad del modelo por medio del porcentaje de casos correctamente clasificados en las diferentes modalidades de validación existentes (interna, cruzada, una muestra fuera o externa) (Ramis-Ramos y García-Álvarez-Coque, 1999).

### 6.2.2 Agrupamiento mediante el algoritmo de K-medias

El agrupamiento mediante el algoritmo de K-medias es uno de los métodos no supervisados más simples para la clasificación de muestras en un número de grupos a determinar por el usuario. Este método, agrupa las muestras de acuerdo a su grado de similitud. Analiza las variables independientes y forma grupos con características similares en cuanto a estas variables. El número de grupos ( $k$ ) debe ser elegido *a priori* por el usuario, quien debe de disponer de la información necesaria para realizar esta elección.

Inicialmente, el algoritmo define  $k$  centroides maximizando la distancia que separa unos de otros. Seguidamente, cada punto perteneciente al set de datos es asignado al grupo del centroide más próximo. Cuando todos los puntos han sido asignados a un grupo, los centroides son recalculados como los baricentros de los grupos creados previamente. Tras esto, vuelven a reasignarse todos los puntos al grupo cuyo centroide es más cercano y se recalculan los centroides. El proceso se repite hasta que el cálculo de los centroides arroja unos resultados suficientemente similares a los del paso anterior dando por finalizado el proceso iterativo (MacQueen, 1967).

### 6.2.3 Análisis de componentes principales (PCA)

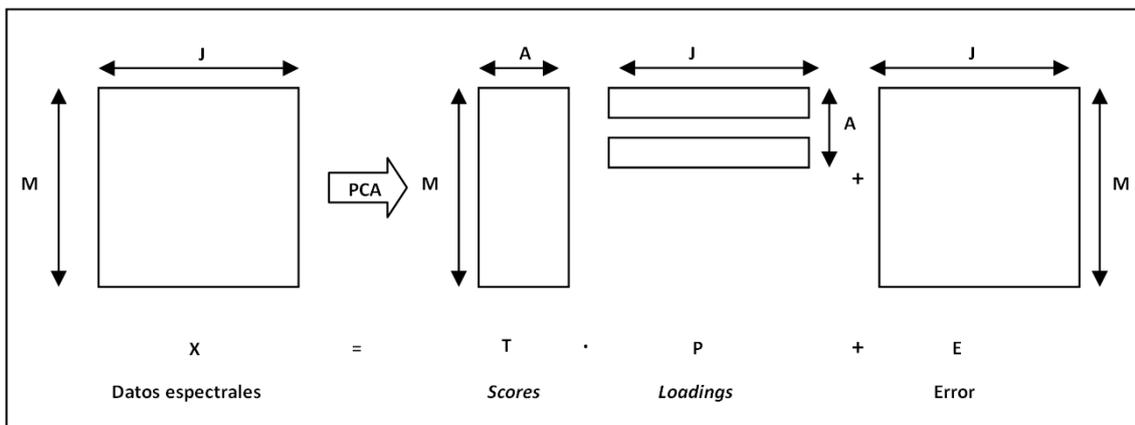
El análisis de componentes principales (PCA), es un método de análisis quimiométrico cualitativo habitual en análisis multivariante. Mediante reconocimiento de pautas, el objetivo es reducir el número de variables iniciales, sin perder información y así poder observar estructuras y tendencias en las muestras.

El PCA (Deane, 1992) consiste en:

- Estimar la dimensionalidad real de los datos de las muestras estudiadas; y reducir esta dimensionalidad manteniendo la información relevante del sistema.
- Calcular un nuevo sistema de coordenadas, para lo que se buscan las direcciones que expliquen la máxima variabilidad en los datos de las muestras. Estos nuevos ejes se denominan componentes principales (PCs). Así el primer componente principal es la dirección que explica la máxima variabilidad de los datos de las muestras; el segundo, se escoge de forma que sea perpendicular al primero, y que explique la máxima variabilidad de los datos de las muestras una vez restada la explicada por el primer componente principal y así sucesivamente.
- Definir estos nuevos ejes matemáticamente, mediante cargas o pesos (*loadings*) que son los cosenos de los ángulos que forman cada uno de estos nuevos ejes con los antiguos, y las puntuaciones (*scores*) que son las coordenadas en estos nuevos ejes, de tal forma que:

$$\text{Espectro de la muestra} = (\text{score } 1) (\text{loading } 1) + (\text{score } 2) (\text{loading } 2) + \dots + \text{ruido espectral } (E \sim \text{residual})$$

Los componentes principales se pueden interpretar geoméricamente de tal forma que el espectro medido a  $J$  longitudes de onda, constituye un conjunto de  $J$  variables que puede ser descrito como un vector. Se puede construir un espacio de  $J$  dimensiones, de tal manera, que cada dimensión corresponda a una de las longitudes de onda, y se pueda representar el mismo objeto como un punto en ese nuevo espacio. Si tenemos  $M$  muestras, se pueden representar como  $M$  puntos en el espacio de  $J$  dimensiones. El objetivo del PCA es hallar las direcciones en que están agrupados los  $M$  puntos de los objetos en el espacio de  $J$  dimensiones, y reducir el sistema inicial  $J$  dimensional a uno  $A$  dimensional, con  $A < J$  manteniendo la información relevante del sistema. Geométricamente es un cambio de ejes, representando esas muestras en un sistema de coordenadas con un número inferior de ejes al utilizado inicialmente.



**Figura 10.** Descomposición de un conjunto de espectros mediante análisis de componentes principales.

Otra propiedad muy importante de los PCs es la ortogonalidad. El método busca las direcciones ortogonales que expliquen la máxima variabilidad de los datos de las muestras, utilizando estas direcciones como nuevos ejes de coordenadas o PCs.

Resumiendo, el PCA se utiliza para reducir el número de variables originales correlacionadas, a un número de variables no correlacionadas en un nuevo sistema de ejes ortogonales denominados PCs.

El método para el procesado de datos o escalado será un centrado de datos, el valor medio corresponde al centro del modelo y los valores de todas las variables se refieren a ese centro.

La detección de espectros fuera de la población (*outliers*) se lleva a cabo utilizando la distancia de Mahalanobis ( $H$ ). Se establece la diferencia espectral de una muestra respecto a la media espectral del conjunto de muestras ( $H$ ), tomando como valor límite  $H = 3$ , de forma que aquellos espectros cuya distancia  $H$  sea superior a 3.0 se desechan. Las muestras con los datos espectrales originales se ordenan de acuerdo con la distancia de Mahalanobis ( $H$ ) obtenida anteriormente, esto resulta muy útil en procesos posteriores a la hora de construir los grupos de validación cruzada, de manera que los subgrupos resulten homogéneos. También mediante este proceso de análisis de componentes principales se puede observar qué muestras resultan espectralmente diferentes, sin rebasar el valor de  $H = 3$ , con objeto de decidir su inclusión en el conjunto de calibración.

Mediante este análisis de componentes principales se puede determinar si una nueva muestra está dentro del espacio determinado por el conjunto de calibración cuantitativa mediante la distancia de Mahalanobis ( $H$ ) con valor límite de 3, antes de realizar una medida cuantitativa. Aquellas muestras que no pertenezcan al espacio espectral no deben ser predichas, se debe realizar un análisis de referencia y guardar el espectro para una posible ampliación del modelo. Durante el análisis de muestras es importante registrar la distancia de Mahalanobis a la muestra vecina ( $NH$ ). Usando el valor de  $NH$  pueden crearse subgrupos de muestras con características espectrales similares dentro del conjunto global de muestras. Este parámetro tiene gran interés cuando se dispone de un set de muestras demasiado amplio. Un valor de  $NH = 0.6$  suele ser el elegido para crear los subgrupos. Seguidamente, una muestra de cada subgrupo es elegida para representar a este. De esta manera puede conseguirse un submuestreo representativo del set global de muestras (Infrasoft International LLC, 2000).

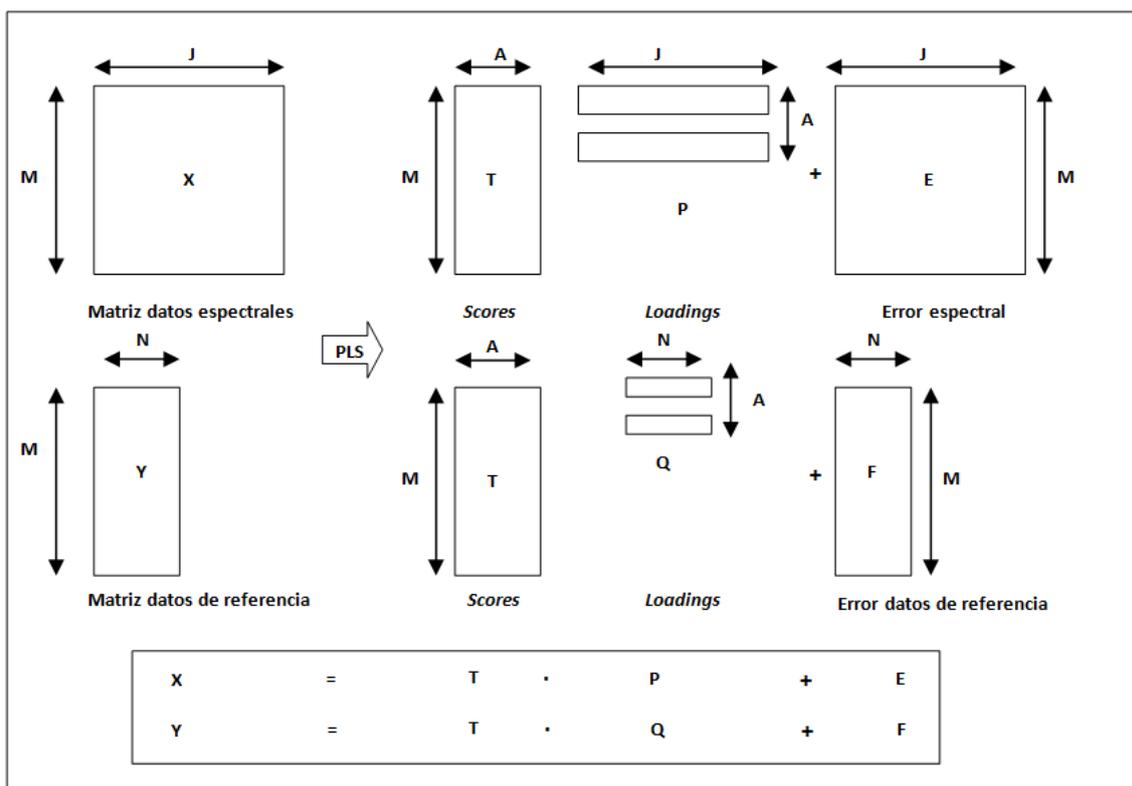
## 6.3 Análisis cuantitativos utilizados

### 6.3.1 Regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS)

La regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS) es un método de análisis quimiométrico cuantitativo habitual en análisis multivariante. Se basa en que la información contenida en las variables medidas se puede concentrar en un número menor de variables sin pérdida de información relevante. La regresión se realiza con estas nuevas variables, no con los datos originales, simplificando el modelo de calibración y la interpretación de los resultados (Brereton, 2003).

El método PLS de calibración es útil para resolver problemas de calibración que contienen un número elevado de variables y relativamente pocas muestras basándose en una reducción de variables. Éste es el caso de técnicas espectroscópicas, como la espectroscopía en el infrarrojo cercano, infrarrojo medio o Raman. Las nuevas variables creadas, denominadas variables latentes, factores o componentes, son combinación lineal de las variables originales.

Durante la etapa de calibración, el algoritmo PLS utiliza tanto la información contenida en la matriz de los datos espectroscópicos (matriz  $X$ ), como la información contenida en la matriz de datos de referencia (matriz  $Y$ ); teniendo en cuenta ambas informaciones, el método reduce el impacto de grandes pero irrelevantes variaciones en la matriz  $X$  en el calibrado, se busca además la máxima variabilidad en la matriz  $X$  y la mayor correlación con la matriz  $Y$  (Höskuldsson, 1996). Además, PLS realiza la regresión en un espacio ortogonal, evitando los problemas derivados de la colinealidad entre las variables, el centrado de los datos se realiza en las matrices  $X$  e  $Y$ .



**Figura 11.** Esquema general de obtención de modelos PLS.

En la Figura 11 se observa la descomposición de la matriz espectral y la que contiene los parámetros a modelar ( $X$  e  $Y$ ) mediante PLS, siendo  $T$ , matriz de los *scores*, el nexo común entre ambas. Las matrices  $P$  y  $Q$  representan los *loadings*, mientras que las matrices  $E$  y  $F$  representan los errores o residuales de la descomposición de las diferentes matrices. El número de muestras corresponde a  $M$ ;  $A$  es el número de variables latentes obtenidas y  $N$  indica el número de parámetros a modelar (Brereton, 2003; Vandeginste et al., 1998).

En la matriz  $Y$ , el número de columnas ( $N$ ) representa el número de parámetros a modelar, si  $N = 1$  se estaría modelando para un único parámetro, dando lugar al denominado PLS 1. Sin embargo si  $N$  toma un valor distinto a la unidad se estarían modelando varios parámetros de forma simultánea, dando lugar al denominado PLS 2.

En esta memoria se ha elegido el método MPLS (*Modified Partial Least Squares*), un PLS modificado. La modificación reside en que los residuales de los espectros a cada longitud de onda (obtenidos después de calcular cada factor, variable latente o componente) se estandarizan, es decir, se dividen por la desviación estándar de los residuales a cada longitud de onda, antes de calcular el siguiente factor o variable latente; lo que hace a este algoritmo más estable y preciso que un PLS normal (Infrasoft International LLC, 2000). Al modelar uno a uno los parámetros se trata de una modificación de un algoritmo PLS 1.

El objetivo de la calibración es obtener unos parámetros que permitan calcular la concentración en futuras muestras, de forma que el residual (diferencia entre el valor de referencia y el predicho) de los datos calculados sea el menor posible. Teniendo en cuenta esto, se evaluará la capacidad de predicción del modelo. Se intenta que los primeros factores o variables latentes contengan la mayor información para la predicción de las muestras. La elección del número de factores o variables latentes se puede realizar de diversas formas; una de las más extendidas es mediante la validación cruzada, procedimiento por el que el conjunto original se divide en varios grupos de forma que se utiliza un grupo para comprobar los resultados (validar) y el resto para construir el modelo, dejando cada vez un grupo fuera, el proceso se repite tantas veces como subgrupos se formen. De esta manera se evitan los sobreajustes, atendiendo al valor del error estándar de validación cruzada (SECV) que, de forma aproximada, se puede decir que es equivalente al error estándar de predicción (SEP) de 10 muestras elegidas al azar (Brereton, 2003; Vandeginste, *et al.*, 1998).

En el proceso de elección del número de factores o variables latentes se comienza por establecer un SECV mínimo y, a partir de éste, se calcula el máximo SECV aceptable (5% superior al mínimo). Se identificará el SECV que con el menor número de factores o variables latentes sea inferior al máximo SECV aceptable, eligiéndose ese número de factores o variables latentes para desarrollar el modelo.

Durante este proceso también son detectadas muestras con altos residuales, diferencias entre el valor de referencia y el predicho. Se utiliza el criterio  $T$ , de forma que aquellas muestras cuyo residual dividido por el SECV del proceso supere el valor de 2.5 serán eliminadas del conjunto de calibración.

$$T = \frac{\text{residual}}{\text{SECV}} \quad \text{Ec. 19}$$

Este procedimiento se repite dos veces para obtener finalmente el modelo. Algunos de los parámetros que se obtienen de la ecuación de calibración son:

- RSQ: coeficiente de correlación múltiple; se utiliza para medir el grado con el que el calibrado ajusta los datos.

$$RSQ = 1 - \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{\sum_{i=1}^N (\hat{y}_{teo_i} - \bar{y})^2} \right) \quad \text{Ec. 20}$$

- SEC: error estándar de calibración.

$$SEC = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N - p - 1} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 21}$$

- *BIAS*: se define como la media de los residuales, siendo éstos la diferencia entre el valor del laboratorio ( $y_{cal_i}$ ) y el valor predicho ( $\hat{y}_{teo_i}$ ).

$$residual, f_{ij} = (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i}) \quad \text{Ec. 22}$$

$$BIAS = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i}) \quad \text{Ec. 23}$$

- *SECV*: error estándar de validación cruzada.

$$SECV = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} - BIAS)^2}{N - 1} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 24}$$

- Intervalo de aplicabilidad: valores máximo y mínimo del parámetro de referencia para los cuales se puede utilizar la ecuación.

En estas ecuaciones  $y_{cal_i}$  e  $\hat{y}_{teo_i}$  son, respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las  $i$ -muestras,  $\bar{y}$  es el valor medio de los datos calculados,  $N$  es el número de muestras utilizadas en el calibrado y  $p$  es el número de factores de la regresión.

Una vez obtenido el modelo, se puede proceder a la *validación interna* mediante la predicción de los valores del parámetro de referencia en las mismas muestras que finalmente forman parte del modelo. Algunos de los parámetros que se utilizan para estimar la bondad del modelo son:

- *RSQ*: obtenido al realizar una regresión entre los valores de referencia y los predichos mediante los datos espectroscópicos.
- *SEP*: error estándar de predicción.

$$SEP = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 25}$$

- *SEP(C)*: error corregido por el *BIAS*.

$$SEP(C) = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i} - BIAS)^2}{N - 1} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 26}$$

En estas ecuaciones  $y_{cal_i}$  e  $\hat{y}_{teo_i}$  son, respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las  $i$ -muestras y  $N$  es el número de muestras utilizadas para realizar la validación interna.

Además, para comprobar la robustez del modelo de calibración, se realiza una *validación externa*, aplicando las ecuaciones a un conjunto de muestras que no pertenecen al colectivo de calibración. Algunos de los parámetros que se pueden evaluar son:

- Media de los residuales.
- Porcentaje de error respecto al valor de referencia.
- RMSE: error cuadrático medio (*root mean standard error*).

$$RMSE = \left( \frac{\sum_{i=1}^N (y_{cal_i} - \hat{y}_{teo_i})^2}{N} \right)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 27}$$

En esta ecuación  $y_{cal_i}$  e  $\hat{y}_{teo_i}$  son respectivamente, los datos calculados y teóricos para cada una de las  $i$ -muestras y  $N$  es el número de muestras utilizadas para realizar la validación externa. La fórmula es la misma que se emplea en validación interna (para el SEP), pero aplicada a muestras que no pertenecen al colectivo de calibración. La utilización del término SEP para referirse a este parámetro en validación externa se puede encontrar de forma habitual en la bibliografía, indicando que se refiere a dicho tipo de validación.

## MATERIALES Y MÉTODOS





## 1 MUESTRAS

Los estudios llevados a cabo en esta memoria se han centrado en uva (*Vitis vinífera* L.) recolectada en viñedos pertenecientes a dos áreas geográficas con producciones vitivinícolas de reconocida calidad como son las Denominación de Origen Condado de Huelva y Denominación de Origen Calificada Rioja.

La D. O. Condado de Huelva se sitúa en el suroeste de la península ibérica y cuenta con unas 6000 ha de viñedo. Su condición de Denominación de Origen fue aprobada por el Ministerio de Agricultura el 1 de agosto de 1979 (BOE del 11 de septiembre de 1979), cuando se modificó el anterior reglamento de la Denominación de Origen Huelva, creada en 1932 (*Denominación de Origen Condado de Huelva*, 2016). La variedad blanca Zalema es autóctona del Condado de Huelva, donde representa el 90% de la producción de uva, por lo que la producción a partir de esta variedad de vinos blancos es muy frecuente en esta región (Hernanz, Gallo, Recamales, Meléndez-Martínez, González-Miret y Heredia, 2009). Para este estudio se muestrearon cuatro fincas donde se cultivan la variedad blanca Zalema (en dos parcelas), y las tintas Tempranillo y Syrah. Las parcelas donde se recolectó uva Zalema se diferencian principalmente en el tipo de suelo que poseen. En una el suelo es arenoso, con una alta permeabilidad, mientras que la otra posee un suelo arcillo-arenoso de textura más pesada y menos permeable. En cuanto a las variedades tintas, se seleccionó la variedad Tempranillo por ser la variedad tinta más cultivada en España produciendo unos vinos de elevada calidad, mientras que la variedad Syrah se seleccionó debido a su resistencia a condiciones de clima cálido como las que se dan en la zona (Gordillo, Rodríguez-Pulido, Mateus, Escudero-Gilete, González-Miret, Heredia, *et al.*, 2012).

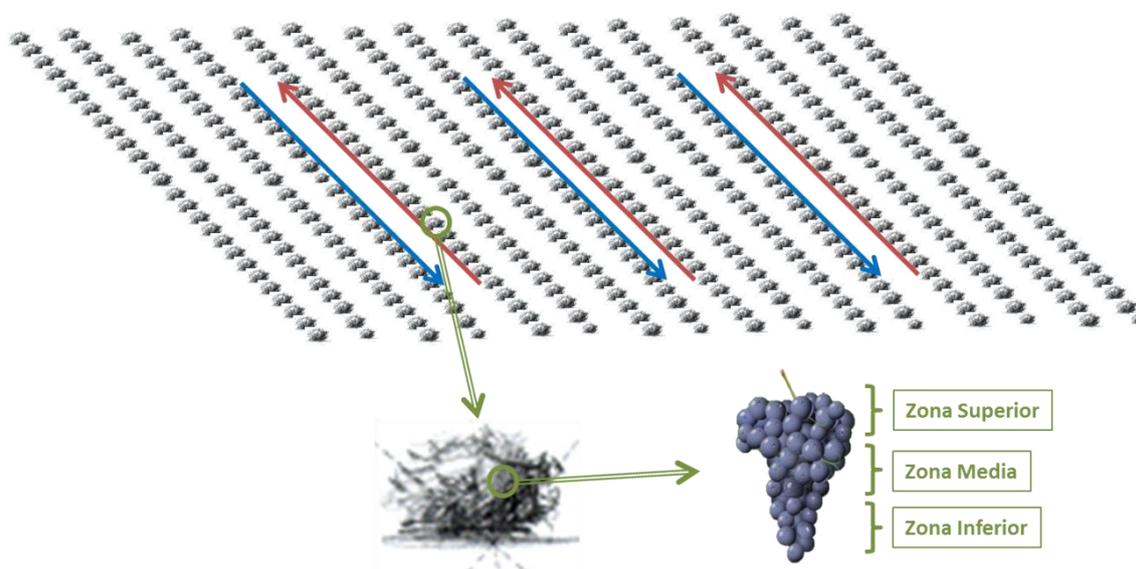
Por su parte, la D.O.Ca. Rioja se sitúa en noreste de la península ibérica y tiene una extensión cultivada de unas 64000 hectáreas. Es la Denominación de Origen más antigua de España, reconocida el 6 de junio de 1925. Posteriormente, en abril de 1991 se le concedió la Denominación de Origen Calificada Rioja con la aprobación de un nuevo reglamento más estricto que implica un control más exhaustivo y un mayor nivel de protección. En esta región se muestrearon cinco parcelas distintas donde se cultivan las variedades tintas Tempranillo (en dos parcelas), Mazuelo, Garnacha y Graciano. La variedad Tempranillo ocupa el 75% de la superficie cultivada en esta región. Esta variedad produce vinos jóvenes balanceados y afrutados, convirtiéndose en caldos suaves tras el envejecimiento. Graciano es una variedad autóctona de la Denominación de Origen Calificada Rioja, aunque menos conocida, es un componente fundamental en la elaboración de numerosos vinos Rioja ya que se considera que contribuye significativamente a la calidad de los caldos. Ofrece vinos con un aroma peculiar, cierta acidez y gran contenido en polifenoles, lo que es muy conveniente para conseguir un correcto envejecimiento de los vinos. Garnacha es una variedad con un alto rendimiento de

producción a partir de la que se elaboran vinos vigorosos, con gran textura, cuerpo y color. Por último, aunque algo más corta en sabor, la variedad Mazuelo produce vinos ricos en taninos, alta acidez y un color bastante estable, ideal para combinarse con variedades más suaves y con menos color (*Denominación de Origen Calificada Rioja*, 2016; ICEX, 2014).

## 1.1 Muestreo

Se realizaron distintos muestreos para los diferentes estudios que componen esta memoria tratando de seguir una metodología constante y común a la hora de recolectar las muestras.

Siguiendo una modificación del método de muestreo realizado por Bergqvist, Dokoozlian y Ebisuda (2001), la toma de muestras se realizó de la siguiente forma: en cada parcela se eligieron y marcaron cuatro hileras de viñas separadas entre sí y de los límites de la parcela por al menos tres hileras más. De esta forma se pretende cubrir la mayor parte de cada viñedo para recoger la posible heterogeneidad entre distintas zonas. Solo se tomó un grano de uva por cada planta, teniendo la precaución de tomar de distintas partes del racimo (zonas inferior, superior y media) y cortando el pedicelo para evitar procesos oxidativos tras el muestreo. Con el objetivo de evitar la recogida de muestras poco representativas solo se recogió uva a partir de la quinta vid en cada hilera. Para reducir la influencia de la orientación solar, el muestreo se realizó en las zonas de solana y umbría de cada hilera (Figura 12).



**Figura 12.** Representación del proceso de muestreo.

La Figura 13 muestra algunas de las parcelas donde se realizaron los muestreos así como el detalle de un racimo de uva de la variedad Tempranillo durante el proceso del envero.



**Figura 13.** *Algunas de las parcelas donde se realizaron los muestreos y detalle de un racimo de uva de la variedad Tempranillo durante el proceso del envero.*

Las condiciones particulares de cada muestreo varían en función del estudio al que las muestras estén destinadas. A continuación se describe con detalle las particularidades de los muestreos realizados para los distintos estudios recogidos en esta memoria.

### *1.1.1 Muestreo para estudio de clasificación de variedades de uva tinta*

Este muestreo fue realizado por personal de Bodegas RODA (La Rioja, España). Se muestrearon 5 parcelas pertenecientes a la D.O.Ca. Rioja donde se cultivan las variedades tintas Tempranillo (en dos parcelas), Mazuelo, Garnacha y Graciano. Siguiendo la metodología descrita, el muestreo se realizó para dos estadios distintos de maduración: uva madura y uva sobremadura en la campaña de vendimia de 2012. De entre las uvas muestreadas (aproximadamente 1 kg) se seleccionaron aleatoriamente 5 uvas para cada parcela y estadio de madurez, de forma que finalmente se obtuvieron 20 uvas de la variedad Tempranillo y 10 uvas de las variedades Mazuelo, Garnacha y Graciano. Las muestras fueron inmediatamente congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los correspondientes análisis.

### *1.1.2 Muestreo para los estudios de maduración*

Se realizó un muestreo de las variedades Zalema (blanca), Tempranillo y Syrah (tintas) en cuatro parcelas pertenecientes a la D.O. Condado de Huelva durante la campaña de 2012. Las muestras fueron recolectadas, siguiendo la metodología descrita, dos veces por semana desde mediados de julio hasta principios de septiembre, obteniéndose así muestras con una amplia diversidad en lo que a nivel de maduración se refiere. Esas mismas muestras fueron utilizadas para los análisis del estado de maduración oficiales para el Consejo Regulador de la D.O. Condado de Huelva. Debido a las diferentes fechas en que las distintas parcelas fueron vendimiadas, se recolectó diferente número de muestras para cada variedad: 19 muestras para cada parcela de la variedad Zalema, 17 para la parcela de la variedad Syrah y 16 para la parcela de la variedad Tempranillo. Cada muestra recolectada se dividió en tres submuestras y seguidamente fueron almacenadas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los correspondientes análisis.

### *1.1.3 Muestreos para los estudios de extractabilidad*

Se muestrearon dos parcelas pertenecientes a la D.O. Condado de Huelva donde se cultivan las variedades de uva tinta Tempranillo y Syrah. Se realizaron muestreos de ambas parcelas en el momento de la vendimia de los años 2014 y 2015. En cada campaña se recolectaron 100 bayas de cada variedad siguiendo la metodología descrita. Las muestras fueron refrigeradas y transportadas al laboratorio donde fueron atemperadas, realizándose de forma inmediata el análisis de imagen hiperespectral según la metodología que se describe en la siguiente sección de esta memoria (2.1 Análisis de imagen hiperespectral). Posteriormente, se extrajeron los hollejos y semillas de cada uva, se pesaron, realizándose de forma análoga el análisis de imagen hiperespectral de las semillas. Finalmente, las muestras de hollejos y semillas se almacenaron a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los correspondientes análisis.

## 2 TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

### 2.1 Análisis de imagen hiperespectral

#### 2.1.1 *Material y equipos*

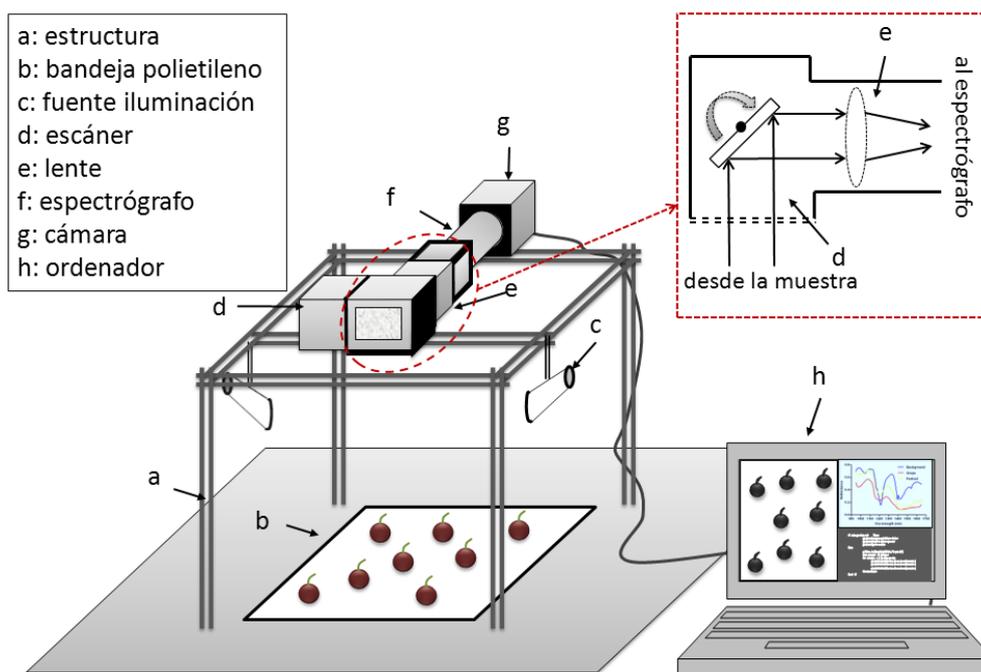
- Cámara Xenics® XEVA–USB InGaAs (320 x 256 píxeles).
- Espectrógrafo Specim ImSpector N17E Enhanced.
- Lámparas halógenas wolframio–yodo 70 W (PRILUX®).
- Estándar de reflectancia difusa Spectralon®.
- Ordenador Pentium IV – 2.66 Hz. Windows XP.
- *Software* SpectralDAQ v. 3.62. (Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finlandia) .

#### 2.1.2 *Adquisición de imágenes hiperespectrales*

Para la adquisición de los datos hiperespectrales, se ha usado un sistema de imagen hiperespectral (Infaimon S.L., Barcelona, España) compuesto por fuente de iluminación, escáner, sistema óptico, espectrógrafo, cámara y ordenador. La Figura 14 muestra un esquema del montaje de este sistema para la adquisición de datos hiperespectrales.

La cámara hiperespectral es el equipo compuesto por las partes d, e, f y g de la Figura 14 y proporciona una imagen que contiene, para cada píxel, el espectro en la región de infrarrojo cercano (NIR) desde 900 a 1700 nm con una resolución de 3.25 nm. La muestra, una vez atemperada, se sitúa en la parte inferior del equipo, sobre una bandeja de polietileno (b). Una estructura (a) sujeta al equipo y a las fuentes de iluminación (c), dirigidas hacia la muestra con un ángulo de incidencia de 45°. De esta forma se consigue disminuir la componente especular de la reflectancia y maximizar la componente difusa. Las fuentes de iluminación deben permanecer encendidas durante al menos 10 minutos antes del comienzo de las medidas para su correcto funcionamiento y estabilización. La luz reflejada por la muestra llega a un escáner (d) que permite recoger diferentes zonas espaciales de la muestra con la ayuda de un espejo giratorio. El haz de luz reflejado por el espejo se dirige en cada momento a través del sistema óptico (e), donde una lente focaliza la luz sobre el espectrógrafo (f) y ésta se descompone según las diferentes longitudes de onda. La cámara (g), que cuenta con un sensor lineal del tipo InGaAs, recoge estos datos y los envía al sistema informático (h). El sistema informático

compone el hipercubo, es decir, el archivo con la información espacial ( $x$  e  $y$ ) y espectral ( $\lambda$ ) de la muestra.



**Figura 14.** Representación esquemática de la cámara hiperespectral utilizada.

Las imágenes son registradas usando una frecuencia de adquisición de líneas (*frames*) de 50 Hz y un tiempo de exposición de 9 ms. Todo el sistema está gobernado por el *software* SpectralDAQ v. 3.62, (Spectral Imaging Ltd., Oulu, Finlandia).

Los archivos recogidos contienen las reflectancias absolutas de cada píxel. Para relativizarlos y poder comparar las medidas entre distintas fechas, e incluso entre diferentes equipos, se realiza una calibración de la reflectancia de doble punto. Esta calibración se realiza gracias a la adquisición de la imagen hiperespectral de un blanco de referencia (Spectralon®, NH, EEUU.) y de la corriente oscura del equipo. A cada una de las imágenes tomadas se le aplica el siguiente algoritmo, pixel a pixel, para pasar de reflectancias absolutas a reflectancias relativas:

$$R = \frac{S - D}{W - D} \quad \text{Ec. 28}$$

Siendo  $R$  la reflectancia corregida o relativa y  $S$ ,  $W$  y  $D$  las reflectancias absolutas de la muestra, del blanco de referencia y de la corriente oscura respectivamente.

### 2.1.3 Segmentación de las imágenes hiperespectrales

En la mayoría de los casos, los hipercubos generados en análisis de imagen hiperespectral contienen tanto información de interés, o perteneciente a la muestra, como información no relevante. Es posible seleccionar manualmente las zonas de cada hipercubo que contienen información de interés con el objetivo de tener en cuenta únicamente los datos espectrales de estas zonas. Sin embargo, sería un proceso tedioso para casos en los que se mide un gran número de muestras, como es el caso de los estudios recogidos en la presente memoria. La selección de las zonas que contienen información de interés puede automatizarse mediante algoritmos informáticos, lo que se conoce como segmentación.

Para segmentar las imágenes hiperespectrales se han utilizado modificaciones de los métodos descritos en F.J. Rodríguez-Pulido, *et al.* (2014) y en Hernández-Hierro, Nogales-Bueno, Rodríguez-Pulido y Heredia (2013). Mediante análisis discriminante lineal por pasos hacia adelante se seleccionaron las longitudes de onda que tienen más poder discriminante para diferenciar entre el fondo y la muestra, y se calcularon la función o funciones discriminantes. Seguidamente, estas funciones fueron implementadas en Matlab<sup>®</sup> R2012b (The Math Works, 2012, MA, EEUU), mediante un algoritmo que permitió la automatización de la segmentación de las imágenes. Este algoritmo tiene como objetivo clasificar cada píxel de la imagen hiperespectral en dos clases (muestra o no muestra) usando los valores de reflectancia de las longitudes de onda seleccionadas. Finalmente el algoritmo calcula, para cada imagen, el espectro de reflectancia medio de los píxeles clasificados como muestra, le aplica la transformación  $\log(1/R)$  y combina todos los espectros obtenidos en una matriz espectral. Las particularidades de cada algoritmo de segmentación se recogerán en cada uno de los estudios realizados.

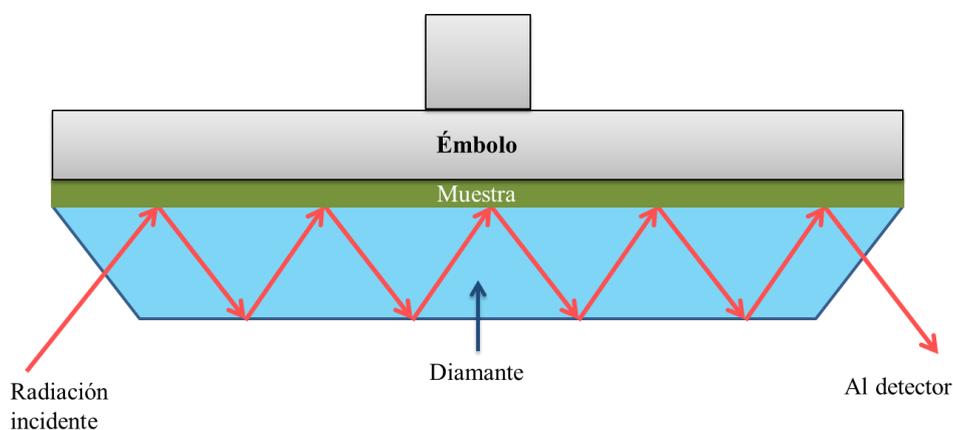
## 2.2 Espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier con reflexión total atenuada (ATR-FTIR)

### 2.2.1 Material y equipos

- Espectrómetro Spotligh 400 FTIR Perkin Elmer<sup>®</sup>.
- Detector *High-quality MCT* (mercurio, cadmio y telurio) de amplio intervalo espectral.
- Accesorio para medidas de reflectancia total atenuada (ATR).
- *Software Spectrum 10*<sup>TM</sup>.

### 2.2.2 Medidas ATR–FTIR

La adquisición de espectros ATR–FTIR se realizó utilizando el espectrómetro Perkin Elmer® (MA, EEUU) Spotlight 400N junto con el accesorio universal para medir reflectancia total atenuada (ATR). Este accesorio aporta una superficie de medida plana de diamante sobre la que es posible comprimir la muestra para asegurar una correcta superficie de contacto durante la medida. Usando este accesorio el haz infrarrojo se proyecta en el diamante, el cual tiene un elevado índice de refracción. El haz se refleja en la cara interna del cristal y crea una onda evanescente que penetra en la muestra y es amortiguada, dejando de existir tras recorrer una distancia del orden de unas pocas longitudes de onda. Al estar la muestra en íntimo contacto con el cristal, la onda evanescente interacciona con ella produciéndose la absorción de parte de la energía de dicha onda mientras que otra parte es reflejada y conducida al detector, proporcionando información sobre la composición química de la muestra. Se trata de un método muy versátil que permite la medida de muestras líquidas y sólidas sin prácticamente preparación de las mismas. De esta forma, el accesorio ATR permite que la interacción entre la radiación electromagnética y la muestra no sea puntual, si no que se distribuya por toda la superficie de contacto (Figura 15).



**Figura 15.** Esquema del accesorio para medir reflexión total atenuada.

El equipo cuenta con un detector *High-quality* MCT basado en semiconductores a base de mercurio, cadmio y telurio, modificando el dopaje del mismo para ampliar su intervalo de sensibilidad, pudiendo medir desde  $580\text{ cm}^{-1}$  a  $7800\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, el intervalo de medida más utilizado es desde  $600$  a  $4000\text{ cm}^{-1}$ , donde el detector tiene una mayor sensibilidad y donde aparecen la mayoría de las absorciones debidas a vibraciones fundamentales de los enlaces más comunes en muestras biológicas.

Para la realización de los estudios descritos en la presente memoria, los espectros se obtuvieron realizando 32 medidas en el intervalo comprendido entre  $600$  y  $4000\text{ cm}^{-1}$ , con una

resolución espectral de  $1\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras fueron fijadas en el accesorio ATR controlando que la presión aplicada fuera la misma para todas ellas. Además, se midió el espectro de fondo (aire) y el equipo lo sustrajo de forma automática de todas las medidas.

## 2.3 Espectroscopía Raman

### 2.3.1 Material y equipos

- Espectrómetro Horiba<sup>®</sup> Jobin–Yvon LabRAM HR800.
- Detector CCD de intervalo dinámico de 16 bits, refrigerado a  $-70\text{ °C}$ .
- Láser de alta eficacia Horiba<sup>®</sup> de 785 nm y 300 mW.
- Microscopio dual.
- Objetivos  $\times 100$  y  $\times 100$  *Water immersion* Olympus<sup>®</sup>.
- *Software* LabSpec 6 Horiba<sup>®</sup>.

### 2.3.2 Medidas Raman

La adquisición de espectros Raman se realizó utilizando el espectrómetro Horiba<sup>®</sup> (CA, EEUU) Jobin–Yvon LabRAM HR800. Este equipo cuenta con un microscopio dual que permite seleccionar las distintas zonas de medida y enfocar correctamente la radiación de excitación sobre la muestra. En todos los casos se usó un objetivo  $\times 100$  Olympus<sup>®</sup> (Tokio, Japón), aunque para la medida de hollejos se usó la variante *Water immersion*, capaz de medir muestras sumergidas en agua. Como fuente de iluminación se usó un láser Horiba<sup>®</sup> de 785 nm y 300 mW de una alta eficacia en el infrarrojo cercano. Este láser es menos energético que aquellos que emiten en visible, y por tanto produce emisiones Raman menos intensas. Sin embargo, a diferencia de los láseres que emiten en visible, la excitación en el infrarrojo cercano genera un efecto de fluorescencia casi nulo, con lo que los espectros adquiridos usando esta excitación aparecen mejor resueltos. Además, la baja energía del láser reduce el riesgo de destrucción de la muestra por sobrecalentamiento.

La calibración espectral del equipo se realiza para la línea a  $520.7\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un modo vibracional del silicio activo en Raman, usando el Material Estándar de Referencia N° 2243 del National Institute of Standards (CO, EEUU). La adquisición de espectros se realizó en el intervalo espectral desde 400 a  $3500\text{ cm}^{-1}$  con una resolución de  $\sim 0.9$  a  $1.6\text{ cm}^{-1}$  utilizando el detector CCD de intervalo dinámico de 16 bits, refrigerado a  $-70\text{ °C}$  mediante efecto Peltier.

## 2.4 Análisis de imagen digital en la región visible

### 2.4.1 Material y equipos

- Cabina de iluminación controlada DigiEye® VeriVide Ltd.
- Cámara Nikon® D80 de 10.2 megapíxeles.
- Objetivo Nikkor® 35 mm f/2D.
- Carta de color DigiTizer VeriVide Ltd.

### 2.4.2 Adquisición de imágenes

Para la adquisición de imágenes digitales en el visible se utilizó el sistema DigiEye®, que usa una cámara digital calibrada (Luo, Cui y Li, 2001). Este sistema cuenta con una cabina de iluminación (VeriVide Ltd., Leicester, Reino Unido) diseñada para iluminar las muestras de forma adecuada, una cámara Nikon® D80 (Tokio, Japón) con un objetivo de 35 mm. Además, para calibrar la cámara se utilizó la carta de color DigiTizer de VeriVide Ltd. que permite caracterizar la respuesta, relacionando la señal RGB con el espacio de color CIELAB. La cabina está equipada con dos tubos fluorescentes emuladores del iluminante D65 y ofrecen unas condiciones de iluminación estables tras el paso de los 10 minutos necesarios para su correcto funcionamiento y estabilización.

Tras realizar la calibración de la cámara, las muestras se situaron en el interior de la cabina de iluminación, sobre la bandeja portamuestras y se adquirieron las imágenes. Los datos fueron procesados usando el *software* Matlab® R2012b. Para obtener las coordenadas CIELAB a partir del espacio de color RGB se usó el *software* DigiFood® (Heredia, González-Miret, Álvarez y Ramírez, 2006).

### 3 ANÁLISIS QUÍMICO

#### 3.1 Madurez tecnológica

##### 3.1.1 Material y reactivos

- Agua desionizada (Milli-Q, Merck Millipore®) (Darmstadt, Germany).
- Hidróxido sódico 1 M (J.T. BAKER®, Ref.7098) (PA, EEUU).
- pH-metro CRISON® GLP 21+ (Barcelona, España).
- Tampones pH-metría 4.01, 7.00 y 9.21 CRISON® (Barcelona, España).
- Refractómetro portátil Análisis Vínicos RHW-25/Brix ATC (Ciudad Real, España).
- Balanza analítica METTLER TOLEDO CLASSIC AB204-S (Barcelona, España).
- Matraces aforados de 500 mL y 1 L.
- Micropipetas Eppendorf® (Hamburgo, Alemania) de intervalo de volumen 0.1–1 mL y 1–10 mL.

##### 3.1.2 Procedimiento analítico

La determinación de la madurez tecnológica se realizó a través de los parámetros acidez total, contenido en sólidos solubles y pH del mosto de la uva siguiendo los métodos descritos por la *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* (OIV, 1990). Se molturó uva para obtener aproximadamente 0.5 L de mosto, volumen suficiente para realizar todas las determinaciones mencionadas.

#### 3.2 Composición fenólica

##### 3.2.1 Material y reactivos

- Metanol (J.T. BAKER®, Ref.8402) (PA, EEUU).
- Ácido clorhídrico 12M (Panreac®, Ref.132176.1611) (Barcelona, España).
- Agua desionizada (Milli-Q, Merck Millipore®) (Darmstadt, Germany).
- Etanol absoluto (Panreac®, Ref.361086.1612) (Barcelona, España).
- Ácido tartárico (L+) (Panreac®, Ref.141066) (Barcelona, España).

- Hidróxido sódico 1 M (J.T. BAKER<sup>®</sup>, Ref.7098) (PA, EEUU).
- Reactivo de Folin–Ciocalteu (Merck<sup>®</sup>, Ref. 1.09001.0500) (Darmstadt, Germany).
- Carbonato sódico anhidro (Panreac<sup>®</sup>, Ref.141648.1211) (Barcelona, España).
- Patrón de referencia, ácido gálico (Analytical Carlo Erba<sup>®</sup>, Ref. 406335) (Barcelona, España).
- 4-(dimetilamino)cinamaldehído (DMACA) (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Ref. 39421) (MO, EEUU).
- Patrón de referencia, (+)-catequina (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Ref. C1251) (MO, EEUU).
- Acetonitrilo calidad HPLC (J.T. BAKER<sup>®</sup>, Ref. 9012) (PA, EEUU).
- Ácido trifluoroacético (Sigma Aldrich<sup>®</sup>, Ref. T6508) (MO, EEUU).
- Patrón de referencia, malvidina-3-*O*-glucósido, cloruro de oenina (Extrasynthese<sup>®</sup>, Ref. 11–0911S) (Lyon, Francia).
- Baño de ultrasonidos JP Selecta<sup>®</sup> (Barcelona, España).
- Centrífuga SORWALL TC 6, Dupont<sup>®</sup> (DE, EEUU).
- Centrífuga Eppendorf<sup>®</sup> 5810R (Hamburgo, Alemania).
- Rotavapor Heidolph<sup>®</sup> VV2000 (Schwabach, Alemania).
- Concentrador Plus Eppendorf<sup>®</sup> (Hamburgo, Alemania).
- Vortex Genius 3 IKA<sup>®</sup> (Staufen, Alemania).
- Espectrofotómetro UV–Vis Agilent<sup>®</sup> 8453 (Agilent Technologies<sup>®</sup>) (CA, EEUU).
- Cubetas desechables de plástico de 10 mm de camino óptico Kartell<sup>®</sup> 1938 (Milan, Italia).
- Balanza analítica METTLER TOLEDO CLASSIC AB204–S (Barcelona, España).
- Liofilizador Telstar<sup>®</sup> Cryodos –80° (Barcelona, España).
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia HPLC Agilent Technologies<sup>®</sup> HP 1200 (CA, EEUU), equipado con:
  - Bomba Cuaternaria (G1311A).
  - Desgasificador de vacío (G1322A).
  - Compartimento termostatzado para columna (G1330B).
  - Inyector automático (G1329A).

- Detector de diodos (G1316B).
- Columna Zorbax ODS de 4.6 250 mm y 4.6  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Agilent Technologies®).
- Filtros Nylon 0.45  $\mu\text{m}$  HNWP 04700 Merck Millipore® (Darmstadt, Germany).
- Matraces aforados de 5, 10, 25 mL y 1 L.
- Micropipetas Eppendorf® (Hamburgo, Alemania) de intervalo de volumen 2–100  $\mu\text{L}$ , 0.1–1 mL y 1–10 mL.

### 3.2.2 Extracciones

Para determinar el contenido fenólico de las partes sólidas de la uva se realizaron dos tipos de extracciones; una de ellas con vino sintético, para simular las condiciones de vinificación, y otra exhaustiva con metanol, para extraer la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en las muestras.

La extracción en vino sintético se realizó de forma similar tanto para hollejos como para semillas. En esta extracción se simulan las condiciones que se dan durante la etapa de maceración de una vinificación real, donde parte de los compuestos fenólicos presentes en las partes sólidas de la uva pasan al vino. Para esto se preparó un medio con características similares al vino, es decir, una disolución en base acuosa con un 12.5% de etanol, 4 g/L de ácido tartárico y un pH de 3.6 ajustado con NaOH 1M. Las muestras se maceraron en este medio durante 3 días en lugar oscuro, fresco y seco, tras los cuales se utilizó una alícuota para la realización de los correspondientes análisis.

La extracción exhaustiva tiene como objetivo conocer la cantidad total de compuestos fenólicos de las partes sólidas de la uva. En el caso de los hollejos se utilizó metanol ácido (0.1% de HCl 12M) para realizar la extracción mientras que para las semillas se usó una disolución acuosa de metanol al 75%. En ambos casos, para facilitar el proceso de extracción, las muestras se pusieron en un baño de ultrasonidos, posteriormente, se centrifugaron y se recogió el sobrenadante. El proceso se repitió hasta que el extracto resultante quedó incoloro; todos los sobrenadantes se mezclaron y se enrasaron a un volumen fijo. Se usó una alícuota de este extracto para la realización de los análisis espectrofotométricos mientras que otra alícuota se evaporó y se reconstituyó con agua desionizada para los análisis cromatográficos.

### 3.2.3 Contenido en fenoles totales

En la determinación del contenido en fenoles totales se siguió el método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). A 0.2 mL de extracto se le añadieron 1.5 mL de

carbonato de sodio (20% p/v) y 0.5 mL del reactivo de Folin–Ciocalteu. Esta mezcla se enrasó a 10 mL y, tras dejar que la reacción se completara (2 horas), se midió la absorbancia a 765 nm. Los fenoles totales se cuantificaron mediante la correspondiente recta de calibrado utilizando como patrón ácido gálico.

### 3.2.4 *Contenido en flavanoles totales*

Para el análisis de flavanoles se siguió una modificación del método espectrofotométrico descrito por Vivas, Glories, Lagune, Saucier y Augustin (1994). Según se tratara de la extracción exhaustiva o en vino sintético, 10 o 20  $\mu\text{L}$  de extracto se mezclaron con 190 o 180  $\mu\text{L}$  de metanol respectivamente. Se añadió 1 mL de reactivo DMACA y, tras 10 minutos, se midió la absorbancia a 640 nm. El reactivo DMACA, que se preparó inmediatamente antes de su uso, contenía 0.1% (p/v) de 4-(dimetilamino)cinamaldehído en una disolución HCl:Metanol (1:10, v/v). Los flavanoles totales se cuantificaron mediante una recta de calibrado utilizando (+)-catequina como patrón.

### 3.2.5 *Determinación del perfil antociánico*

El perfil antociánico de las muestras de hollejo de uva tinta se determinó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) siguiendo una modificación del método descrito por García-Marino, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo y Escribano-Bailón (2010). Previamente a los análisis cromatográficos, los extractos acuosos provenientes de las extracciones exhaustivas y en vino sintético fueron filtrados (0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro) y diluidos 1:2 con HCl 0.1 M.

Los análisis cromatográficos se llevaron a cabo en un equipo HPLC Agilent Technologies® HP 1200 (CA, EEUU), equipado con una columna cromatográfica Zorbax SB C18 (4.6 mm  $\times$  250 mm, 4.6  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula) y un sistema de detección basado en barrera de diodos. Las fases móviles usadas fueron ácido trifluoroacético 0.1% (v/v) como fase A y acetonitrilo como fase (B). El perfil de elución, expresado en porcentaje de fase B, fue el siguiente: 10% durante 3.25 minutos, desde 10 a 15% durante 12.37 minutos, 15 % durante 5.21 minutos, desde 15 a 18% durante 5.21 minutos, desde 18 a 30% durante 20.84 minutos y desde 30 a 35% durante 5.20 minutos. El flujo de fase móvil utilizado fue de 0.8 mL/minuto y el volumen de inyección de 100  $\mu\text{L}$ . La longitud de onda de detección se fijó en 520 nm y se detectaron hasta un total de 15 antocianinas, identificadas de acuerdo a sus características espectrales y cromatográficas. La cuantificación de los distintos antocianos se realizó mediante una recta de calibrado utilizando como patrón malvidina-3-O-glucósido.

## 4 TRATAMIENTO DE DATOS

### 4.1 Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales o PCA se ha aplicado en todos los estudios recogidos en la presente memoria. Concretamente, se ha aplicado en las matrices espectrales que comprenden espectros en el infrarrojo cercano (NIR), en el infrarrojo medio (MIR) o espectros Raman. Según el estudio, el PCA ha tenido los siguientes objetivos:

- Reducir la dimensión de la matriz espectral mediante la creación de variables nuevas (componentes principales) que representen la mayor parte de la variabilidad espectral original.
- Ordenar las muestras dentro de la matriz espectral y detectar posibles *outliers*, muestras con características espectrales muy distintas al resto, mediante el cálculo de la distancia  $H$  de Mahalanobis.
- Reducir el número de muestras mediante la selección de un subconjunto que represente de forma adecuada la variabilidad espectral del conjunto original. Las muestras pertenecientes a este subconjunto serán seleccionadas teniendo en cuenta la distancia de Mahalanobis a muestra vecina ( $NH$ ).
- Relacionar la variabilidad espectral de los datos con otras variables cualitativas (o cuantitativas categorizadas).

En los estudios donde se han usado espectros completos, el PCA se ha realizado usando el *software* Win ISI<sup>®</sup> (v1.50) (Infrasoft International, 2000, PA, EEUU). Este *software* usa un algoritmo especializado en el tratamiento de espectros (con número de variables igual a número de longitudes de onda medidas), con lo que el proceso de cálculo es mucho más ágil que en otro *software*. De forma previa a la aplicación del PCA, los espectros fueron pretratados para minimizar los efectos dispersivos de la radiación electromagnética. Se les aplicó una tipificación de la absorbancia, un suavizado, utilizando para ello un intervalo de 5 puntos, y una segunda derivada calculada también a intervalos de 5 longitudes de onda (SNV 2,5,5,1).

El PCA se realizó con el *software* Statistica v.8.0 (StatSoft Inc., 2007, OK, EEUU) en los casos en que sólo se usan los datos pertenecientes a ciertas longitudes de onda de interés, concretamente la altura de picos en espectros MIR o Raman. Previamente al cálculo de las alturas de pico también fue necesario aplicar pretratamientos espectrales que permitieran eliminar el efecto que la dispersión de la radiación electromagnética o los fenómenos de fluorescencia tienen en la altura de pico para los casos de las medidas FTIR y Raman, respectivamente. Los pretratamientos que mejor se adecuaron a las características de las

matrices espectrales MIR y Raman fueron corrección de los efectos multiplicativos de la dispersión (MSC) y eliminación de la línea base, respectivamente.

## 4.2 Regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS)

La regresión es un análisis estadístico que se utiliza cuando el objetivo es predecir o explicar el valor de una variable a partir de otras. En esta memoria se ha utilizado la regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS) para valorar la relación (de forma predictiva) entre una variable dependiente y otras variables independientes. La regresión MPLS calcula un número menor de variables, sin pérdida de información relevante, llamadas factores PLS y usa estas nuevas variables para el cálculo del modelo de calibración y la interpretación de los resultados.

Para la realización de este análisis se ha utilizado el *software* Win ISI<sup>®</sup> (v1.50), siguiendo el siguiente procedimiento:

Tras la realización del análisis de componentes principales (PCA), el cual permite conocer la distribución de muestras en el recién creado espacio y, en su caso, determinar *outliers* espectrales ( $H > 3$ ), se asociaron a cada muestra espectral los datos de referencia, determinados previamente. Con el objetivo de reducir al máximo el error de validación cruzada se probaron distintos pretratamientos espectrales, derivadas y suavizados sobre la matriz espectral antes de comenzar el cálculo de la regresión.

El método MPLS divide el set de muestras de calibración en una serie de subgrupos para realizar una validación cruzada que permite fijar el número de factores de mínimos cuadrados parciales (factores PLS), reduciendo así la posibilidad de sobreajuste (Shenk, *et al.*, 1995) y ayudando a eliminar *outliers* químicos. Al realizar la predicción, las muestras que presentan un error residual alto son eliminadas, permaneciendo aquellas que presentan un valor de  $T \leq 2.5$ . El error de validación obtenido en cada muestra se combina en forma de error estándar de validación cruzada (*SECV*).

En cada caso, de forma previa se seleccionó un set de muestras que no se tuvieron en cuenta al hacer la calibración para realizar una validación externa de los modelos generados. Esta selección se realizó o bien de forma completamente aleatoria, seleccionando un tercio de las muestras originales para este fin, o bien de forma parcialmente guiada, seleccionando aleatoriamente una muestra dentro de cada uno de los grupos espectralmente similares identificados. De este proceso de validación se obtiene el error estándar de validación externa que permite, junto con otros parámetros, evaluar la bondad de los modelos MPLS calculados.

### 4.2.1 *Aplicación de los modelos*

Los modelos MPLS desarrollados pueden aplicarse a muestras externas a estos con el objetivo de predecir los valores que tendrán las variables de interés vitivinícola para las cuales estos modelos fueron creados. La aplicación de un modelo MPLS a nuevas muestras será posible siempre y cuando sus espectros pertenezcan al mismo espacio espectral que los espectros de las muestras que generaron el modelo. Para comprobar que se cumple esta condición, los espectros de las nuevas muestras se descomponen en el espacio vectorial generado por el PCA y se calcula la distancia de Mahalanobis ( $H$ ) entre cada espectro de estas nuevas muestras y el centro del espacio vectorial. Esta distancia tiene que ser menor a 3 unidades para que la nueva muestra pueda ser evaluada por los modelos MPLS desarrollados.

Tras la aplicación de los modelos MPLS a un set de nuevas muestras, se obtienen los valores de referencia predichos. Estos valores permiten conocer características de las muestras de forma rápida y no destructiva, que pueden ser aplicadas para el diseño de nuevos estudios. En la presente memoria, este procedimiento se ha aplicado en distintas ocasiones. Bien para conocer la distribución de compuestos fenólicos predichos en un set de muestras o para conocer contenidos extraíbles predichos de compuestos fenólicos en hollejo y semilla de uva y poder clasificar después las muestras según estos contenidos predichos.

### 4.3 **Análisis de vectores característicos**

El análisis de vectores característicos ha sido desarrollado siguiendo la metodología descrita en Ayala, Echávarri y Negueruela (1997).

Este análisis consiste en la aplicación de un algoritmo que, sobre un conjunto de espectros, calcula el número y la forma de una serie de curvas fundamentales, o vectores característicos, los cuales representan la mayor parte de la variabilidad espectral de los datos originales. Utilizando estos vectores característicos y el espectro medio del conjunto de datos inicial, cada una de las curvas originales puede ser reconstruida con una alta precisión a partir de una cantidad de información relativamente pequeña. Además de los vectores característicos, es necesario conocer los valores registrados para un número de longitudes de onda, siendo dicho número igual al de vectores característicos (Simonds, 1963).

### 4.4 **Análisis discriminante lineal (LDA)**

En la presente memoria se ha aplicado el análisis discriminante lineal a muestras de uva con el objetivo de discriminar entre las distintas variedades de uva. El LDA se ha aplicado a diferentes grupos de variables: puntuaciones obtenidas a partir de la realización de PCA a

espectros NIR, coordenadas colorimétricas y perfiles cromatográficos de las muestras. Finalmente, también se realizó una fusión de datos de segundo nivel con el objetivo de mejorar el poder discriminatorio del análisis.

Se ha usado el *software* SPSS 22.0 (SPSS, 2015, Inc., IL, EEUU) para realizar estos análisis, utilizando la modalidad de análisis por pasos. Esta selecciona las variables más significativas para la discriminación entre las diferentes categorías usando el estadístico  $F$  para evaluar la significancia del cambio en la Lambda de Wilk al añadir o eliminar una variable. La capacidad de predicción se estimó considerando el porcentaje de muestras correctamente clasificadas por los discriminantes calculados usando un proceso de validación dejando una muestra fuera (*leave-one-out*).

#### **4.5 Agrupamiento mediante el algoritmo de K-medias**

Este análisis tiene como objetivo agrupar muestras en un número de grupos, de acuerdo al grado de similitud existente entre las muestras según un conjunto de variables independientes. En la presente memoria se utilizó este método para agrupar muestras de hollejo y semilla de uva en 3 grupos con distintos niveles de contenidos extraíbles de compuestos fenólicos.

El análisis se desarrolló utilizando el *software* Statistica v.8.0. Para iniciar el análisis se seleccionaron los centros iniciales de cada grupo de forma que las distancias iniciales entre cada grupo fueran máximas. El algoritmo iterativo continúa asignando cada muestra al grupo cuyo centro sea el más cercano y recalculando los centros al finalizar la asignación. El algoritmo finaliza cuando el reparto de la población de muestras entre los distintos grupos se repite.

#### **4.6 Análisis de la varianza (ANOVA)**

En general, el propósito del Análisis de la Varianza (ANOVA) es encontrar diferencias significativas entre las medias de los grupos formados (Norman, Streiner y Tarrés, 1996).

En la presente memoria se ha utilizado el ANOVA con el objetivo de conocer si hay diferencias significativas entre las medias en varias matrices de datos. Se ha utilizado el *software* Statistica v.8.0 aplicando el test *post hoc* de Tukey para detectar que grupos son significativamente diferentes, en cuanto a sus valores medios. Se estableció un nivel de significación estadística de  $\alpha = 0.05$  en todos los análisis en los que se realizó este test.

## OBJETIVOS GENERALES





---

## OBJETIVOS GENERALES

El objetivo general de este trabajo es estudiar la madurez y la aptitud enológica de la uva de vinificación mediante técnicas espectroscópicas de análisis. Se plantea la caracterización espectral de muestras de uva y la discriminación entre distintas variedades, así como el desarrollo de métodos no destructivos para la predicción de parámetros relacionados con la madurez del fruto y la extractabilidad de compuestos fenólicos en hollejo y semilla de uva. En concreto se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- Comparar el perfil de compuestos antociánicos, el análisis de imagen digital en visible y el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano como herramientas para discriminar entre distintas variedades de uva tinta.
- Desarrollar métodos no destructivos y respetuosos con el medio ambiente mediante análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano para la estimación de los principales parámetros implicados en la madurez tecnológica de la uva (acidez total, pH y concentración de azúcar en el mosto), así como la concentración de fenoles totales y de antocianos en el hollejo.
- Comprobar la viabilidad del análisis de vectores característicos como técnica de reducción de datos aplicada a espectros de uva en el infrarrojo cercano.
- Desarrollar métodos para la estimación de los contenidos extraíbles de las principales familias de compuestos fenólicos en hollejo de uva tinta mediante análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano.
- Estudiar mediante espectroscopía en el infrarrojo medio y Raman la relación existente entre la composición del material no extraíble y la extractabilidad de las principales familias de compuestos fenólicos en hollejo y semilla de uva tinta apta para vinificación.
- Conocer el efecto que tiene la adición de extractos de semilla de uva como fuente de copigmentos en la extracción de compuestos antociánicos en hollejo de uva tinta.



---

## GENERAL OBJECTIVES

The main aim of this work is to study the maturity and the oenological capability of grapes by means of spectroscopic tools. Spectral characterization of grape samples has been carried out in order to classify grape samples according to their variety and develop nondestructive methodologies to predict different parameters related to grape maturity and phenolic compound extractability. In particular, the following specific aims have been proposed:

- To compare chromatographic, digital image and hyperspectral imaging analysis as tools to discriminate between different red grape varieties.
- To develop nondestructive and green chemistry methods by means of near infrared hyperspectral imaging for the screening of the principal parameters which compose phenolic and technological maturity (i.e. pH, total acidity and sugar concentration of grape must and anthocyanins and total phenols of grape skin).
- To check the feasibility of using characteristic vector analysis as tool to reduce the amount of data in near infrared grape spectra.
- To develop near infrared hyperspectral methods for the screening of the extractable content of anthocyanins, flavanols and total phenolic compounds in grape skins.
- To analyse Fourier transform infrared and Raman spectra of grape seed and skin non extractable material in order to relate their more important features to phenolic extractability levels.
- To evaluate the influence of white grape seed extracts as copigment sources on the anthocyanin extraction from red grape skin.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN





## BLOQUE I





# 1 CAPÍTULO 1: APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL A LA CLASIFICACIÓN DE MUESTRAS DE UVA

Nogales Bueno, Julio; Hernández Hierro, José Miguel; Rodríguez Pulido, Francisco José; Heredia Mira, Francisco José: *Comparative study on the use of anthocyanin profile, color image analysis and near infrared hyperspectral imaging as tools to discriminate between four autochthonous red grape cultivars from La Rioja (Spain)*. En: *Talanta* 2015. Vol. 131. Pag. 412–416, ISSN 0039–9140.

Nogales Bueno, Julio; Baca-Bocanegra, Berta; Rodríguez Pulido, Francisco José; González-Miret Martín, María Lourdes; Heredia Mira, Francisco José; Hernández Hierro, José Miguel: *Hyperspectral imaging – A novel green chemistry technology for the oenological and viticultural sectors*. En: Prathamesh Gorawala y Srushti Mandhatri (Eds.) *Agricultural research updates*. Nova Science Publishers, Inc. Vol. 12. Pag. 45–56. 2015. ISBN 978–1–63483–968–6.

## 1.1 Antecedentes

La composición de la uva está fuertemente influenciada por la variedad cultivada y las condiciones agronómicas en las que se desarrolla. Es de importancia poder conocer y controlar la composición de la uva ya que esta influye en la calidad del vino producido a partir de ella, afectando a su vez a las características sensoriales del caldo (color, aroma y sabor). Los consumidores valoran estos parámetros de calidad en los vinos y están dispuestos a pagar precios más elevados por caldos producidos a partir de mejores uvas. Es por esto que en cada campaña el precio del vino está estrechamente ligado a la calidad de la uva recolectada (Golan y Shalit, 1993).

Debido a esto, es de vital importancia conocer las características de la uva que se recibe en bodega, siendo habitual la realización de análisis para determinar su madurez o variedad. La determinación de la madurez se realiza siguiendo métodos sencillos y reproducibles, recomendados por la *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* (OIV, 1990). Sin embargo, la identificación de la variedad de la uva es realizada típicamente por medio de inspecciones visuales basadas en la experiencia y conocimiento del personal que la recepciona o mediante análisis ampelométricos de las vides, realizados por un panel de expertos cualificados para ello. En cualquier caso, sería de interés disponer de medios rápidos, reproducibles y económicamente asequibles para la realización de análisis de tanta importancia como la identificación de las variedades de uva que entran en una bodega.

Una alternativa para la identificación de variedades de uva sería el estudio de los perfiles fenólicos o antociánicos de las muestras. Este tipo de estudios arrojan resultados bastante precisos, aunque a costa de procedimientos largos y destructivos (Hermosin-Gutierrez, Castillo-Munoz, Gomez-Alonso y Garcia-Romero, 2010; Hosu, Cristea y Cimpoi, 2014). Otras técnicas como la espectroscopía ultravioleta–visible o infrarroja también se han usado para clasificar muestras de uva según su variedad (R. Ferrer-Gallego, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo y Escribano-Bailón, 2013), consiguiéndose buenos resultados de una forma rápida, económicamente asequible y respetuosa con el medio ambiente, con la ayuda de las herramientas quimiométricas apropiadas (Versari, Laurie, Ricci, Laghi y Parpinello, 2014). Dentro de las técnicas espectroscópicas, el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano ha sido aplicado al sector vitivinícola con buenos resultados en los últimos años (Baca-Bocanegra, *et al.*, 2016; Nogales-Bueno, *et al.*, 2016).

Partiendo de esta base, el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano y el análisis de imagen digital en el visible podrían aportar métodos rápidos, no destructivos y respetuosos con el medio ambiente para clasificar muestras de uva según su variedad. Además, con estos métodos se podría procesar un mayor número de muestras con un mayor grado de automatización que usando los métodos tradicionales, por lo que se considera de gran interés el estudio de su viabilidad.

## 1.2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo ha sido comparar el uso del perfil de compuestos antociánicos, el análisis de imagen digital en el visible y el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano como herramientas para discriminar entre distintas variedades de uva tinta. Los objetivos concretos planteados fueron:

- Uso del análisis cromatográfico de los antocianos presentes en el hollejo de uva tinta, para discriminar entre variedades.
- Uso del análisis de imagen digital en el visible de uva tinta intacta para discriminar entre variedades.
- Uso del análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano de uva tinta intacta para discriminar entre variedades.
- Aplicación de una fusión de datos de segundo nivel para mejorar el poder discriminatorio de los datos usados por separado.

### 1.3 Parte experimental

Se utilizaron muestras de uva tinta pertenecientes a las variedades Tempranillo, Mazuelo, Garnacha y Graciano, recolectadas en la Denominación de Origen Calificada Rioja durante la campaña de recogida de uva de 2012. En cada parcela se recolectó una muestra bruta de aproximadamente 1 kg en dos estadios distintos de maduración (uva madura y uva sobremadura) de las que se seleccionaron aleatoriamente 5 bayas para este estudio. Se obtuvo un total de 50 bayas teniendo en cuenta que se dispuso de dos parcelas donde se cultiva la variedad Tempranillo (5 uvas  $\times$  2 estadios  $\times$  5 parcelas). Las muestras fueron congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se enviaron al laboratorio para su posterior análisis.

Tras la recepción de las muestras, estas fueron atemperadas y se adquirieron las imágenes digitales en el visible con el sistema DigiEye<sup>®</sup>, siguiendo la metodología descrita por Francisco J. Rodríguez-Pulido, Gómez-Robledo, Melgosa, Gordillo, González-Miret y Heredia (2012). Como resultado de este procedimiento se obtuvieron los datos de color promedios de cada una de las bayas analizadas en el espacio de color CIELAB, en concreto, se obtuvieron los parámetros colorimétricos claridad, coordenadas colorimétricas, croma y tono ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$ ).

Tras el análisis de imagen digital se realizó el análisis de imagen hiperespectral. Se registró una imagen para cada uva siguiendo el procedimiento descrito por Hernández-Hierro, *et al.* (2013). Las imágenes se segmentaron y se obtuvieron los espectros de reflexión medios para cada baya, que fueron inmediatamente transformados a absorbancias aparentes ( $\log(\frac{1}{R})$ ). Los espectros fueron adquiridos en el intervalo comprendido entre 950–1650 nm, donde la eficiencia del dispositivo de adquisición de imágenes hiperespectrales es adecuada, con una resolución de 3.25 nm. A la matriz espectral obtenida se le aplicó un análisis de componentes principales (PCA) con el objetivo de reducir su dimensión (50 muestras  $\times$  215 absorbancias aparentes). Como resultado de este análisis se obtuvo que el 99.9% de la variabilidad espectral era explicada por los 8 primeros componentes principales, lo que indica que la matriz espectral de partida puede reducirse hasta una segunda matriz más pequeña (50 muestras representadas por las puntuaciones de 8 componentes principales) perdiendo únicamente un 0.01% de la información espectral que contenía la primera.

Por último, se separaron los hollejos de la pulpa y se realizó una extracción exhaustiva con metanol ácido (0.1% de HCl 12M). Los extractos obtenidos fueron sometidos a análisis cromatográfico de alta eficacia (HPLC) con el objetivo de conocer el perfil cromatográfico de los hollejos, identificándose hasta un total de 11 antocianos diferentes por medio de las características espectrales y cromatográficas de estos picos (por orden de elución: delphinidina-3-O-glucósido, cianidina-3-O-glucósido, petunidina-3-O-glucósido, peonidina-3-O-

glucósido, malvidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-(6''-acetil) glucósido, cianidina-3-O-(6''-p-cumaroil) glucósido (*trans*), petunidina-3-O-(6''-p-cumaroil) glucósido (*trans*), malvidina-3-O-(6''-p-cumaroil) glucósido (*cis*), peonidina-3-O-(6''-p-cumaroil) glucósido (*trans*) y malvidina-3-O-(6''-p-cumaroil) glucósido (*trans*). Se registraron las áreas de cada uno de estos picos para todas las muestras así como la suma de áreas para los compuestos acilados y los no acilados que posteriormente fueron normalizadas para la realización del análisis discriminante.

Con el objetivo de discriminar las muestras entre las 4 variedades de uva a las que pertenecen, se realizó un análisis discriminante lineal (LDA) por pasos para cada una de las matrices de datos descritas anteriormente (datos de color, puntuaciones obtenidas del PCA aplicado previamente a los datos espectrales y datos cromatográficos).

En el LDA desarrollado a partir de los datos de color se introdujeron como variables clasificatorias los datos colorimétricos obtenidos ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ,  $C_{ab}^*$  y  $h_{ab}$ ) y solo fueron retenidos por el modelo el croma y el tono. Este modelo permitió discriminar correctamente un 54% de las muestras en el proceso de validación interna y un 52% de estas en la validación cruzada dejando una muestra fuera.

En el caso de los datos obtenidos a partir de análisis de imagen hiperespectral se introdujeron en el algoritmo de cálculo del LDA las puntuaciones de los 8 primeros componentes principales obtenidos del PCA aplicado previamente a la matriz de datos espectrales originales. Las 8 variables fueron usadas por el modelo para crear las funciones discriminantes obteniéndose una discriminación correcta del 100% de las muestras en el proceso de validación interna y del 86% en la validación cruzada dejando una muestra fuera.

Todas las áreas normalizadas de los compuestos individuales y la suma de acilados y no acilados fueron introducidas en el LDA realizado para la matriz de datos cromatográficos. Sin embargo, solo tres variables fueron retenidas por el modelo, las áreas normalizadas de los picos correspondientes a cianidina-3-O-glucósido, malvidina-3-O-(6''-acetil) glucósido y petunidina-3-O-(6''-p-cumaroil) glucósido (*trans*). Con estas tres variables, el modelo desarrollado logró clasificar correctamente el 88% de las muestras en el proceso de validación interna y el 86% en la validación cruzada dejando una muestra fuera.

Por último se realizó una fusión de datos de segundo nivel entre los datos de color y los datos espectrales. Se aplicó un nuevo LDA a esta matriz de datos, reteniéndose solamente las puntuaciones de los 8 componentes principales obtenidos a partir de los datos espectrales, con lo que los resultados obtenidos fueron los mismos que para la matriz espectral.

## 1.4 Conclusiones

- El análisis cromatográfico de alta eficacia es una técnica de reconocida eficiencia para la clasificación de muestras de uva tinta según su variedad de procedencia y los resultados obtenidos en este estudio así lo confirman.
- El análisis de imagen digital es una técnica rápida, no destructiva y económica, que tiene un bajo poder discriminatorio para la clasificación de muestras de uva tinta según su variedad.
- El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano, una técnica rápida y no destructiva, tiene un poder discriminatorio elevado para la clasificación de muestras de uva tinta según su variedad, comparable al de las técnicas usadas tradicionalmente con este fin.
- La fusión de datos de segundo nivel entre datos espectrales en el infrarrojo cercano y datos colorimétricos no mejora el poder discriminatorio de las funciones obtenidas a partir de la matriz de datos espectral por separado para la clasificación de muestras de uva tinta según su variedad, por lo que su uso conjunto no resulta recomendado para esta finalidad.



## BLOQUE II





## 2 CAPÍTULO 2: DETERMINACIÓN DE LA MADUREZ TECNOLÓGICA EN UVA Y CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES EN HOLLEJO DE UVA POR ANÁLISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL

Nogales Bueno, Julio; Hernández Hierro, José Miguel; Rodríguez Pulido, Francisco José; Heredia Mira, Francisco José: *Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: a preliminary approach*. En: Food Chemistry 2014. Vol. 152. Pag. 586–591, ISSN 0308–8146.

### 2.1 Antecedentes

La fecha de recogida de la cosecha de uva, o fecha de la vendimia, es un factor clave para el sector vitivinícola ya que tiene una gran influencia en la calidad del vino que se va a producir. Entre los factores que influyen en la elección de la fecha adecuada para la vendimia tienen gran importancia la madurez tecnológica y la madurez fenólica del fruto. La madurez tecnológica se determina a través del contenido en sólidos solubles totales, o concentración de azúcares, el pH y la acidez total del mosto de la uva, mientras que la madurez fenólica está relacionada con los contenidos de compuestos fenólicos presentes mayoritariamente en las partes sólidas del fruto (hollejo y semillas) (Meléndez, *et al.*, 2013; Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, *et al.*, 2006).

Tradicionalmente, los controles de maduración de la uva realizados en bodega durante cada campaña se han desarrollado mediante el uso de análisis físicos y químicos, como densimetrías o refractometrías para la determinación de la concentración de azúcares en mosto, volumetrías para la determinación de su acidez total, análisis cromatográficos para conocer los perfiles fenólicos de las distintas partes de la uva o espectrofotométricos para conocer los contenidos fenólicos totales. La mayoría de estos métodos son lentos y conllevan la destrucción de la muestra, por lo que sería de interés reemplazarlos por métodos más rápidos y no destructivos que permitieran hacer un número más elevado de determinaciones en menos tiempo utilizando las mismas muestras para los diferentes análisis.

La espectroscopía en el infrarrojo cercano (NIRS) es una técnica no destructiva que ha sido utilizada con buenos resultados para desarrollar métodos que puedan reemplazar las técnicas tradicionales de análisis en uva (Raul Ferrer-Gallego, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo y Escribano-Bailón, 2011). Además, el análisis de imagen hiperespectral ha sido utilizado con el mismo objetivo en matrices tan diversas como pueden ser frutas o productos cárnicos (Baiano,

*et al.*, 2012; Barbin, *et al.*, 2013; Fernandes, Oliveira, Moura, Oliveira, Falco, Correia, *et al.*, 2011). Por tanto, el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano, una técnica multiparamétrica, no destructiva y respetuosa con el medio ambiente, podría ser una alternativa válida para sustituir a algunos de los métodos tradicionales de análisis en el sector vitivinícola.

## 2.2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el desarrollo de métodos no destructivos, respetuosos con el medio ambiente y más rápidos que los tradicionales mediante análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano para la estimación de los principales parámetros que conforman la madurez tecnológica y fenólica de la uva (acidez total, pH y concentración de azúcares en el mosto, y contenido en fenoles totales en el hollejo del fruto). Los objetivos concretos planteados fueron:

- Determinar diferentes parámetros relacionados con la madurez tecnológica de la uva a lo largo del proceso de maduración.
- Determinar la composición fenólica total del hollejo de uva durante el proceso de maduración.
- Desarrollar diferentes modelos de calibración utilizando distintos pretratamientos espectrales y seleccionando aquel que resulte más adecuado para la predicción de los parámetros de madurez tecnológica y fenólica estudiados.
- Comprobar la validez de los modelos de calibración desarrollados mediante la predicción de los parámetros estudiados en un set de validación externa de muestras.
- Comparar entre sí la capacidad predictora de los distintos modelos de calibración desarrollados para uva blanca, uva tinta y un modelo global para uva blanca y tinta conjuntamente.

## 2.3 Parte experimental

Las muestras usadas en este estudio fueron recolectadas dos veces por semana durante todo el periodo de maduración de la campaña de 2012 en cuatro parcelas pertenecientes a la Denominación de Origen Condado de Huelva. Se recolectaron muestras de 3 variedades distintas (una blanca en dos tipos de suelo y dos tintas) desde mediados de julio hasta principios de septiembre, obteniéndose un total de 114 muestras de la variedad de uva blanca Zalema, 51 muestras de la variedad Syrah y 48 muestras de la variedad Tempranillo.

Cada una de estas muestras se dividió en dos submuestras. Una se utilizó para la determinación de los parámetros de interés enológico, en lo que sigue parámetros de referencia, concentración de azúcares, pH y acidez total del mosto de la uva y contenido en fenoles totales

del hollejo de uva. Estas determinaciones se realizaron mediante los métodos tradicionalmente usados en bodega a tal efecto (OIV, 1990; Singleton, *et al.*, 1965). De forma paralela también se adquirieron imágenes hiperespectrales de cada una de las submuestras restantes siguiendo el procedimiento descrito por Hernández-Hierro, *et al.* (2013). Se obtuvo el espectro de absorbancias aparentes en el infrarrojo cercano promedio para cada muestra y se inició el proceso quimiométrico para el desarrollo de los distintos modelos de predicción. Se seleccionó de forma aleatoria un tercio de las muestras que se reservaron para la realización de una posterior validación externa de los modelos. Con los dos tercios restantes se inició el proceso de calibración.

De forma previa al análisis cuantitativo se pretrataron los espectros presentes en el set de calibración con una tipificación de la absorbancia (SNV) y una segunda derivada y se aplicó un análisis de componentes principales (PCA). Con esta técnica no supervisada de reconocimiento de pautas, se buscó información sobre la matriz espectral, identificando posibles *outliers* espectrales, estudiando la distribución de las muestras en el espacio recién creado, observando las posibles separaciones en diferentes grupos espectrales y utilizando esta información para la creación de los grupos usados en el posterior proceso de validación cruzada (Breton, 2003; Shenk, *et al.*, 1995). Los 15 primeros componentes principales explicaban un 99% de la variabilidad espectral, encontrando en dicho espacio un único *outlier* espectral, una muestra de la variedad Zalema cuya distancia hasta el espectro medio del set de muestras (distancia  $H$  de Mahalanobis) era mayor de 3 unidades. En este análisis, se puede observar en el primer componente principal una separación de las muestras espectrales según pertenecieran a uvas de variedad blanca o tinta, mientras que en el segundo componente se vio reflejado el grado de maduración de las muestras.

Los modelos de calibración fueron desarrollados aplicando el método de regresión por mínimos cuadrados parciales modificados (MPLS) utilizando tanto la matriz de espectros (variables independientes) como los datos de referencia o variables dependientes, determinados para esas muestras (la concentración de azúcares, el pH y la acidez total del mosto de la uva y el contenido en fenoles totales del hollejo de uva). Con el objetivo de optimizar los modelos de predicción, se aplicaron diferentes pretratamientos espectrales a los espectros originales. Se seleccionaron los modelos desarrollados con aquellos pretratamientos que permitían obtener un menor error estándar en validación cruzada, siendo estos modelos los sometidos al proceso de validación externa. Para esta validación se evaluaron los modelos obtenidos con el método MPLS mediante el cálculo de los parámetros de referencia predichos para todas las muestras pertenecientes al set de validación. Tras esto, se calculó el error obtenido en cada predicción con respecto a los valores de referencia determinados por medios convencionales y se calculó el error estándar en validación externa a partir de los errores individuales, siempre y cuando los

valores de referencia determinados analíticamente no se encontraran fuera del intervalo de aplicabilidad de los modelos. En el caso de la acidez total, dos muestras mostraron unos valores fuera del intervalo de aplicabilidad de la ecuación obtenida y no se tuvieron en cuenta para el cálculo del error estándar en validación externa de este modelo.

Un aspecto interesante de los modelos desarrollados fue que la predicción obtenida para las muestras de uva tinta era mejor que la obtenida en uva blanca para cualquiera de los parámetros de referencia tenidos en cuenta. Debido a esto se decidió repetir todo el proceso de calibración para dos sets de muestras distintos, uno con las pertenecientes a las variedades tintas y otro con las muestras de la variedad blanca Zalema. Todo el proceso descrito se repitió para estos dos nuevos sets de muestras: se reservó un tercio de las muestras para la posterior validación externa, se aplicó un PCA a las muestras de forma previa a la calibración para buscar *outliers* espectrales y ordenar las muestras según la distancia  $H$  para la creación de los grupos para la validación cruzada, se realizaron las calibraciones por medio de regresiones MPLS y se realizaron las validaciones externas de cada modelo obteniendo los distintos errores estándares de predicción en validación externa.

Los modelos desarrollados para las muestras de uva tinta resultaron tener un mayor poder predictivo que aquellos desarrollados para uva blanca, teniendo estos últimos menor poder predictivo que los modelos calculados inicialmente para todas las muestras en conjunto (excepto para acidez total). El menor error obtenido por los modelos desarrollados para muestras de uva tinta puede ser debido a la menor variabilidad espectral que presentaron los espectros de estas muestras con respecto a las muestras de uva blanca. Los sets de muestras con una reducida variabilidad espectral pueden generar modelos de calibración con una mejor capacidad predictora a expensas de una menor aplicabilidad (Shenk, *et al.*, 1995).

## 2.4 Conclusiones

- El análisis de imagen hiperespectral es una técnica válida para obtener las características espectrales de muestras de uva en la zona del infrarrojo cercano.
- La obtención de distintos modelos para predecir los parámetros de referencia estudiados (acidez total, concentración de azúcares y pH en mosto y concentración de fenoles totales en hollejo de uva) a partir de datos hiperespectrales produce resultados satisfactorios.
- El análisis de imagen hiperespectral puede considerarse una técnica adecuada para estimar la concentración de azúcares, acidez total y pH en el mosto de uva y la concentración de fenoles totales en hollejo de uva y por tanto para controlar de

forma rápida el estado de madurez tecnológica en uva y la concentración de fenoles totales en hollejo de uva.

- Debe realizarse un estudio más completo para que los modelos de calibración ganen en robustez, añadiendo a los sets utilizados muestras de distintas campañas, variedades de uva y zonas geográficas.



### 3 CAPÍTULO 3: ANALISIS DE VECTORES CARACTERÍSTICOS EN ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO PARA LA ESTIMACIÓN DE MADUREZ TECNOLÓGICA EN UVA TINTA Y CONCENTRACIÓN DE FENOLES TOTALES EN HOLLEJO DE UVA TINTA

Nogales Bueno, Julio; Ayala, Fernando; Hernández Hierro, José Miguel; Rodríguez Pulido, Francisco José; Echávarri, José Federico; Heredia Mira, Francisco José: *Simplified method for the screening of technological maturity of red grape and total phenolic compounds of red grape skin: application of the characteristic vector method to near-infrared spectra*. En: Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 63 2015. Pag. 4284–4290, ISSN 4284–4290.

#### 3.1 Antecedentes

Son conocidas las ventajas que el análisis de imagen hiperespectral tiene respecto a las técnicas tradicionales usadas en la industria agroalimentaria, y concretamente en el sector vitivinícola, para la determinación de los distintos parámetros de interés de cada sector. Debido a esto, el desarrollo de métodos de análisis basados en imagen hiperespectral ha sufrido un fuerte impulso en la última década (Gowen, O'Donnell, Cullen, Downey y Frias, 2007; Qin, Chao, Kim, Lu y Burks, 2013; Wu y Sun, 2013), llegando incluso al planteamiento de aplicaciones pensadas para su uso en líneas de producción, o aplicaciones *on-line* (García-Allende, Conde, Mirapeix, Cobo y Lopez-Higuera, 2010; Gou, *et al.*, 2013). Sin embargo, entre las desventajas de esta técnica se encuentran la gran cantidad de datos que genera, lo que implica un gran coste computacional, y el elevado coste de los sistemas de análisis de imagen hiperespectral, características que ralentizan el avance en este campo. Es por esto que una de las líneas de estudio más importantes en relación con el análisis de imagen hiperespectral es la identificación de longitudes de onda o pequeñas regiones del espectro electromagnético que tengan gran importancia en las aplicaciones estudiadas. A partir de estas longitudes de onda de interés pueden desarrollarse dispositivos de análisis de imagen que trabajen con menor cantidad de datos, los llamados sistemas de análisis de imagen multiespectral. Estos sistemas son menos complejos que los hiperespectrales y, por tanto, más económicos, recogen imágenes con menor resolución espacial y espectral y permiten una adquisición y tratamiento de datos más rápidos, posibilitando así el uso de esta tecnología en línea (Qin, *et al.*, 2013).

Existen varias alternativas para la identificación de las longitudes de onda que contienen información de interés. Las principales metodologías que suelen usarse en imagen

hiperespectral para detectar las longitudes de onda más importantes son: regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR), regresión por pasos (SWR), algoritmo de las proyecciones sucesivas (SPA), eliminación de variables sin información (UVE), segunda derivada espectral y razón entre bandas (Liu, Sun y Zeng, 2014). Son algoritmos de probada eficacia que permiten reducir el número de datos que necesitan adquirirse en las medidas espectroscópicas.

Sin embargo, existen otras técnicas, no aplicadas aún al análisis de imagen hiperespectral, que permiten la identificación de las variables más representativas dentro de un conjunto de datos. Una de ellas es el análisis de vectores característicos, un algoritmo que, aplicado a un conjunto de espectros, calcula el número y la forma de una serie de curvas fundamentales, o vectores característicos, los cuales representan la mayor parte de la variabilidad espectral de los datos originales. De esta forma, cada miembro del conjunto de espectros original puede ser representado simplemente como combinación lineal del espectro medio y una serie de vectores característicos. Usualmente, el número de vectores característicos necesarios para explicar un alto porcentaje de las diferencias existentes entre todos los espectros de la matriz original es mucho menor que el tamaño de esta matriz. Para la reconstrucción de los espectros de la matriz espectral original, además de los vectores característicos, también es necesario conocer los coeficientes o pesos por los que hay que multiplicar estos vectores. Estos pesos son únicos para cada espectro y se calculan a partir de las intensidades registradas en cada uno de ellos para varias longitudes de onda, tantas como vectores característicos seleccionados (Simonds, 1963).

Por tanto, aunque el análisis de vectores característicos no tiene entre sus objetivos fundamentales la detección de longitudes de onda de interés para las muestras con las que se trabaje, de forma indirecta, sí permite encontrarlas al reconstruir el espectro. Estas longitudes de onda aparecen en zonas con gran variabilidad espectral para las muestras medidas y son, por tanto, longitudes de onda de importancia para esas muestras y muestras similares.

El análisis de vectores característicos ha sido aplicado a conjuntos de datos espectrales en la región visible del espectro con el objetivo de reducir el número de datos necesarios para calcular las coordenadas colorimétricas de diversas muestras (vinos, brandis, vinagres, mieles y zumos) (Ayala, *et al.*, 1997; García-Parrilla, Ayala, Echávarri, Troncoso, Negueruela y Heredia, 1998; González-Miret, Ayala, Terrab, Echávarri, Negueruela y Heredia, 2007; Meléndez-Martínez, Ayala, Echávarri, Negueruela, Escudero-Gilete, González-Miret, *et al.*, 2011). Sin embargo, este algoritmo no ha sido usado aun para espectros en el infrarrojo cercano, en parte, debido al hecho de que no había un objetivo claro para su aplicación a la espectroscopía infrarroja convencional. La aparición del análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano aporta dicho objetivo debido a la gran cantidad de datos que genera, la identificación de longitudes de onda de interés que sean un buen punto de partida para el desarrollo de sistemas multiespectrales.

En el presente capítulo, el análisis de vectores característicos ha sido aplicado a espectros en el infrarrojo cercano de muestras de uva. Para comprobar la eficacia de este método, a partir de los espectros reconstruidos, se han desarrollado modelos de predicción de parámetros de interés en uva tinta, como son aquellos relacionados con la madurez tecnológica y fenólica, y se han comparado con los modelos obtenidos en el Capítulo 2. De esta forma se podrán obtener modelos simplificados para la predicción de parámetros tan importantes para el sector vitivinícola como la concentración de azúcares, la acidez total y el pH del mosto de la uva y la concentración de fenoles totales en el hollejo de uva.

### 3.2 Objetivos

El principal objetivo de este capítulo es comprobar la viabilidad del análisis de vectores característicos como técnica de reducción de datos en la zona infrarroja del espectro electromagnético. Los objetivos concretos planteados fueron:

- Aplicar el método de análisis de vectores característicos a espectros de infrarrojo cercano de uva tinta.
- Determinar el número de vectores característicos que permiten un buen equilibrio entre la calidad de la reconstrucción espectral y la reducción de datos conseguida.
- Desarrollar modelos de calibración a partir de espectros reconstruidos mediante análisis de vectores característicos para predecir la madurez tecnológica en uva tinta y concentración de fenoles totales en hollejo de uva tinta.
- Utilizar los modelos calculados a partir de espectros originales y espectros reconstruidos para evaluar la validez de las reconstrucciones espectrales realizadas.
- Identificar longitudes de onda en el infrarrojo cercano que tengan gran influencia en la variabilidad espectral encontrada en espectros de uva tinta, y que, por tanto, sean adecuadas para el desarrollo de sistemas multiespectrales para la medición de uva.

### 3.3 Parte experimental

Para la realización de este estudio se utilizaron los espectros en el infrarrojo cercano de uva tinta obtenidos en el Capítulo 2 y los datos de referencia determinados para estas muestras (acidez total, pH y concentración de azúcares en el mosto y contenido en fenoles totales en el hollejo del fruto). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el Capítulo 2, según los cuales los modelos desarrollados para uva tinta fueron los más precisos, únicamente los espectros correspondientes a estas muestras fueron utilizados en el presente capítulo. En resumen, se utilizaron un total de 99 muestras de las variedades Tempranillo y Syrah, recolectadas a lo largo de la maduración de 2012 en la Denominación de Origen Condado de Huelva. Se registraron los

espectros de estas muestras mediante análisis de imagen hiperespectral en el intervalo espectral de 950 a 1650 nm y se determinaron los citados parámetros de referencia siguiendo la metodología recomendada por la *Organisation Internationale de la Vigne et du Vin* (OIV, 1990).

Se aplicó el método de análisis de vectores característicos (Lebart, *et al.*, 1985; Simonds, 1963) a la matriz compuesta por los 99 espectros de uva tinta siguiendo la metodología descrita por Ayala, *et al.* (1997). Dos tercios de estos espectros se utilizaron para realizar el cálculo de los vectores característicos, mientras que el tercio restante se utilizó para un posterior proceso de validación externa de este método. Se obtuvieron, por orden decreciente de variabilidad espectral explicada, hasta 12 vectores característicos, y se realizaron distintas reconstrucciones de la matriz espectral a partir de 3, 6, 9 y 12 de estos vectores. Los vectores característicos obtenidos presentaban rasgos distintivos en zonas espectrales relacionadas con sobretonos de las vibraciones fundamentales de los enlaces –CH y –OH (1150, 1350 y 1550 nm) (Siesler, *et al.*, 2002).

La precisión de las distintas reconstrucciones se evaluó mediante el cálculo del error cuadrático medio (RMSE) entre cada uno de los espectros reconstruidos y su correspondiente espectro original. Los errores obtenidos fueron del orden de una décima porcentual, resultando ser inapreciable a simple vista la diferencia entre cualquiera de los espectros reconstruidos y su homólogo original. Como era de esperar, el error cometido en la reconstrucción disminuye conforme aumenta el número de vectores característicos usados. Además, la reconstrucción de los espectros usados como validación externa genera unos errores mayores en todos los casos. Estos resultados muestran que es posible aplicar el análisis de vectores característicos a espectros de uva tinta en la región del infrarrojo cercano y conseguir unas reconstrucciones espectrales válidas. Sin embargo, no es necesariamente cierto que la reconstrucción espectral conseguida sea tan buena como para que sea posible extraer información química de las muestras a partir de los espectros reconstruidos.

Para comprobar la cantidad de información química que los espectros reconstruidos mantienen se realizaron distintas calibraciones MPLS (regresión por mínimos cuadrados parciales modificada) con cada uno de los sets de espectros reconstruidos a partir de 3, 6, 9 y 12 vectores característicos, siguiendo la metodología y mismos pretratamientos espectrales que los descritos en Nogales-Bueno, Hernández-Hierro, Rodríguez-Pulido y Heredia (2014) como se ha indicado en el Capítulo 2. Tras realizar cada una de las calibraciones, se compararon los errores obtenidos por cada uno de los modelos calculados a partir de espectros reconstruidos con los errores obtenidos por sus modelos homólogos, calculados a partir de los espectros originales.

Como resultado de esta comparación se obtuvo que los errores obtenidos usando los modelos de calibración calculados a partir de espectros reconstruidos con 9 y 12 vectores característicos eran del mismo orden que los errores obtenidos con los modelos originales. De hecho, a partir de la reconstrucción espectral usando 12 vectores característicos se obtuvieron errores menores que los obtenidos a partir de los espectros originales para la calibración de fenoles totales y acidez total. Esta mejora respecto a los datos originales puede ser debida a que la reconstrucción espectral mediante análisis de vectores característicos puede reproducir las características espectrales relacionadas con las propiedades físicas y químicas de las muestras, pero no puede reproducir el ruido instrumental generado aleatoriamente por el dispositivo de medida, reduciendo así las interferencias de este en el modelado. Finalmente, se calculó el error de predicción individual para cada una de las muestras pertenecientes al set de validación, usando cada uno de los diferentes modelos desarrollados. Se obtuvo que el número de muestras predichas con un error menor del 20% era similar para los modelos de calibración calculados a partir de espectros reconstruidos con 12 vectores característicos y los calculados a partir de los espectros originales. Por tanto, el análisis de vectores característicos puede reproducir de forma satisfactoria los resultados obtenidos a partir de espectros completos con solo el 6% de la información que el dispositivo de análisis de imagen hiperespectral aporta.

### 3.4 Conclusiones

- El análisis de vectores característicos es una técnica viable para la reducción de datos en la zona infrarroja del espectro.
- El análisis de vectores característicos permite realizar la reconstrucción de espectros en el infrarrojo cercano a partir de varios vectores característicos y longitudes de onda.
- Los resultados obtenidos indican que 12 vectores característicos son un número suficiente para lograr una correcta reconstrucción de espectros en el infrarrojo cercano y para desarrollar, a partir de estos espectros, modelos de calibración de utilidad.
- La reducción de datos conseguida mediante análisis de vectores característicos puede aportar información de interés al desarrollo de dispositivos de análisis de imagen multiespectral.



## **4 CAPÍTULO 4: USO DE ANALISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL EN EL INFRARROJO CERCANO PARA LA ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO DE ANTOCIANOS EN UVA DURANTE LA MADURACIÓN**

Hernández Hierro, José Miguel; Nogales Bueno, Julio; Rodríguez Pulido, Francisco José; Heredia Mira, Francisco José: *Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of anthocyanins in intact grapes during ripening*. En: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013. Vol. 61. Pag. 9804-9809, ISSN 0021-8561.

### **4.1 Antecedentes**

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que juegan importantes y variados papeles en el reino vegetal. Entre ellos, los antocianos son responsables de las pigmentaciones rojo-violeta de muchos tejidos (Crozier, *et al.*, 2006). Son compuestos de gran importancia en el sector enológico debido a que aportan su característico color al vino tinto, interaccionan con otros compuestos fenólicos provocando cambios de color a lo largo del proceso de envejecimiento y tienen gran actividad antioxidante (Boulton, 2001; Martín Bueno, Ramos-Escudero, Sáez-Plaza, Muñoz, Navas y García Asuero, 2012). Su biosíntesis y acumulación tiene lugar en el hollejo de la uva a partir del envero del fruto, afectando a los niveles producidos diversos factores como la variedad, clima y condiciones agrarias de la vid (Hidalgo Togados, 2010). Un déficit en la acumulación de compuestos antociánicos en el hollejo de uva en el momento de la vendimia deriva en la producción de vinos con poca intensidad y estabilidad cromática (Gordillo, Rodríguez-Pulido, Mateus, *et al.*, 2012). Por tanto, para el proceso de vinificación es de extrema importancia conocer la cantidad de compuestos antociánicos que puede esperarse obtener a partir de una determinada cosecha de uva, siendo la concentración total de estos compuestos en el hollejo de la uva cosechada uno de los factores que más influyen en este aspecto.

El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano ha sido aplicado en varias ocasiones para la determinación, a modo exploratorio, de diversos parámetros de interés en uva con buenos resultados (Nogales-Bueno, *et al.*, 2016). Es, por tanto, una técnica de probada eficacia para el desarrollo de métodos rápidos, no destructivos y respetuosos con el medio ambiente para el control y estimación de parámetros enológicos de importancia en uva, como puede ser la concentración de compuestos antociánicos en el hollejo.

## 4.2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo ha sido evaluar el potencial del análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano para la estimación de la concentración de compuestos antociánicos en hollejo de uva a lo largo de la maduración del fruto. Los objetivos concretos planteados fueron:

- Determinar la composición antociánica del hollejo de uva durante el proceso de maduración.
- Desarrollar diferentes modelos de calibración, con distintos pretratamientos espectrales, seleccionando aquel que resulte más adecuado para la predicción de los compuestos antociánicos del hollejo de uva.
- Comprobar la validez de los modelos de calibración desarrollados mediante la predicción de los parámetros estudiados en un set de validación externa de muestras.
- Identificar y describir las zonas del infrarrojo cercano que más influencia tienen en los modelos de calibración desarrollados.

## 4.3 Parte experimental

Este estudio se ha llevado a cabo utilizando muestras de uva de las variedades tintas Syrah y Tempranillo, recolectadas en dos parcelas pertenecientes a la Denominación de Origen Condado de Huelva durante la campaña de maduración de 2012. Estas variedades de uva tinta son las más cultivadas en la región debido a su adecuada adaptación a las condiciones climáticas que se dan en ella. Se recolectaron un total de 99 muestras de uva durante el periodo comprendido entre el envero y la sobremaduración del fruto. Cada una de ellas fue dividida en dos submuestras y congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta la realización de los correspondientes análisis cromatográficos y de imagen hiperespectral.

Para la realización del análisis cromatográfico las muestras fueron atemperadas, se separaron los hollejos de la pulpa y se sometieron a un proceso de extracción exhaustiva utilizando metanol ácido (0.1% de HCl 12M). Una alícuota de cada extracto fue evaporada, reconstruida con agua desionizada, filtrada y diluida 1:2 con HCl 0.1 M para la realización del correspondiente análisis cromatográfico, siguiendo una modificación del método descrito por García-Marino, *et al.* (2010) como se describe en detalle en (Hernández-Hierro, *et al.*, 2013). Se identificaron hasta 15 compuestos antociánicos que fueron agrupados en dos variables para su uso como referencia en el proceso de calibrado: antocianos totales y antocianos no acilados, pudiendo obtenerse la concentración de compuestos acilados por diferencia. Durante el periodo de maduración estudiado, las concentraciones obtenidas para antocianos totales estuvieron comprendidas entre 0 y 23.8 mg/g de hollejo con una desviación estándar de 5.6 mg/g de hollejo

expresados como equivalentes de malvidina-3-O-glucósido, mientras que en el mismo periodo los compuestos antociánicos no acilados oscilaron entre 0 y 16.9 mg/g de hollejo con una desviación estándar de 3.9 mg/g de hollejo expresados como equivalentes de malvidina-3-O-glucósido.

Cada una de las submuestras restantes, tras ser descongelada y atemperada, fue sometida a un análisis de imagen hiperespectral, recogiendo sus espectros de reflectancia en la región del espectro electromagnético comprendida entre 900 y 1700 nm con una resolución espectral de 3.25 nm. Posteriormente, cada imagen fue sometida a una calibración de doble punto, para ello se adquirieron imágenes de un material de referencia y de la corriente de oscuridad del equipo, señal que recoge el detector cuando no recibe luz. Para la adquisición de las imágenes hiperespectrales, las muestras se situaron sobre una bandeja de polietileno, la cual facilitó el proceso de segmentado debido a las grandes diferencias espectrales existentes entre el soporte y las muestras. Esta segmentación se realizó mediante análisis discriminante y permitió seleccionar las partes de las imágenes pertenecientes a uva y, así, desechar el resto. Además solo el intervalo espectral comprendido entre 950 y 1650 nm fue almacenado debido a la reducida eficiencia del detector en los límites de su zona de medida. Seguidamente, se obtuvo un espectro medio para cada una de las imágenes adquiridas y se transformó este a absorbancias aparentes ( $\log 1/R$ ). La matriz espectral obtenida se dividió en dos sets de muestras, uno de ellos, con dos tercios de las muestras espectrales, se dedicó al desarrollo de los modelos de calibración para la predicción de las variables de referencia, mientras que el tercio restante de muestras espectrales se reservó para la posterior validación externa de los modelos generados.

Las muestras alojadas en el set de calibración fueron pretratadas mediante una tipificación de la absorbancia (SNV) y una segunda derivada de forma previa a la aplicación de un análisis de componentes principales (PCA). Este análisis cualitativo no supervisado crea un nuevo espacio donde se ordenan las muestras, permitiendo identificar los posibles *outliers* espectrales y crear distintos grupos de muestras homogéneos entre sí, aunque heterogéneos internamente, para el posterior proceso de validación cruzada que tendrá lugar durante la calibración. En el espacio recién creado se encontraba representada el 99% de la variabilidad espectral del set de calibración usando 11 componentes principales. No se encontró ningún *outlier* espectral, ni tendencia apreciable que permitiera separar las muestras de ambas variedades en función del espectro. Sin embargo, sí se encontró influencia del estado de maduración de las muestras en el espectro de estas.

Seguidamente se realizó el proceso de calibración mediante regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS). Para esta calibración se utilizaron como variables independientes los espectros de las muestras sin pretratar y como variables dependientes los parámetros de referencia previamente obtenidos, es decir, la concentración de antocianos totales

o la concentración total de antocianos no acilados. Se probaron distintos pretratamientos espectrales para mejorar la capacidad de predicción de los modelos generados y se seleccionaron los que menor error estándar de validación cruzada generaban. Los dos modelos seleccionados (uno para cada parámetro de referencia) fueron posteriormente evaluados utilizando el set de muestras reservado para el proceso de validación externa. Una de las muestras fue descartada para la validación de los modelos por presentar valores de referencia fuera de los intervalos de aplicabilidad del mismo. A partir de este proceso de validación externa se obtuvieron los errores estándares de predicción en validación externa para la predicción de antocianos totales y antocianos no acilados en hollejo de uva intacta de las variedades Syrah y Tempranillo. Los errores obtenidos fueron del orden de 3 mg/g de hollejo expresados como equivalentes de malvidina-3-*O*-glucósido. Errores adecuados para la determinación, a modo exploratorio, de los parámetros estudiados.

Cabe destacar que durante el proceso de calibrado, el algoritmo MPLS realiza una reducción de variables mediante el cálculo de unas variables latentes o factores PLS. Esta reducción de variables es realizada de forma que los primeros factores o variables latentes contengan la mayor información para la predicción de las muestras. Se comprobó que existen ciertas zonas de los factores PLS que tienen mayor influencia en la predicción de la concentración de antocianos que otras. En concreto, las regiones cercanas a 1150 y 1400 nm mostraron importantes contribuciones a los modelos. Estas zonas espectrales se corresponden con sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones fundamentales de los enlaces -CH y -OH.

#### 4.4 Conclusiones

- El análisis de imagen hiperespectral es una técnica válida para obtener las características espectrales de muestras de uva tinta en la zona del infrarrojo cercano, pudiéndose generar a partir de estos espectros modelos de calibración de parámetros de interés en estas muestras.
- Es posible predecir, de forma satisfactoria, el contenido en antocianos totales y en antocianos no acilados presentes en hollejo de uva a partir del espectro en la región del infrarrojo cercano del fruto adquirido de forma no destructiva.
- Existen ciertas zonas del espectro en el infrarrojo cercano que tienen una mayor influencia en la predicción de la concentración de antocianos en hollejo de uva.
- Debe realizarse un completo estudio para que los modelos de calibración ganen en robustez, añadiendo a los sets utilizados muestras de distintas campañas, variedades de uva y zonas geográficas.

## **BLOQUE III**





## 5 CAPÍTULO 5: APLICACIÓN DEL ANÁLISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL EN EL INFRARROJO CERCANO A LA ESTIMACIÓN DEL CONTENIDO EXTRAIBLE DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN UVA TINTA

Nogales Bueno, Julio; Baca Bocanegra, Berta; Rodríguez Pulido, Francisco José; Heredia Mira, Francisco José; Hernández Hierro, José Miguel: *Use of near infrared hyperspectral tools for the screening of extractable polyphenols in red grape skins*. En: Food Chemistry 2015. Vol. 172. Pag.559-564, ISSN 0308–8146.

### 5.1 Antecedentes

La cantidad de compuestos fenólicos que contiene la uva tinta en un estado óptimo de maduración es de aproximadamente 4 g/kg. Durante el proceso de vinificación, parte de estos compuestos fenólicos pasan al vino, bien por transferencia directa del mosto o por extracción de los compuestos fenólicos presentes en las partes sólidas de la uva durante la maceración (Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, *et al.*, 2006). La facilidad de extracción de los compuestos fenólicos al vino, o extractabilidad, está íntimamente ligada al estado de madurez del fruto, siendo los frutos más maduros los que presentan una mayor degradación de la pared celular, lo que facilita la liberación de los compuestos fenólicos formados en las vacuolas celulares (Bautista-Ortín, *et al.*, 2013; Hernández-Hierro, Quijada-Morín, Martínez-Lapuente, Guadalupe, Ayestarán, Rivas-Gonzalo, *et al.*, 2014; Quijada-Morín, Hernández-Hierro, Rivas-Gonzalo y Escribano-Bailón, 2015).

En consecuencia, no solo es necesario conocer la cantidad total de compuestos fenólicos que contiene una determinada muestra o lote de uva, si no también conocer la cantidad de estos compuestos que pasarán a formar parte del vino. Existe una gran heterogeneidad entre muestras de una misma fase fisiológica en cuanto a maduración, contenido fenólico total y contenido fenólico extraíble, debida a factores como la variedad de uva, la relación volumétrica entre el hollejo y la baya, la región de cultivo, el clima u otras condiciones agronómicas, incluso, es frecuente encontrar heterogeneidad entre muestras pertenecientes al mismo cultivo (Crozier, *et al.*, 2006). Debido a lo anterior, son necesarios métodos de análisis que permitan una determinación ágil y eficaz de estos parámetros.

Entre los compuestos fenólicos de la uva pueden encontrarse tanto flavonoides como no flavonoides. La mayoría de los flavonoides presentes en uva tinta se encuentran en el hollejo y las semillas del fruto, por lo que su extracción al vino se produce durante la etapa de

maceración. Entre estos compuestos, los flavanoles son los más abundantes y juegan un papel importante en las características sensoriales del vino, pudiéndole aportar amargor, astringencia o cuerpo. Además, aumentan y estabilizan su color actuando como cofactores del proceso de copigmentación de los antocianos. Los antocianos son los compuestos flavonoides responsables del característico color del vino tinto, son transferidos desde los hollejos al mosto durante la etapa de maceración (Waterhouse, 2002). Los compuestos no flavonoides presentes en el vino tinto, procedentes de la uva, son derivados de ácidos hidroxicinámicos y benzoicos, aportando así, entre otras cosas, carácter ácido al vino (Jackson, 2000). Por último, los compuestos fenólicos, flavonoides y no flavonoides, influyen positivamente en la actividad antioxidante del vino (Rice-Evans, *et al.*, 1997).

Para conocer la cantidad de compuestos fenólicos que pasan del hollejo de uva al vino, o contenido extraíble de compuestos fenólicos, es necesario separar los hollejos de la pulpa, realizar maceraciones simuladas de estos hollejos y analizar los extractos resultantes mediante métodos espectrofotométricos o cromatográficos. En definitiva, es necesario realizar un proceso largo, destructivo y no respetuoso con el medio ambiente, el cual sería interesante sustituir por nuevos métodos que mejoraran estos aspectos. Como ya se ha dicho, el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano ha demostrado ser un método válido para la predicción de parámetros de interés en uva, por lo que es un candidato válido para el desarrollo de estos métodos.

## 5.2 Objetivos

El objetivo principal de este capítulo ha sido el desarrollo de métodos rápidos y no destructivos para la estimación de los contenidos extraíbles de antocianos, flavanoles y fenoles totales en hollejo de uva tinta mediante análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano. Concretamente, los objetivos planteados fueron:

- Determinar el contenido extraíble de antocianos, flavanoles y fenoles totales en hollejo de uva tinta apta para vendimia.
- Caracterizar espectralmente muestras de uva tinta y realizar una selección de muestras espectralmente heterogéneas.
- Desarrollar modelos de calibración a partir de análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano para la estimación de los contenidos extraíbles de antocianos, flavanoles y fenoles totales en hollejo de uva tinta.
- Comprobar la validez de los modelos de calibración desarrollados mediante la predicción de dichos parámetros en un set de validación externa de muestras.

- Evaluar la heterogeneidad existente en contenidos fenólicos extraíbles en un mismo estado fisiológico.

### 5.3 Parte experimental

Para la realización de este estudio se utilizaron muestras de uva tinta de las variedades Syrah y Tempranillo recolectadas en el momento de la vendimia en la campaña 2013. Se recolectaron aleatoriamente 100 bayas de cada variedad en dos parcelas pertenecientes a la Denominación de Origen Condado de Huelva. Las muestras fueron refrigeradas y llevadas al laboratorio, donde, de forma inmediata, se atemperaron y se sometieron a un análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano. Las imágenes de cada una de las muestras se calibraron respecto a un patrón de referencia y la corriente oscura del equipo, y se almacenó el espectro medio de cada baya (950–1650 nm).

A este conjunto de espectros se le aplicó un pretratamiento, para reducir los efectos de dispersión de la luz (SNV y segunda derivada), y un análisis de componentes principales (PCA), el cual permitió conocer la estructura espectral de la matriz. Teniendo en cuenta 5 componentes principales se consiguió explicar el 90% de la variabilidad espectral de los datos originales y se encontraron 3 *outliers* espectrales los cuales dejaron de formar parte del conjunto de muestras estudiado. Con las restantes muestras, ordenadas en este espacio pentadimensional de acuerdo a su distancia de Mahalanobis ( $H$ ), se realizó un proceso de selección de muestras, se agruparon todas las muestras que tuvieran una distancia de Mahalanobis a la muestra vecina ( $NH$ ) menor que 0.6, obteniéndose 34 grupos distintos. Se seleccionó una muestra de cada uno de los grupos obteniéndose así un set de 34 muestras en el cual estaba representada toda la variabilidad espectral del conjunto original de 197 muestras. Seguidamente, se seleccionó otra muestra de cada uno de los grupos (solo fue posible hacerlo en 21 de estos grupos debido a que en 13 únicamente había una muestra), creándose así otro set de muestras representativas. Estos sets de muestras fueron utilizados, respectivamente, para realizar el calibrado y la validación externa de los modelos desarrollados.

Los parámetros de referencia a predecir fueron los contenidos extraíbles de antocianos, flavanoles y fenoles totales en hollejo de uva. De forma previa a la realización de los calibrados, se determinaron estos parámetros para las 34 muestras alojadas en el set de calibración. Los hollejos fueron macerados durante tres días en vino sintético, una disolución en base acuosa con un 12.5% de etanol, 4 g/L de ácido tartárico y un pH de 3.6. Seguidamente, se determinaron las concentraciones de los parámetros de referencia en los extractos resultantes. La determinación de antocianos se realizó mediante análisis cromatográfico, siguiendo una modificación del método descrito por García-Marino, *et al.* (2010) como se describe en Hernández-Hierro, *et al.* (2013). Para la determinación de flavanoles se utilizó el método espectrofotométrico descrito

por Vivas, *et al.* (1994), el cual mide la reacción entre el reactivo 4-(dimetilamino)cinamaldehído (DMACA) y los compuestos flavanólicos de la muestra, mientras que la determinación de los fenoles totales presentes en los extractos se utilizó el también método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu (Singleton, *et al.*, 1965).

Una vez obtenidos los parámetros de referencia, se realizaron las calibraciones mediante regresión por mínimos cuadrados parciales modificada (MPLS) utilizando los espectros alojados en el set de calibración y los datos de referencia anteriormente mencionados. Se probaron distintos pretratamientos espectrales para optimizar el error estándar de calibración que se obtiene en el proceso de validación cruzada (SECV) y se seleccionó el modelo que menor error generaba para cada uno de los parámetros de referencia. Tras esto se realizó la validación externa de los modelos usando las muestras seleccionadas para tal efecto. De forma previa habían sido determinados los parámetros de referencia, pertenecientes a estas muestras, siguiendo la metodología descrita anteriormente. Como resultado del proceso de validación, se obtuvo el error estándar de predicción (SEP) en validación externa para cada modelo. Se consiguió predecir los contenidos extraíbles de antocianos, flavanoles y fenoles totales en las muestras alojadas en el set de validación con unos errores de predicción del orden de entre 0.5 y 1 mg/g de hollejo dependiendo del parámetro.

Por último, los métodos desarrollados se utilizaron para predecir los contenidos extraíbles de antocianos, flavanoles y fenoles totales en todas las muestras (197), sin tener en cuenta los *outliers* espectrales. Se obtuvo una gran heterogeneidad en los resultados y se comprobó que estos seguían distribuciones normales. Esto confirma que existe heterogeneidad en cuanto a los contenidos extraíbles de compuestos fenólicos pudiéndose atribuir a la diferencia de maduración entre muestras pertenecientes a un mismo punto de muestreo. Además, se comprueba que los compuestos fenólicos son más fácilmente extraíbles para las muestras de la variedad Tempranillo que para las de la variedad Syrah, lo que podría deberse a diferencias en el estado de maduración en el momento de la vendimia entre ambas variedades, siendo las uvas de Tempranillo las que tienen un mayor nivel de madurez, una mayor degradación de la pared celular y, por tanto, producen una mayor cesión de compuestos fenólicos al vino.

## 5.4 Conclusiones

- El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano puede considerarse una técnica válida para estimar el contenido extraíble de compuestos fenólicos (flavanoles, antocianos y fenoles totales) procedentes de hollejo de uva tinta.
- La selección de muestras espectrales mediante análisis de componentes principales permite reducir el número de muestras necesarias para realizar modelos de

calibración manteniendo la heterogeneidad espectral existente en el set de muestras de partida.

- Existe heterogeneidad en cuanto al contenido extraíble de compuestos fenólicos dentro de un mismo punto de muestreo atribuible a diferencias de maduración y/o degradación de la pared celular del hollejo.
- La metodología desarrollada permite clasificar muestras de acuerdo a su contenido extraíble de compuestos fenólicos de forma no destructiva que podrán ser utilizadas posteriormente para la realización de otros análisis.
- Existe diferencia en cuanto a facilidad de extracción de los compuestos fenólicos entre las variedades de uva tinta Tempranillo y Syrah en una misma fecha, lo que puede atribuirse a diferencias en la velocidad de maduración y/o degradación de la pared celular del hollejo entre ambas variedades.



## 6 CAPÍTULO 6: ESTUDIO DE EXTRACTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN SEMILLA DE UVA MEDIANTE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR Y RAMAN

Nogales Bueno, Julio; Baca Bocanegra, Berta; Rooney, Abigail; Hernández Hierro, José Miguel; Byrne, Hugh J.; Heredia Mira, Francisco José: *Study of phenolic extractability in grape seeds by means of ATR-FTIR and Raman spectroscopy*. Enviado a Food Chemistry, ISSN 0308-8146 (en revisión).

### 6.1 Antecedentes

Las semillas de la uva representan únicamente el 5% del peso total de la baya, sin embargo, contribuyen extensamente a las propiedades del vino debido a que en ellas se desarrollan, a lo largo de la maduración, distintos compuestos fenólicos que pueden ser transferidos a este. En el momento de la vendimia contienen entre el 20 y el 60% del total de compuestos fenólicos del grano de uva, siendo la mayor parte flavanoles, ya sean monómeros u oligómeros (Hidalgo Togados, 2010; Jackson, 2000). Durante el proceso de vinificación, concretamente en la maceración, estos compuestos pasan desde las semillas al vino mediante extracción sólido-líquido. Esto, unido a que típicamente los flavanoles presentes en la semilla son considerados más astringentes que aquellos que se encuentran en el hollejo, hace que sea de gran importancia conocer cómo y porqué se produce esta extracción.

La facilidad de extracción de los compuestos fenólicos desde las partes sólidas de la uva aumenta conforme lo hace el grado de madurez del fruto y, por tanto, la degradación de la pared celular (Hernández-Hierro, *et al.*, 2014; Quijada-Morín, *et al.*, 2015). Dentro de las partes sólidas de la uva, los flavanoles pueden encontrarse libres dentro de sus vacuolas celulares, combinados formando polímeros con polisacáridos de las paredes celulares o inmovilizados dentro de estas paredes (Hidalgo Togados, 2010). Se ha comprobado que, a medida que la semilla de uva madura, se producen cambios en la estructura de los polisacáridos de la pared celular, facilitando, por tanto, la liberación de los compuestos fenólicos retenidos en la célula (Bautista-Ortín, *et al.*, 2013). Teniendo en cuenta lo anterior, es interesante obtener más información sobre cómo se dan estos cambios en la estructura de la pared celular en semillas de diferentes variedades y con diferentes niveles de extractabilidad.

El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano ha sido usado para predecir el contenido total y el contenido extraíble de flavanoles en semilla de uva con buenos resultados (F.J. Rodríguez-Pulido, *et al.*, 2014). Sin embargo, no es posible estudiar en profundidad la

relación entre la extractabilidad de compuestos fenólicos y la degradación de la pared celular utilizando la espectroscopía en el infrarrojo cercano. La complejidad de esta región del espectro, donde aparecen solapados numerosos sobretonos y bandas de combinación de vibraciones fundamentales (C–H, O–H o N–H), limita la utilidad del infrarrojo cercano para la determinación estructural. Es en la región del infrarrojo medio donde aparecen picos más intensos y mejor definidos, correspondientes a las vibraciones fundamentales de estos enlaces (Bokobza, 1998).

La espectroscopía vibracional, que comprende espectroscopía infrarroja y Raman, ha sido aplicada en numerosas ocasiones al estudio de la pared celular de uva y otras frutas, aunque no se han encontrado estudios que apliquen estas técnicas a semillas de uva. Son técnicas complementarias entre sí, que permiten estudiar la información molecular desde dos puntos de vista distintos (Byrne, *et al.*, 2011). Es por tanto de interés aplicar la espectroscopía vibracional a muestras de semilla uva para intentar relacionar las características estructurales observadas con dichas técnicas con parámetros de interés de la semilla como puede ser su facilidad de cesión (o extractabilidad) de compuestos fenólicos.

## 6.2 Objetivos

El objetivo general de este trabajo ha sido estudiar mediante espectroscopía en el infrarrojo medio y Raman la relación existente entre la composición de la pared celular y la extractabilidad de fenoles totales y de flavanoles en semilla de uva tinta. Concretamente, los objetivos planteados fueron:

- Aplicar el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano a semillas de uva tinta aptas para vendimia, para su caracterización espectral y realizar una selección de muestras espectralmente heterogéneas.
- Estudiar la extractabilidad de fenoles totales y flavanoles en semilla de uva tinta apta para vendimia.
- Agrupar semillas de uva tinta según su extractabilidad de fenoles totales y flavanoles.
- Caracterizar espectralmente muestras de material no extraíble de semilla de uva tinta usando espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier y vincular las características espectrales más importantes con vibraciones fundamentales de enlaces presentes en las muestras.
- Caracterizar espectralmente muestras de material no extraíble de semilla de uva tinta usando espectroscopía Raman y vincular las características espectrales más importantes con vibraciones fundamentales de enlaces presentes en las muestras.

- Estudiar la relación existente entre las diferentes características espectrales encontradas en el material no extraíble semillas y los niveles de extractabilidad de fenoles totales y flavanoles.

### 6.3 Parte experimental

Para este estudio se recolectaron muestras de semilla de uva tinta apta para vinificación en dos parcelas pertenecientes a la Denominación de Origen Condado de Huelva en la campaña 2014. Se recolectaron 100 uvas de cada una de las variedades Syrah y Tempranillo en el momento de la vendimia que fueron refrigeradas y llevadas inmediatamente al laboratorio. Allí se separaron las semillas de cada uva, se eliminaron completamente los restos de pulpa y la humedad superficial. Seguidamente, se adquirieron imágenes hiperespectrales de cada una de las muestras, se calibraron y se guardó el espectro medio, en absorbancias aparentes, en el intervalo comprendido entre 950 y 1650 nm. Durante todo el estudio, las semillas provenientes de una misma uva se trataron como una única muestra.

Posteriormente se realizó la selección de un set de muestras espectralmente representativo del total de muestras recogidas siguiendo la metodología que se describe en el Capítulo 5. De forma breve, se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) a la matriz espectral obteniéndose que 8 componentes principales eran suficientes para explicar el 90% de la variabilidad espectral. Se calculó la distancia de Mahalanobis ( $H$ ) para cada muestra, diferencia espectral entre cada muestra respecto y la media del conjunto, y la distancia de Mahalanobis a la muestra vecina ( $NH$ ). Seguidamente se agruparon todas las muestras que tuvieran una distancia  $NH$  menor que 0.6, obteniéndose 66 grupos distintos y se seleccionó una muestra al azar de cada uno de los grupos, obteniéndose un set de 66 muestras, representativo de la variabilidad espectral de las 200 muestras iniciales.

Cada una de las muestras seleccionadas fue sometida a una extracción en vino sintético durante un periodo de tres días tras el cual se retiraron y se congelaron los sobrenadantes. El residuo sólido resultante se liofilizó y se sometió a una extracción exhaustiva en una disolución acuosa de metanol al 75%. De nuevo, los sobrenadantes fueron almacenados a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y el material no extraíble resultante se liofilizó y almacenó en desecador hasta la realización de las medidas espectrales. Para cada uno de los extractos obtenidos, ya fueran en vino sintético o en metanol, se determinaron los fenoles totales y los flavanoles extraídos. Los fenoles totales se determinaron siguiendo el método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu (Singleton, *et al.*, 1965) y los flavanoles mediante el método descrito por Vivas, *et al.* (1994). Teniendo en cuenta que la extracción en vino sintético emula la extracción de los compuestos fenólicos que se produce en la vinificación durante la etapa de maceración y que la extracción exhaustiva pretende extraer la totalidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra, se determinó la

extractabilidad de fenoles totales y de flavanoles para cada muestra como la relación porcentual entre lo extraído en vino sintético y el total extraído como suma de ambos procesos.

A partir de la extractabilidad de fenoles totales y de flavanoles se realizó un agrupamiento de las muestras en tres grupos mediante el algoritmo de K-medias. Los grupos obtenidos agrupaban muestras con valores de extractabilidad de fenoles totales y de flavanoles bajos, medios y altos, por lo que, en lo que sigue, las muestras fueron divididas en estas tres categorías.

El residuo sólido, proveniente de las muestras de semilla, obtenido tras las extracciones (material no extraíble) se midió espectroscópicamente mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y espectroscopía Raman. Las medidas en infrarrojo se realizaron utilizando un accesorio de reflexión total atenuada (ATR-FTIR) en la región comprendida entre 600 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  (17000 y 2500 nm). Las medidas Raman se realizaron excitando las muestras con un láser a 785 nm y registrando el espectro obtenido desde 400 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ . En ambos casos se realizaron 6 medidas para cada muestra. Todos los espectros fueron pretratados, o bien mediante una corrección de los efectos multiplicativos de la dispersión (MSC) para los espectros FTIR o mediante una eliminación de la línea base para los espectros Raman. En ambos casos se calculó el espectro medio de cada muestra como promedio de las 6 medidas anteriormente mencionadas.

Con el objetivo de buscar tendencias dentro de la matriz de espectros FTIR se aplicó un PCA, explicando el 99% de la variabilidad espectral a partir de 13 componentes principales y obteniéndose un *outlier* espectral con una distancia  $H$  mayor a 3 en dicho espacio. Sólo se encontró una ligera tendencia en cuanto a extractabilidad de compuestos fenólicos entre los niveles de baja y alta extractabilidad en las puntuaciones de los dos primeros componentes principales. Teniendo en cuenta los pesos (*loadings*) obtenidos, se identificó una serie de zonas espectrales donde se concentraba la mayor parte de la variabilidad espectral del conjunto de datos. Estas zonas, que coinciden en la mayoría de los casos con máximos o picos en los espectros (absorciones debidas a vibraciones fundamentales), se atribuyeron a polisacáridos, lignina, lípidos, pectinas o compuestos fenólicos (Foo, 1981; Lupoi, Singh, Parthasarathi, Simmons y Henry, 2015; Wilson, Smith, Kačuráková, Saunders, Wellner y Waldron, 2000).

En estos espectros se encontraron 13 máximos, o picos, originados por absorciones fundamentales de distintos modos vibracionales de enlaces presentes en las muestras. Para comprobar si existía relación entre estas absorciones en el infrarrojo y el nivel de extractabilidad de compuestos fenólicos que presenta la semilla de uva se midió la altura de cada pico para cada muestra y se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Se utilizaron las alturas de pico como variables dependientes y el nivel de extractabilidad de compuestos fenólicos (bajo, medio o alto)

como factor o variable independiente. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para 10 de las alturas de pico. Para detectar que grupos eran significativamente diferentes entre sí se aplicó el test *post hoc* de Tukey. Mediante este test, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los distintos grupos para picos relacionados con compuestos fenólicos, polisacáridos, ligninas o pectinas y para otros picos asociados a propiedades de la pared celular como es el grado de esterificación de las pectinas (Foo, 1981; Heredia-Guerrero, Benítez, Domínguez, Bayer, Cingolani, Athanassiou, *et al.*, 2014). Por tanto, además del resultado obvio de que los compuestos fenólicos que aún quedan en las muestras tienen influencia en la extractabilidad de estos compuestos, se confirmó que la composición de la pared celular tiene influencia en la facilidad de extracción de estos compuestos. Además, usando la variedad de uva como factor, también se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para 4 picos que habían demostrado influir en la extractabilidad de compuestos fenólicos, con lo que existe cierta interrelación entre ambos factores, es decir, variedad y extractabilidad.

Con el objetivo de confirmar los indicios encontrados se realizó un proceso similar con los espectros Raman. En estos espectros, solo 5 picos fueron identificables tras la eliminación de la línea base estando asociados a polisacáridos, ligninas, ácidos grasos, lípidos y compuestos fenólicos (da Silva, Vandenabeele, Edwards y Cappa de Oliveira, 2008; Lupoi, Gjersing y Davis, 2015). Se realizó un nuevo ANOVA usando la altura de estos picos como variables dependientes y la extractabilidad de compuestos fenólicos como factor, encontrándose de nuevo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los distintos niveles de extractabilidad para tres picos. Dichos picos fueron asignados a enlaces presentes en compuestos fenólicos, lignina y polisacáridos, por lo que la espectroscopía Raman permite confirmar la relación existente entre los componentes estructurales de la pared celular y la facilidad de extracción de compuestos fenólicos. Además, se realizó un nuevo ANOVA utilizando esta vez la variedad de uva como factor, mediante el cual, se encontraron diferencias significativas entre ambas variedades para un único pico asignado a enlaces presentes en lignina y ácidos grasos.

## 6.4 Conclusiones

- La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier ha probado ser una técnica efectiva y fiable para relacionar las características espectrales más importantes con el nivel de extractabilidad de fenoles totales y flavanoles en semilla de uva.
- El análisis de los datos obtenidos mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier confirma que la extractabilidad de compuestos fenólicos está influenciada tanto por la composición de la pared celular como por el grado de esterificación de las pectinas.

- La espectroscopía Raman proporciona datos de interés en el estudio de la estructura de la pared celular de la semilla de uva.
- Los resultados obtenidos utilizando espectroscopía de infrarrojo han sido confirmados mediante espectroscopía Raman. Dispersiones Raman asociadas a componentes de la pared celular muestran relación con la extractabilidad de compuestos fenólicos.

## 7 CAPÍTULO 7: RELACIÓN ENTRE ESPECTROSCOPIA ATR-FTIR Y RAMAN CON LA EXTRACTABILIDAD DE COMPUESTOS FENÓLICOS Y OTROS ATRIBUTOS DE INTERÉS EN HOLLEJO DE UVA

Nogales Bueno, Julio; Baca Bocanegra, Berta; Rooney, Abigail; Hernández Hierro, José Miguel; Heredia Mira, Francisco José; Byrne, Hugh J.: *Linking ATR-FTIR and Raman features to phenolic extractability and other attributes in grape skin*. Enviado a *Talanta*, ISSN 0039-9140 (en revisión).

### 7.1 Antecedentes

En la presente memoria se ha estudiado ampliamente la composición fenólica del hollejo de uva, haciéndose hincapié, en el Capítulo 5, en la importancia que tiene la facilidad con la que estos compuestos son cedidos al vino durante la vinificación. Los compuestos fenólicos presentes en el hollejo de uva aportan al vino cualidades organolépticas de gran importancia, de las cuales depende directamente su calidad (Crozier, *et al.*, 2006; Rice-Evans, *et al.*, 1997; Waterhouse, 2002).

Es bien conocido que la extractabilidad de compuestos fenólicos en hollejo de uva depende significativamente de la madurez del fruto. A medida que aumenta el nivel de maduración de la uva, la degradación de la pared celular de los tejidos de la baya también es mayor y hay una mayor facilidad para que los compuestos fenólicos atraviesen o sean liberados por estas paredes celulares (Hernández-Hierro, *et al.*, 2014; Ortega-Regules, Romero-Cascales, Ros-García, López-Roca y Gómez-Plaza, 2006; Quijada-Morín, *et al.*, 2015; Ribéreau-Gayon, Dubourdieu, *et al.*, 2006). Se han correlacionado aumentos en el contenido de azúcar del mosto de la uva (indicador de madurez del fruto) con descensos en la cantidad de material en la pared celular del hollejo, galactosa, celulosa y manosa acompañado por una reducción del grado de esterificación de los polisacáridos pécticos o pectinas (Ortega-Regules, *et al.*, 2008).

Otro factor importante a la hora de estudiar la extractabilidad de compuestos fenólicos en hollejo de uva es que este presenta distintas capas de células anatómicamente distinguibles entre sí. Es necesario conocer como la estructura y composición de la pared celular cambia entre las distintas capas para entender las diferencias en extractabilidad que se puedan encontrar. La capa más externa, llamada cutícula, no contiene polifenoles y está compuesta principalmente por ácidos grasos hidroxilados, llamados cutinas, y cubierta por una capa de ceras hidrófobas. Seguidamente se encuentra la epidermis formada por una o dos capas de células dispuestas

regularmente y por último la hipodermis, la capa más cercana a la pulpa y donde se encuentran la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en el hollejo (Hidalgo Togores, 2010; Pinelo, *et al.*, 2006). Por tanto, durante el proceso de vinificación, la etapa de estrujado tiene una gran influencia en la extractabilidad de compuestos fenólicos del hollejo de uva ya que un estrujado poco eficiente no generara suficiente contacto entre el mosto y la capa interna del hollejo de la uva (Asselin, *et al.*, 2003).

La composición de la pared celular del hollejo de uva ha sido relacionada con la extractabilidad de compuestos fenólicos (principalmente antocianos) utilizando espectroscopía en el infrarrojo medio (Femenia, Sánchez, Simal y Rosselló, 1998; Hernández-Hierro, *et al.*, 2014). En estos estudios se relacionaron las características espectrales que aparecen en esta región del espectro con el grado de esterificación de las pectinas. Además, la composición de la pared celular de otras frutas ha sido ampliamente estudiada utilizando tanto espectroscopía en el infrarrojo como espectroscopía Raman (Gierlinger, Keplinger y Harrington, 2012; Kyomugasho, Christiaens, Shpigelman, Van Loey y Hendrickx, 2015). Ambas técnicas, que conforman la llamada espectroscopía vibracional, estudian las vibraciones que se dan en los enlaces moleculares desde dos puntos de vista complementarios. Mientras que las absorciones en el infrarrojo están asociadas a transiciones vibracionales que provocan cambios en el momento dipolar permanente del enlace, las dispersiones Raman solo se dan cuando el enlace sufre un cambio de polarizabilidad (momento dipolar inducido) debido a su transición vibracional (Byrne, *et al.*, 2011; Peña, *et al.*, 1989). Es, por tanto, de interés estudiar la relación existente entre la composición de la pared celular del hollejo de uva y la extractabilidad de compuestos fenólicos en estos hollejos mediante espectroscopía vibracional.

## 7.2 Objetivos

En este trabajo se ha utilizado espectroscopía en el infrarrojo medio y Raman para estudiar la relación existente entre la composición de la pared celular y la extractabilidad de fenoles totales, flavanoles y antocianos en hollejo de uva tinta. Concretamente, los objetivos planteados fueron:

- Agrupar muestras de uva tinta según la extractabilidad de fenoles totales, flavanoles y antocianos que presenten sus hollejos.
- Caracterizar espectralmente muestras de material no extraíble de hollejo de uva tinta usando espectroscopía de infrarrojo mediante transformada de Fourier.
- Vincular las características espectrales más importantes de las superficies externas e internas del hollejo con vibraciones fundamentales de enlaces presentes en las muestras.

- Caracterizar espectralmente muestras de material no extraíble de hollejo de uva tinta usando espectroscopía Raman distinguiendo entre superficie externa e interna del hollejo.
- Vincular las características espectrales más importantes de las superficies externas e internas del hollejo con vibraciones fundamentales de enlaces presentes en las muestras.
- Estudiar la relación existente entre las diferentes características espectrales encontradas en el material no extraíble de los hollejos y los niveles de extractabilidad de fenoles totales, flavanoles y antocianos.

### 7.3 Parte experimental

Este estudio se ha desarrollado utilizando la misma selección de muestras que se usó en el Capítulo 5. De forma breve, se recolectaron 200 uvas de las variedades Syrah y Tempranillo en el momento de la vendimia, se adquirieron los espectros medios de cada muestra mediante análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano y se aplicó un análisis de componentes principales (PCA) a la matriz formada por estos 200 espectros. Teniendo en cuenta la distancia de Mahalanobis a muestra vecina ( $NH$ ), se crearon 34 grupos, agrupando entre sí las muestras con distancias  $NH$  menores a 0.6 y se seleccionó aleatoriamente una muestra de cada uno de estos grupos, obteniéndose un set de 34 muestras espectralmente representativo del conjunto de muestras recolectado.

Cada una de las muestras seleccionadas fue sometida a una extracción en vino sintético durante un periodo de tres días, tras el cual se retiraron y se congelaron los sobrenadantes. El residuo sólido resultante fue liofilizado y sometido a una extracción exhaustiva en una disolución de metanol ácido (0.1% de HCl 12M). De nuevo, los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C y el material no extraíble resultante se liofilizó y almacenó en desecador hasta la realización de las medidas espectrales. Para cada uno de los extractos obtenidos, ya fueran en vino sintético o en metanol, se determinaron los fenoles totales, los flavanoles y los antocianos extraídos. Los fenoles totales se determinaron siguiendo el método espectrofotométrico de Folin–Ciocalteu (Singleton, *et al.*, 1965) y los flavanoles mediante el método descrito por Vivas, *et al.* (1994). Para la determinación de los antocianos fue necesario evaporar previamente una alícuota del sobrenadante en fase metanólica y reconstituirla posteriormente con agua desionizada. La determinación de antocianos se realizó siguiendo una modificación del método cromatográfico descrito por García-Marino, *et al.* (2010). A partir de los contenidos en fenoles totales, flavanoles y antocianos de ambos sobrenadantes pudo calcularse la extractabilidad de estos compuestos para todas las muestras como la relación porcentual entre lo extraído en vino sintético y el total extraído como suma de ambos procesos.

Seguidamente se realizó un agrupamiento de las muestras mediante el algoritmo de las K-medias a partir de la extractabilidad de fenoles totales, flavanoles y antocianos en 3 grupos que englobaban, respectivamente, las muestras con bajos, medios y altos niveles de extractabilidad para las tres variables tenidas en cuenta. En lo que sigue, las muestras permanecieron divididas en estas tres categorías.

El material no extraíble obtenido tras las extracciones de los hollejos se analizó mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier utilizando un accesorio de reflexión total atenuada (ATR-FTIR). Se realizaron 6 medidas por muestra en la región del infrarrojo comprendida entre 600 y 4000  $\text{cm}^{-1}$  (17000 y 2500 nm), adquiriendo 3 medidas en la superficie externa y otras 3 en la interna de cada muestra. Todos los espectros fueron pretratados mediante una corrección de los efectos multiplicativos de la dispersión (MSC). Posteriormente, se calculó el espectro medio para cada una de las superficies de cada muestra como el promedio de los 3 espectros adquiridos y se construyó la matriz espectral conteniendo los datos de infrarrojo.

Se aplicó un PCA a esta matriz espectral el cual permitió identificar 3 *outliers* espectrales, tres espectros pertenecientes a superficies externas de las muestras que tenían una distancia de Mahalanobis ( $H$ ) a la media espectral del conjunto de muestras mayor de 3 unidades. Estas muestras fueron suprimidas de la matriz espectral y no se tuvieron en cuenta para el tratamiento de los datos de infrarrojo. El PCA permitió explicar el 99% de la variabilidad espectral del set de datos utilizando únicamente 6 componentes principales. Entre estos componentes principales, el primero, que explicaba un 93.82% de la variabilidad espectral, permitía separar completamente las muestras espectrales de ambas superficies del hollejo entre sí. Los espectros pertenecientes a la superficie interior de las muestras generaron puntuaciones negativas en este componente principal, mientras que los pertenecientes a la superficie exterior de las muestras generaban puntuaciones positivas. Por tanto, el 93.82% de la variabilidad espectral de las muestras es atribuible principalmente a las diferentes superficies medidas, confirmándose así lo diferentes que son entre sí la capa externa e interna del hollejo, algo apreciable cuando se observan los espectros a simple vista.

Además, se comprobó que el peso (*loading*) del primer componente principal mostraba características remarcables en regiones espectrales donde típicamente aparecen las absorciones debidas a vibraciones fundamentales de enlaces presentes en tejidos biológicos. Concretamente, estas características aparecen en zonas donde, según la bibliografía, aparecen las absorciones debidas a vibraciones fundamentales de enlaces presentes en pectinas, monosacáridos, polisacáridos, lípidos o ceras, siendo todos ellos componentes del hollejo de uva (Fasoli, Dell'Anna, Dal Santo, Balestrini, Sanson, Pezzotti, *et al.*, 2016; Heredia-Guerrero, *et al.*, 2014). En este peso están incluidas las características espectrales de las superficies externa e interna de las muestras. De hecho, se comprobó que el peso del primer componente principal representa la

diferencia entre ambas superficies, siendo muy similar al vector que se obtiene mediante la diferencia entre las medias espectrales de ambas superficies (peso  $\approx$  media superficies externas – media superficies internas).

Por tanto, los máximos y mínimos que aparecen en el peso del primer componente principal son responsables de las diferencias existentes entre la superficie externa del hollejo, cutícula, y la superficie interna, hipodermis. El estudio pormenorizado de asignación de estos valores extremos presentes en el peso indicó que la proporción de polisacáridos es mayor en la superficie interna del hollejo, que el material alifático (cutina, cutano y ceras), como era de esperar, solo está presente en la superficie externa del hollejo y que el grado de esterificación de las pectinas es aparentemente mayor en la superficie externa del hollejo. En definitiva, la mayor presencia de polisacáridos y la menor esterificación de las pectinas que presenta la hipodermis puede hacer que la extractabilidad de compuestos fenólicos sea mayor en esta capa que en la capa externa recubierta de materiales hidrófobos.

En el PCA no se encontraron tendencias entre las muestras de distintas variedades o con distintos niveles de extractabilidad. Para determinar si algunas de las características que presentan los espectros tenían relación con el nivel de extractabilidad de compuestos fenólicos de las distintas muestras se realizó un análisis de la varianza (ANOVA). Para la realización de este análisis se utilizaron como variables dependientes las alturas de los diferentes picos que aparecen en los espectros, es decir, la intensidad de cada uno de los máximos correspondientes a absorciones debidas a vibraciones fundamentales de los enlaces presentes en las muestras. Se tuvieron en cuenta, respectivamente, 10 y 8 picos para los espectros de las superficies externas e internas del material no extraíble de hollejo de uva. No se encontraron diferencias significativas para ninguno de los picos pertenecientes a los espectros de la superficie externa del hollejo. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las muestras con baja extractabilidad y el resto para 3 picos pertenecientes a la cara interna de las muestras. Estos picos están relacionados con la presencia de polisacáridos y con el grado de esterificación de las pectinas (Fasoli, *et al.*, 2016; Heredia-Guerrero, *et al.*, 2014). Por lo que estos resultados reafirman que la cantidad de polisacáridos y el grado de esterificación de las pectinas influyen significativamente en la extractabilidad de compuestos fenólicos en hollejo de uva. No obstante, esta evidencia solo ha podido encontrarse en la superficie interna del hollejo, probablemente debido a las características de la cara externa, la cutícula, con ausencia de compuestos fenólicos.

Para confirmar y consolidar los resultados obtenidos mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, se adquirieron los espectros Raman de algunas de las muestras de material no extraíble de hollejo de uva. Para realizar estas medidas se seleccionaron muestras de diferentes variedades y con diferentes niveles de extractabilidad de compuestos fenólicos. Los espectros Raman se adquirieron excitando las muestras con un láser a 785 nm y recogiendo el

espectro obtenido desde 400 a 3500  $\text{cm}^{-1}$ . Para reducir los fenómenos de fluorescencia, las medidas fueron adquiridas bajo inmersión en agua. Se adquirieron tres espectros en cada superficie de las muestras que, seguidamente, se sometieron a una eliminación de la línea base, pudiéndose detectar 6 máximos o picos pertenecientes a dispersiones Raman.

Se midieron las alturas de estos picos y se usaron como variables para realizar un PCA. De nuevo, las diferencias espectrales entre ambas superficies del hollejo de uva se pusieron de manifiesto mediante este análisis, aunque de forma menos acusada que en el caso de los espectros en el infrarrojo. En este caso, fueron los dos primeros componentes principales los que contenían la variabilidad espectral en la que se engloban las diferencias entre ambas superficies. Además se aplicó un análisis ANOVA para comprobar si había diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los distintos picos que explicaran los distintos niveles de extractabilidad de las muestras. De nuevo se encontraron diferencias significativas para los espectros pertenecientes a la superficie interna del material no extraíble del hollejo para 3 de los picos analizados, los cuales son debidos a dispersiones Raman de enlaces presentes en celulosa y otros polisacáridos así como en anillos aromáticos de compuestos fenólicos. Con lo que se confirma la influencia en la extractabilidad de compuestos fenólicos de la presencia de polisacáridos en la muestra, principalmente en la superficie interna del hollejo.

## 7.4 Conclusiones

- La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier ha probado ser una técnica efectiva y fiable para relacionar las características espectrales más importantes con el nivel de extractabilidad de fenoles totales, flavanoles y antocianos en hollejo de uva.
- La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier permite identificar las diferencias estructurales existentes entre las superficies externas e internas del hollejo de uva.
- El análisis de los datos obtenidos mediante espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier permite confirmar que la extractabilidad de compuestos fenólicos está influenciada por la concentración de polisacáridos así como por el grado de esterificación de las pectinas.
- La espectroscopía Raman confirma estos resultados, ya que se han encontrado diferencias significativas entre los distintos niveles de extractabilidad de compuestos fenólicos relacionados con la concentración de polisacáridos.
- Se han encontrado grandes diferencias espectrales entre ambas superficies del hollejo de uva en ambas técnicas.

## **8 CAPÍTULO 8: INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE SEMILLA DE UVA BLANCA EN LA EXTRACCIÓN DE ANTOCIANOS EN HOLLEJO DE UVA PREVIAMENTE CARACTERIZADOS MEDIANTE ANÁLISIS DE IMAGEN HIPERESPECTRAL.**

Nogales Bueno, Julio; Baca Bocanegra, Berta; Jara Palacios, María José; Hernández Hierro, José Miguel; Heredia Mira, Francisco José: *Evaluation of the influence of white grape seed extracts as copigment sources on the anthocyanin extraction from grape skins previously classified by near infrared hyperspectral tools*. En: Food Chemistry 2017. Pag. 1685-1690, ISSN 0308-8146.

### **8.1 Antecedentes**

El color del vino depende fundamentalmente de la concentración de antocianos disueltos en él. Durante el proceso de vinificación, parte de los antocianos presentes en el hollejo de uva pasan al vino confiriéndole su característico color. Sin embargo, pueden producirse modificaciones en el color del vino debidas a distintas variables como puede ser la acidez del vino, la concentración de SO<sub>2</sub> o la concentración de copigmentos presente (Ribéreau-Gayon, Glories, Maujean y Dubourdieu, 2006). Entre estas variables tanto la acidez como la concentración de SO<sub>2</sub> suelen estar fijadas por consideraciones de origen tecnológico o sensorial, sin embargo, el contenido en copigmentos puede ser modificado con el objetivo de modular el color del vino.

Actualmente, el proceso de copigmentación se encuentra bien descrito. Consiste en la formación, en disolución, de asociaciones moleculares o complejos entre pigmentos y otros compuestos orgánicos no coloreados. Como resultado, se producen incrementos de la absorción o desplazamientos de la longitud de onda a la que se produce la máxima absorción de la disolución (Boulton, 2001). Se han realizado numerosos estudios que demuestran que la adición de copigmentos al vino produce mejoras en sus características cromáticas y en la estabilización de este color (González-Manzano, Dueñas, Rivas-Gonzalo, Escribano-Bailón y Santos-Buelga, 2009; Gordillo, Rodríguez-Pulido, González-Miret, Quijada-Morín, Rivas-Gonzalo, García-Estévez, *et al.*, 2015). Entre estos copigmentos, los flavanoles presentan un buen potencial para la copigmentación (Gordillo, Rodríguez-Pulido, Escudero-Gilete, González-Miret y Heredia, 2012). Por tanto, algunos subproductos de vinificación, ricos en compuestos flavanólicos, como

puede ser las semillas de uva blanca, son potenciales fuentes de aporte de copigmentos para usar en vinificación.

Sin embargo, la adición de copigmentos con el objetivo de mejorar o estabilizar el color del vino puede tener también una serie de inconvenientes. El copigmento puede aportar excesivo amargor o astringencia al vino. Además, es posible que la matriz en la que se añade el copigmento absorba pigmentos antociánicos o incluso que la presencia del copigmento en la disolución pueda perjudicar el equilibrio de extracción de antocianos durante la vinificación, consiguiéndose así un efecto contrario al deseado. Por esto, es de gran interés estudiar el efecto que tiene la adición de copigmentos sobre la extracción de los compuestos antociánicos del hollejo de uva.

## **8.2 Objetivos**

El principal objetivo de este estudio ha sido conocer el efecto que tiene la adición de extractos de semilla de uva como fuente de copigmentos en la extracción de compuestos antociánicos en hollejo de uva tinta. Concretamente, los objetivos planteados fueron:

- Confirmar el potencial del análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano para la estimación del contenido extraíble de compuestos antociánicos en hollejo de uva.
- Identificar muestras de uva con bajo contenido extraíble de compuestos antociánicos, susceptibles de la aplicación de medidas para la mejora del color de un hipotético vino producido a partir de ellas.
- Obtener y caracterizar extractos de semilla de uva blanca, subproductos de vinificación, para su uso como fuentes de copigmentos.
- Evaluar la influencia de la adición de extractos de semilla de uva blanca como fuente de copigmentos en la extracción de antocianos en hollejo de uva con diferente contenido extraíble predicho.

## **8.3 Parte experimental**

Las muestras utilizadas en el presente estudio forman parte de las descritas en el Capítulo 5 de la presente memoria. Se recolectaron 200 muestras de las variedades tintas Syrah y Tempranillo, de las cuales, tras una selección mediante análisis de imagen hiperespectral, solo se utilizaron 34 muestras para realizar la calibración de los modelos y 21 para la posterior validación.

Las muestras pertenecen al mismo espacio espectral que las que fueron utilizadas para el modelado, con lo que es válido aplicar el modelo a estas muestras para predecir el contenido extraíble de antocianos. Una vez conocido el contenido extraíble predicho de antocianos, las muestras de cada variedad fueron ordenadas de menor a mayor contenido extraíble predicho de antocianos y se separaron en tres grupos, bajo, medio o alto contenido extraíble predicho. Finalmente se seleccionaron aleatoriamente 2 muestras de cada grupo, obteniéndose un total de 12 muestras (2 variedades  $\times$  3 grupos  $\times$  2 muestras).

Seguidamente, cada uno de los hollejos seleccionados se dividió en tres partes aproximadamente iguales, y se maceraron de forma individual durante un periodo de 3 días en vino sintético, manteniendo constante la relación de volumen de disolvente respecto al peso de muestra. Para estudiar la influencia que pudieran tener los copigmentos provenientes de semilla de uva blanca en la extracción de antocianos en hollejo de uva tinta, cada una de las extracciones realizadas con cada parte de hollejo se llevó a cabo en presencia de una concentración distinta de copigmentos provenientes de semilla de uva blanca. Se usó la concentración de fenoles totales para controlar la concentración de copigmentos en el vino sintético elaborado, utilizando concentraciones de 0, 0.1 y 0.2 g/L, expresados como equivalentes de ácido gálico, para realizar las respectivas extracciones de cada hollejo.

Para conseguir estas concentraciones de copigmento, de forma previa se maceraron semillas de uva blanca en el vino sintético durante tres días. Estas semillas habían sido previamente caracterizadas por M. José Jara-Palacios, Gordillo, González-Miret, Hernanz, Escudero-Gilete y Heredia (2014), con lo que es conocida la cantidad y tipología de los copigmentos utilizados, siendo la mayoría de ellos flavanoles.

Cada uno de los sobrenadantes obtenidos de las extracciones realizadas a los hollejos fue analizado mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) para determinar la cantidad de antocianos extraída, siguiendo una modificación del método descrito por García-Marino, *et al.* (2010). Se identificaron hasta 15 antocianos que, tanto de forma individual como por familias, fueron utilizados para la realización de dos objetivos: comprobar, mediante análisis de imagen hiperespectral, la bondad del modelo utilizado para la predicción del contenido extraíble de antocianos totales en las muestras y comprobar si la presencia de copigmentos interfiere en la extracción de antocianos en estas muestras.

Para comprobar la bondad del modelo de calibración desarrollado en el Capítulo 5 para predecir el contenido extraíble de antocianos en hollejo de uva se utilizaron únicamente las submuestras maceradas en vino sintético con ausencia de copigmentos. De esta forma se reprodujeron, en la medida de lo posible, las condiciones utilizadas para el modelado. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) utilizando los contenidos extraíbles obtenidos mediante

HPLC como variables dependientes y el nivel de contenido extraíble predicho como factor (bajo, medio o alto). Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para casi la totalidad de variables dependientes, aunque tras la realización del test *post hoc* de Tukey, se comprobó que en la mayoría de los casos las diferencias solo se limitaban a dos grupos en lugar de los tres propuestos. A pesar de esto, el análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano puede ser una técnica válida para la identificación de muestras de uva con bajo contenido extraíble de antocianos, susceptibles de una actuación para la mejora del color de los vinos producidos a partir de ellas.

Para estudiar el efecto de la presencia de copigmentos provenientes de semilla de uva blanca en la extracción de antocianos en hollejo de uva se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando, ahora sí, todas las submuestras. Se utilizaron como variables dependientes los contenidos extraíbles de antocianos obtenidos mediante HPLC (antocianos individuales, acilados, no acilados y totales) y se buscaron posibles tendencias entre los distintos factores tenidos en cuenta. Se encontró que las muestras de distintas variedades estaban separadas a lo largo del segundo componente principal. Además, también apareció una separación entre los niveles de contenido extraíble predicho de antocianos (bajo, medio o alto). Sin embargo, no pudo encontrarse ninguna tendencia en cuanto a la concentración de copigmentos de la disolución usada para la extracción de antocianos en las distintas muestras.

Para ratificar este resultado se realizó un nuevo ANOVA. Se utilizaron como variables dependientes, los contenidos extraíbles de antocianos obtenidos mediante HPLC y como factor la concentración de copigmentos presentes en el medio en el cual se realizó la extracción: 0, 0.1 o 0.2 mg/L expresados como equivalentes de ácido gálico. No se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para ninguna de las variables dependientes estudiadas, lo que permite afirmar que la presencia de estos copigmentos no altera el proceso de extracción de antocianos en hollejo de uva. Por lo que estos copigmentos pueden ser añadidos en la vinificación con el objetivo de mejorar la calidad cromática de los vinos producidos, aumentando y estabilizando su color, sin temor a menoscabar de alguna forma la cantidad de antocianos extraída de los hollejos macerados.

#### 8.4 Conclusiones

- El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano es una técnica apta para la predicción del contenido extraíble de antocianos en hollejo de uva tinta, permitiendo, posteriormente, la identificación de muestras de uva con distinto contenido extraíble de antocianos.

- La adición de copigmentos provenientes de semillas de uva blanca no reduce la cantidad de antocianos extraídos en hollejo de uva durante la etapa de maceración.
- Los copigmentos provenientes de semilla de uva blanca podrían aumentar y estabilizar el color del vino sin perjudicar el equilibrio de extracción de antocianos.



## CONCLUSIONES GENERALES





---

## CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones más importantes a partir de los resultados obtenidos son las siguientes:

PRIMERA: El análisis de imagen hiperespectral puede considerarse una técnica válida para obtener las características espectrales de muestras de uva en la zona del infrarrojo cercano.

SEGUNDA: El análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano tiene un poder discriminatorio elevado para la clasificación de muestras de uva tinta según su variedad, comparable al de las técnicas usadas tradicionalmente con este fin, como el análisis cromatográfico de alta eficacia aplicado al análisis de antocianos.

TERCERA: Se han desarrollado modelos para una adecuada estimación de los principales parámetros que definen la madurez tecnológica de uva y la concentración de fenoles totales en hollejo de uva a lo largo de su maduración a partir de análisis de imagen hiperespectral en el infrarrojo cercano.

CUARTA: El análisis de vectores característicos es una técnica viable para la reducción de datos en la zona infrarroja del espectro que permite realizar reconstrucciones espectrales a partir de una pequeña parte de la información espectral original. Los resultados obtenidos indican que 12 vectores característicos son un número suficiente para lograr una correcta reconstrucción de espectros en el infrarrojo cercano y para desarrollar, a partir de estos espectros, modelos de calibración de utilidad.

QUINTA: Es posible predecir, de forma satisfactoria, el contenido en antocianos totales y en antocianos no acilados presentes en hollejo de uva a partir del espectro en la región del infrarrojo cercano del fruto. Se han identificado las zonas del espectro infrarrojo cercano que tienen una mayor influencia en la predicción de la concentración de antocianos en hollejo de uva.

---

SEXTA: El análisis de componentes principales permite reducir el número de muestras necesarias para la obtención de modelos de calibración manteniendo la heterogeneidad espectral existente en el set de muestras de partida. A partir de esta selección de muestras pueden desarrollarse métodos válidos para la estimación de los contenidos extraíbles de las principales familias de compuestos fenólicos en hollejo de uva tinta. Esta metodología permite clasificar muestras de acuerdo con su contenido extraíble de compuestos fenólicos, y de forma no destructiva, por lo que pueden ser utilizadas posteriormente para la realización de otros análisis.

SÉPTIMA: La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier y la espectroscopía Raman han probado ser técnicas efectivas y fiables para relacionar las características espectrales más importantes con el nivel de extractabilidad de fenoles totales y flavanoles en semilla, y de fenoles totales, flavanoles y antocianos en hollejo de uva.

OCTAVA: Se ha confirmado que la extractabilidad de compuestos fenólicos en las diferentes partes sólidas de la uva está estrechamente relacionada con la composición del material no extraíble, así como con el grado de esterificación de las pectinas.

NOVENA: Tanto la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier como la espectroscopía Raman permiten identificar las diferencias estructurales existentes entre las superficies externas e internas del hollejo de uva, encontrándose grandes diferencias espectrales entre ambas superficies.

DÉCIMA: Los copigmentos procedentes de semilla de uva blanca pueden aumentar y estabilizar el color del vino sin perjudicar el equilibrio de extracción de antocianos. Se ha probado que la adición de estos copigmentos no reduce la cantidad de antocianos extraídos a partir del hollejo de uva tinta durante la etapa de maceración.

---

## GENERAL CONCLUSIONS

The following main conclusions are drawn from the studies carried out:

FIRST: Hyperspectral imaging can be considered a reliable tool to obtain the spectral characteristics of grape samples in the near infrared region.

SECOND: Near infrared hyperspectral analysis shows similar results than traditional techniques such as chromatographic analysis in order to discriminate samples among grape varieties.

THIRD: The developed methods using hyperspectral imaging presents a good potential for the screening of total phenolic concentration in grape skin and sugar concentration, titratable acidity and pH in grape must.

FOURTH: The characteristic vector method allows reconstructing near infrared spectra from a few amount of spectral information. The results obtained indicate that 12 characteristic vectors are sufficient to reconstruct near infrared spectra and to develop from these spectra useful calibration models.

FIFTH: Total and nonacylated anthocyanin contents can be predicted in intact red grapes using near infrared hyperspectral imaging. A number of spectral zones have shown to have important contributions for the anthocyanin screening.

SIXTH: Calibration models can be obtained from a lower number of samples by the use of principal component analysis. This reduction can be achieved without loss of spectral heterogeneity of the original sample set. The application of this methodology allows developing fast and reasonably inexpensive screening of extractable content of anthocyanins, flavanols and total phenolic compounds in grape skins. Moreover, this methodology allows sorting berries according to their polyphenol extractable contents and then the same samples could be used in further studies for other destructive analyses or purposes.

SEVENTH: Fourier transform infrared and Raman spectroscopy have proven to be effective and reliable tools to relate the more important spectral features to phenolic extractability levels in grape seed and skin.

---

EIGHTH: Fourier transform infrared and Raman data analysis confirmed that grape seed and skin phenolic extractability is closely linked to the cell wall composition and to the degree of esterification of pectins.

NINTH: Fourier transform infrared and Raman spectroscopy allow finding large spectral differences between external and internal grape skin surfaces. These differences are probably due to the different grape skin layers and their different physical and chemical properties.

TENTH: Copigments coming from white grape seeds do not reduce the amount of anthocyanins extracted from grape skins during the maceration stage. Therefore, these copigments can improve or stabilize wine color without hampering the extraction equilibrium of anthocyanins compounds.

## REFERENCIAS





**REFERENCIAS**

Asselin, C., y Delteil, D. (2003). Vinificaciones: principales operaciones unitarias comunes. In *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*, (pp. 418-442). Madrid, España: AMV Ediciones y Mundi-Prensa.

Ayala, F., Echávarri, J. F., y Negueruela, A. I. (1997). A new simplified method for measuring the color of wines. I. Red and rose wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 357-364.

Baca-Bocanegra, B., Nogales-Bueno, J., Rodríguez-Pulido, F., González-Miret, M., Hernández-Hierro, J., y Heredia, F. (2016). Near infrared hyperspectral imaging: recent applications in the oenological and viticultural sectors. *NIR news*, 27(6), 14-18.

Baiano, A., Terracone, C., Peri, G., y Romaniello, R. (2012). Application of hyperspectral imaging for prediction of physico-chemical and sensory characteristics of table grapes. *Computers and Electronics in Agriculture*, 87, 142-151.

Barbin, D. F., ElMasry, G., Sun, D. W., y Allen, P. (2012). Predicting quality and sensory attributes of pork using near-infrared hyperspectral imaging. *Analytica Chimica Acta*, 719, 30-42.

Barbin, D. F., Elmasry, G., Sun, D. W., y Allen, P. (2013). Non-destructive determination of chemical composition in intact and minced pork using near-infrared hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 138(2-3), 1162-1171.

Barnes, R. J., Dhanoa, M. S., y Lister, S. (1989). Standard Normal Variate Transformation and De-trending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra. *Applied Spectroscopy*, 43(5), 772-777.

Bautista-Ortín, A. B., Jiménez-Pascual, E., Busse-Valverde, N., López-Roca, J. M., Ros-García, J. M., y Gómez-Plaza, E. (2013). Effect of Wine Maceration Enzymes on the Extraction of Grape Seed Proanthocyanidins. *Food and Bioprocess Technology*, 6(8), 2207-2212.

Bergqvist, J., Dokoozlian, N., y Ebisuda, N. (2001). Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(1), 1-7.

Bokobza, L. (1998). Near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 6(1), 3-17.

Boldrini, B., Kessler, W., Rebnera, K., y Kessler, R. W. (2012). Hyperspectral imaging: a review of best practice, performance and pitfalls for in-line and on-line applications. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 20(5), 483-508.

Boulton, R. (2001). The Copigmentation of Anthocyanins and Its Role in the Color of Red Wine: A Critical Review. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52(2), 67-87.

Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics : data analysis for the laboratory and chemical plant* Chichester, West Sussex, England: J. Wiley.

Byrne, H. J., Ostrowska, M. K., Nawaz, H., Dorney, J., Meade, D. A., Bonnier, F., y Lyng, M. F. (2014). Vibrational Spectroscopy: Disease Diagnostics and Beyond. In M. Baranska (Ed.), *Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine*, (pp. 355-399). Dordrecht: Springer Netherlands.

Byrne, H. J., Sockalingum, G. D., y Stone, N. (2011). Chapter 4 Raman Microscopy: Complement or Competitor? In *Biomedical Applications of Synchrotron Infrared Microspectroscopy: A Practical Approach*, (pp. 105-143). The Royal Society of Chemistry.

Cabanis, J. C., Cabanis, M. T., Cheynier, V., y Teissendré, P. L. (2003). Tablas de composición. In *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*, (pp. 218-231). Madrid, España: AMV Ediciones y Mundi-Prensa.

Canals, R., Llaudy, M. C., Valls, J., Canals, J. M., y Zamora, F. (2005). Influence of ethanol concentration on the extraction of color and phenolic compounds from the skin and seeds of tempranillo grapes at different stages of ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4019-4025.

Crozier, A., Clifford, M. N., y Ashihara, H. (2006). *Plant Secondary Metabolites. Occurrence, Structure and Role in the Human Diet* Garsington Road, Oxford, UK: Blackwell Publishing.

Chen, S., Zhang, F., Ning, J., Liu, X., Zhang, Z., y Yang, S. (2015). Predicting the anthocyanin content of wine grapes by NIR hyperspectral imaging. *Food Chemistry*, 172(0), 788-793.

Cheynier, V., Moutounet, M., y Sarni-Machado, P. (2003). Los compuestos fenólicos. In *Enología: fundamentos científicos y tecnológicos*, (pp. 114-136). Madrid, España: AMV Ediciones y Mundi-Prensa.

Christen, H. R., y Beltrán, J. (1977). *Fundamentos de la química general e inorgánica*: Reverté.

da Silva, C. E., Vandenabeele, P., Edwards, H. G. M., y Cappa de Oliveira, L. F. (2008). NIR-FT-Raman spectroscopic analytical characterization of the fruits, seeds, and phytotherapeutic oils from rosehips. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(7), 1489-1496.

Deane, J. M. (1992). Chapter 5 Data Reduction Using Principal Components Analysis. In G. B. Richard (Ed.), vol. Volume 9 (pp. 125-177). Elsevier.

*Denominación de Origen Calificada Rioja*. 2016). <http://es.riojawine.com/en/5-learn-about-rioja.html>. Último acceso: 2016/10/22

*Denominación de Origen Condado de Huelva*. 2016). <http://www.condadodehuelva.es/>. Último acceso: 2016/10/22

- Du, C.-J., y Sun, D.-W. (2008). Quality Evaluation of Pizzas. In *Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation*, (pp. 427-446). Amsterdam: Academic Press.
- Fasoli, M., Dell'Anna, R., Dal Santo, S., Balestrini, R., Sanson, A., Pezzotti, M., Monti, F., y Zenoni, S. (2016). Pectins, Hemicelluloses and Celluloses Show Specific Dynamics in the Internal and External Surfaces of Grape Berry Skin During Ripening. *Plant & Cell Physiology*, 57(6), 1332-1349.
- Femenia, A., Sánchez, E. S., Simal, S., y Rosselló, C. (1998). Effects of Drying Pretreatments on the Cell Wall Composition of Grape Tissues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(1), 271-276.
- Fernandes, A. M., Oliveira, P., Moura, J. P., Oliveira, A. A., Falco, V., Correia, M. J., y Melo-Pinto, P. (2011). Determination of anthocyanin concentration in whole grape skins using hyperspectral imaging and adaptive boosting neural networks. *Journal of Food Engineering*, 105(2), 216-226.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2011). Determination of phenolic compounds of grape skins during ripening by NIR spectroscopy. *Lwt-Food Science and Technology*, 44(4), 847-853.
- Ferrer-Gallego, R., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2013). A comparative study to distinguish the vineyard of origin by NIRS using entire grapes, skins and seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 967-972.
- Foca, G., Masino, F., Antonelli, A., y Ulrici, A. (2011). Prediction of compositional and sensory characteristics using RGB digital images and multivariate calibration techniques. *Analytica Chimica Acta*, 706(2), 238-245.
- Foo, L. Y. (1981). Proanthocyanidins: Gross chemical structures by infrared spectra. *Phytochemistry*, 20(6), 1397-1402.
- Fourmand, D., Vicens, A., Sidhoum, L., Souquet, J. M., Moutounet, M., y Cheynier, V. (2006). Accumulation and extractability of grape skin tannins and anthocyanins at different advanced physiological stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7331-7338.
- García-Allende, P. B., Conde, O. M., Mirapeix, J., Cobo, A., y Lopez-Higuera, J. M. (2010). Hyperspectral imaging for diagnosis and quality control in agri-food and industrial sectors. *Optical Sensing and Detection*, 7726.
- García-Marino, M., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 134-142.
- García-Parrilla, M. C., Ayala, F., Echávarri, J. F., Troncoso, A. M., Negueruela, A. I., y Heredia, F. J. (1998). Measurement of Wine Vinegars' Color: Application of the Characteristic Vector Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4238-4241.

- Geladi, P., MacDougall, D., y Martens, H. (1985). Linearization and Scatter-Correction for Near-Infrared Reflectance Spectra of Meat. *Applied Spectroscopy*, 39(3), 491-500.
- Gierlinger, N., Keplinger, T., y Harrington, M. (2012). Imaging of plant cell walls by confocal Raman microscopy. *Nat. Protocols*, 7(9), 1694-1708.
- Goehner, R. P. (1978). Background subtract subroutine for spectral data. *Analytical Chemistry*, 50(8), 1223-1225.
- Golan, A., y Shalit, H. (1993). Wine quality differentials in hedonic grape pricing. *Journal of Agricultural Economics*, 44(2), 311-321.
- González-Manzano, S., Dueñas, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Escribano-Bailón, M. T., y Santos-Buelga, C. (2009). Studies on the copigmentation between anthocyanins and flavan-3-ols and their influence in the colour expression of red wine. *Food Chemistry*, 114(2), 649-656.
- González-Manzano, S., Rivas-Gonzalo, J. C., y Santos-Buelga, C. (2004). Extraction of flavan-3-ols from grape seed and skin into wine using simulated maceration. *Analytica Chimica Acta*, 513(1), 283-289.
- González-Miret, M. L., Ayala, F., Terrab, A., Echávarri, J. F., Negueruela, A. I., y Heredia, F. J. (2007). Simplified method for calculating colour of honey by application of the characteristic vector method. *Food Research International*, 40(8), 1080-1086.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., Escudero-Gilete, M. L., González-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2012). Comprehensive Colorimetric Study of Anthocyanic Copigmentation in Model Solutions. Effects of pH and Molar Ratio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(11), 2896-2905.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., González-Miret, M. L., Quijada-Morín, N., Rivas-Gonzalo, J. C., García-Estévez, I., Heredia, F. J., y Escribano-Bailón, M. T. (2015). Application of Differential Colorimetry To Evaluate Anthocyanin-Flavonol-Flavanol Ternary Copigmentation Interactions in Model Solutions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7645-7653.
- Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F. J., Mateus, N., Escudero-Gilete, M. L., González-Miret, M. L., Heredia, F. J., y de Freitas, V. (2012). Application of LC-MS and tristimulus colorimetry to assess the ageing aptitude of Syrah wine in the Condado de Huelva D.O. (Spain), a typical warm climate region. *Analytica Chimica Acta*, 732(0), 162-171.
- Gou, P., Santos-Garcés, E., Høy, M., Wold, J. P., Liland, K. H., y Fulladosa, E. (2013). Feasibility of NIR interactance hyperspectral imaging for on-line measurement of crude composition in vacuum packed dry-cured ham slices. *Meat Science*, 95(2), 250-255.
- Gowen, A. A., O'Donnell, C. P., Cullen, P. J., Downey, G., y Frias, J. M. (2007). Hyperspectral imaging - an emerging process analytical tool for food quality and safety control. *Trends in Food Science & Technology*, 18(12), 590-598.

Guo, W., Zhao, F., y Dong, J. (2016). Nondestructive Measurement of Soluble Solids Content of Kiwifruits Using Near-Infrared Hyperspectral Imaging. *Food Analytical Methods*, 9(1), 38-47.

Heredia-Guerrero, J. A., Benítez, J. J., Domínguez, E., Bayer, I., Cingolani, R., Athanassiou, A., y Heredia, A. (2014). Infrared and Raman spectroscopic features of plant cuticles: a review. *Frontiers in Plant Science*, 5.

Heredia, F. J., González-Miret, M. L., Álvarez, C., y Ramírez, A. (2006). DigiFood. In.

Hermosin-Gutierrez, I., Castillo-Munoz, N., Gomez-Alonso, S., y Garcia-Romero, E. (2010). Flavonol profiles for grape and wine authentication. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, 239, 113-129.

Hernández-Hierro, J. M., Nogales-Bueno, J., Rodríguez-Pulido, F. J., y Heredia, F. J. (2013). Feasibility study on the use of near-infrared hyperspectral imaging for the screening of anthocyanins in intact grapes during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(41), 9804-9809.

Hernández-Hierro, J. M., Quijada-Morín, N., Martínez-Lapuente, L., Guadalupe, Z., Ayestarán, B., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2014). Relationship between skin cell wall composition and anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo at different grape ripeness degree. *Food Chemistry*, 146(0), 41-47.

Hernández-Hierro, J. M., Quijada-Morín, N., Rivas-Gonzalo, J. C., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2012). Influence of the physiological stage and the content of soluble solids on the anthocyanin extractability of *Vitis vinifera* L. cv. Tempranillo grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732(0), 26-32.

Hernanz, D., Gallo, V., Recamales, Á. F., Meléndez-Martínez, A. J., González-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2009). Effect of storage on the phenolic content, volatile composition and colour of white wines from the varieties Zalema and Colombard. *Food Chemistry*, 113(2), 530-537.

Hidalgo Togores, J. (2010). *Tratado de enología: tomo I (2a. ed.)* España: Mundi-Prensa.

Hosu, A., Cristea, V. M., y Cimpoi, C. (2014). Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. *Food Chemistry*, 150, 113-118.

Hüsksdsson, A. (1996). *Prediction Methods in Science and Technology* Copenhagen: Thor Publishing.

IBM® (2015). SPSS® Statistics. Versión 23.0.

ICEX(2014). *Vinos de España*. [www.winesfromspain.com/](http://www.winesfromspain.com/). Último acceso: 2016/10/22

Infrasoft International LLC (2000). WinISI II Versión 1.50.

Jackson, R. S. (2000). Chemical Constituents of Grapes and Wine. In R. S. Jackson (Ed.), *Wine science: principles, practice and perception*, (pp. 232-280). San Diego: Academic Press.

Jara-Palacios, M. J., Gordillo, B., González-Miret, M. L., Hernanz, D., Escudero-Gilete, M. L., y Heredia, F. J. (2014). Comparative Study of the Enological Potential of Different Winemaking Byproducts: Implications in the Antioxidant Activity and Color Expression of Red Wine Anthocyanins in a Model Solution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(29), 6975-6983.

Jara-Palacios, M. J., Rodríguez-Pulido, F. J., Hernanz-Vila, M. D., Escudero-Gilete, M. L., y Heredia, F. J. (2016). Determination of phenolic substances of seeds, skins and stems from white grape marc by near-infrared hyperspectral imaging. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22(1), 11-15.

Ji-Yong, S., Xiao-Bo, Z., Jie-Wen, Z., Kai-Liang, W., Zheng-Wei, C., Xiao-Wei, H., De-Tao, Z., y Holmes, M. (2012). Nondestructive diagnostics of nitrogen deficiency by cucumber leaf chlorophyll distribution map based on near infrared hyperspectral imaging. *Scientia Horticulturae*, 138, 190-197.

Kamruzzaman, M., Barbin, D., Elmasry, G., Sun, D. W., y Allen, P. (2012). Potential of hyperspectral imaging and pattern recognition for categorization and authentication of red meat. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 16, 316-325.

Kamruzzaman, M., ElMasry, G., Sun, D. M., y Allen, P. (2012). Prediction of some quality attributes of lamb meat using near-infrared hyperspectral imaging and multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*, 714, 57-67.

Kim, I., Kim, M. S., Chen, Y. R., y Kong, S. G. (2004). Detection of skin tumors on chicken carcasses using hyperspectral fluorescence imaging. *Transactions of the ASAE*, 47(5), 1785-1792.

Kyomugasho, C., Christiaens, S., Shpigelman, A., Van Loey, A. M., y Hendrickx, M. E. (2015). FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. *Food Chemistry*, 176, 82-90.

Lebart, L., Morineau, A., y Fénelon, J. P. (1985). *Tratamiento estadístico de datos: Métodos y programas* Barcelona, España: Marcombo S.A.

Lieber, C. A., y Mahadevan-Jansen, A. (2003). Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. *Applied Spectroscopy*, 57(11), 1363-1367.

Liu, D., Sun, D. W., y Zeng, X. A. (2014). Recent Advances in Wavelength Selection Techniques for Hyperspectral Image Processing in the Food Industry. *Food Bioprocess Technol*, 7(2), 307-323.

Lopes-da-Silva, F., de Pascual-Teresa, S., Rivas-Gonzalo, J., y Santos-Buelga, C. (2002). Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *European Food Research and Technology*, 214(3), 248-253.

Lu, R. (2003). Detection of bruises on apples using near-infrared hyperspectral imaging. *46(2)*, 523.

Luo, M. R., Cui, G. H., y Li, C. (2001). British Patent entitled Apparatus and method for measuring colour (DigiEye System), Derby University Enterprises Limited. In.

Lupoi, J. S., Gjersing, E., y Davis, M. F. (2015). Evaluating Lignocellulosic Biomass, Its Derivatives, and Downstream Products with Raman Spectroscopy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *3(50)*.

Lupoi, J. S., Singh, S., Parthasarathi, R., Simmons, B. A., y Henry, R. J. (2015). Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *49*, 871-906.

MacQueen, J. (1967). Some methods for classification and analysis of multivariate observations. In *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematical Statistics and Probability, Volume 1: Statistics*, (pp. 281-297). Berkeley, Calif.: University of California Press.

Martín Bueno, J., Ramos-Escudero, F., Sáez-Plaza, P., Muñoz, A. M., Navas, M. J., y García Asuero, A. (2012). Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, *42(2)*, 102-125.

Mazet, V., Carteret, C., Brie, D., Idier, J., y Humbert, B. (2005). Background removal from spectra by designing and minimising a non-quadratic cost function. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *76(2)*, 121-133.

Meléndez-Martínez, A. J., Ayala, F., Echávarri, J. F., Negueruela, A. I., Escudero-Gilete, M. L., González-Miret, M. L., Vicario, I. M., y Heredia, F. J. (2011). A novel and enhanced approach for the assessment of the total carotenoid content of foods based on multipoint spectroscopic measurements. *Food Chemistry*, *126(4)*, 1862-1869.

Meléndez, E., Ortiz, M. C., Sarabia, L. A., Íñiguez, M., y Puras, P. (2013). Modelling phenolic and technological maturities of grapes by means of the multivariate relation between organoleptic and physicochemical properties. *Analytica Chimica Acta*, *761*, 53-61.

Nicolai, B. M., Lötze, E., Peirs, A., Scheerlinck, N., y Theron, K. I. (2006). Non-destructive measurement of bitter pit in apple fruit using NIR hyperspectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*, *40(1)*, 1-6.

Nogales-Bueno, J., Hernández-Hierro, J. M., Rodríguez-Pulido, F. J., y Heredia, F. J. (2014). Determination of technological maturity of grapes and total phenolic compounds of grape skins in red and white cultivars during ripening by near infrared hyperspectral image: A preliminary approach. *Food Chemistry*, *152*, 586-591.

Nogales-Bueno, J., Rodríguez-Pulido, F. J., Baca-Bocanegra, B., González-Miret, M. L., Heredia, F. J., y Hernández-Hierro, J. M. (2016). Hyperspectral Imaging - A Novel Green Chemistry Technology for the Oenological and Viticultural Sectors. In, (pp. 45-56 ).

- Norman, G. R., Streiner, D. L., y Tarrés, J. (1996). Bioestadística. In: Mosby/Doyma Libros.
- OIV. (1990). *Recueil de methods internationals d'Analyse des vins* Paris: OIV.
- OIV. (2012). Vine and Wine Outlook. Estadísticas vitivinícolas mundiales 2012. In, Paris: OIV.
- Ortega-Regules, A., Romero-Cascales, I., Ros-García, J. M., López-Roca, J. M., y Gómez-Plaza, E. (2006). A first approach towards the relationship between grape skin cell-wall composition and anthocyanin extractability. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2), 26-32.
- Ortega-Regules, A., Ros-García, J. M., Bautista-Ortín, A. B., López-Roca, J. M., y Gómez-Plaza, E. (2008). Changes in skin cell wall composition during the maturation of four premium wine grape varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(3), 420-428.
- Peña, M. D., y Muntaner, A. R. (1989). *Química física*: Alhambra.
- Pinelo, M., Arnous, A., y Meyer, A. S. (2006). Upgrading of grape skins: Significance of plant cell-wall structural components and extraction techniques for phenol release. *Trends in Food Science & Technology*, 17(11), 579-590.
- Qin, J., Chao, K., Kim, M. S., Lu, R., y Burks, T. F. (2013). Hyperspectral and multispectral imaging for evaluating food safety and quality. *Journal of Food Engineering*, 118(2), 157-171.
- Quijada-Morín, N., Hernández-Hierro, J. M., Rivas-Gonzalo, J. C., y Escribano-Bailón, M. T. (2015). Extractability of Low Molecular Mass Flavanols and Flavonols from Red Grape Skins. Relationship to Cell Wall Composition at Different Ripeness Stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7654-7662.
- Raman, C. V., y Krishnan, K. S. (1928). A New Type of Secondary Radiation. *Nature*, 121, 501-502.
- Ramis-Ramos, G., y García-Álvarez-Coque, M. C. (1999). *Quimiometría*: Síntesis.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B., Lonvaud, A., Glories, Y., Maujean, A., y Branco, J. M. (2006). *Handbook of Enology, The Microbiology of Wine and Vinifications*: J. Wiley & Sons.
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., y Dubourdieu, D. (2006). *Handbook of Enology, The Chemistry of Wine: Stabilization and Treatments*: Wiley.
- Rice-Evans, C. A., Miller, J., y Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2(4), 152-159.
- Ristic, R., y Iland, P. G. (2005). Relationships between seed and berry development of Vitis Vinifera L. cv Shiraz: Developmental changes in seed morphology and phenolic composition. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(1), 43-58.

Rodríguez-Pulido, F. J. (2013). *Aplicación de técnicas de imagen para la evaluación de la madurez fenólica de semillas de uva*. Universidad de Sevilla.

Rodríguez-Pulido, F. J., Barbin, D. F., Sun, D. W., Gordillo, B., González-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2013). Grape seed characterization by NIR hyperspectral imaging. *Postharvest Biology and Technology*, 76, 74-82.

Rodríguez-Pulido, F. J., Gómez-Robledo, L., Melgosa, M., Gordillo, B., González-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2012). Ripeness estimation of grape berries and seeds by image analysis. *Computers and Electronics in Agriculture*, 82, 128-133.

Rodríguez-Pulido, F. J., Hernández-Hierro, J. M., Nogales-Bueno, J., Gordillo, B., González-Miret, M. L., y Heredia, F. J. (2014). A novel method for evaluating flavanols in grape seeds by near infrared hyperspectral imaging. *Talanta*, 122(0), 145-150.

Rogalski, A. (2003). Infrared detectors: status and trends. *Progress in Quantum Electronics*, 27(2-3), 59-210.

Rogalski, A. (2012). History of infrared detectors. *Opto-Electronics Review*, 20(3), 279-308.

Shenk, J. S., y Westerhaus, M. O. (1995). *Routine Operation, Calibration, Development and Network System Management Manual*, NIRSystems MD, USA: Silver Spring.

Siesler, H. W., Ozaky, Y., Kawata, S., y Heise, H. M. (2002). *Near infrared spectroscopy: principles, instruments, applications* Weinheim, Germany: Wiley-VCH.

Simonds, J. L. (1963). Application of Characteristic Vector Analysis to Photographic and Optical Response Data\*. *Journal of the Optical Society of America*, 53(8), 968-974.

Singleton, V. L., y Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*(16), 144-158.

Sogorb Sánchez, M. Á., y Vilanova Gisbert, E. (2006). *Técnicas analíticas de contaminantes químicos: aplicaciones toxicológicas, medioambientales y alimentarias* Madrid, ES: Ediciones Díaz de Santos.

Spectral Imaging Ltd (2010). SpectralDAQ Versión 3.62.

StatSoft Inc (2007). STATISTICA (data analysis software system). Versión 8.0. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).

Sun, D. W. (2010). *Hyperspectral Imaging for Food Quality Analysis and Control* San Diego, CA, USA: Elsevier Science & Technology.

The MathWorks (2012). Matlab®. Versión R2012b.

Torchio, F., Cagnasso, E., Gerbi, V., y Rolle, L. (2010). Mechanical properties, phenolic composition and extractability indices of Barbera grapes of different soluble solids contents from several growing areas. *Analytica Chimica Acta*, 660(1-2), 183-189.

Vandeginste, B. G. M., Massart, D. L., y Buydens, L. M. C. (1998). *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics : Handbook of Chemometrics and Qualimetrics (Data Handling in Science and Technology)*: {Elsevier Science}.

Versari, A., Laurie, V., Ricci, A., Laghi, L., y Parpinello, G. P. (2014). Progress in authentication, typification and traceability of grapes and wines by chemometric approaches. *Food Research International*, 2014, 2-18.

Vivas, N., Glories, Y., Lagune, L., Saucier, C., y Augustin, M. (1994). Estimation du degré de polymérisation des procyanidines du raisin et du vin par la méthode au p-diméthylaminocinnamaldéhyde. *Journal International des Sciences de la Vigne et du Vin*, 28, 319-336.

Waterhouse, A. L. (2002). *Wine phenolics* New York: New York Acad. Sciences.

Wilson, R. H., Smith, A. C., Kačuráková, M., Saunders, P. K., Wellner, N., y Waldron, K. W. (2000). The Mechanical Properties and Molecular Dynamics of Plant Cell Wall Polysaccharides Studied by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Plant Physiology*, 124(1), 397-406.

Wu, D., y Sun, D. W. (2013). Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review - Part II: Applications. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 15-28.

Yoon, S. C., Lawrence, K. C., Smith, D. P., Park, B., y Windham, W. R. (2008). Bone fragment detection in chicken breast fillets using transmittance image enhancement. *Transactions of the Asabe*, 51(1), 331-339.

Zamora, F. (2003). *Elaboración y crianza del vino tinto: aspectos científicos y prácticos*: AMV Ediciones.

Zheng, C., y Sun, D.-W. (2008). Object Measurement Methods. In *Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation*, (pp. 57-80). Amsterdam: Academic Press.

Zouid, I., Siret, R., Jourjon, F., Mehinagic, E., y Rolle, L. (2013). Impact of Grapes Heterogeneity According to Sugar Level on both Physical and Mechanical Berries Properties and Their Anthocyanins Extractability at Harvest. *Journal of Texture Studies*, 44(2), 95-103.